

les études immunologiques faites à l'aide de l'immuno-électrophorèse⁵, dans le but d'étudier le comportement antigénique des urines d'individus différents, de même sexe et de sexe différent vis-à-vis l'immunsérum antiurine de pool n° 1, de rats mâles, dévoilant 7 constituants antigéniques d'origine non-sérique (Figure 2A).

Résultats. La Figure 1 montre des différences importantes entre les deux sexes. Il est à remarquer, comme nous l'avons antérieurement rapporté⁶, qu'il existe une variation phénotypique sure l'uoprotéine principale (flèche b) et sur une rho-protéine (flèche a).

L'analyse immunoélectrophorétique de la Figure 2B confirme l'existence de ces différences entre les protéines urinaires mâle et femelle et illustre les sites rho-protéique

et uoprotéique principal de ces variations sexuelles. Nous montrons de plus que les uoprotéines n° 5 et 6 de l'urine femelle sont plus concentrées que les protéines urinaires homologues de l'urine mâle.

D'autre part, dans ces analyses comparées, les urines différentes de même sexe se comportent différemment à l'A.I.E. et à l'électrophorèse sur acétate de cellulose; à l'électrophorèse sur acétate de cellulose (Figure 3A), nous constatons une différence entre ces individus de même sexe au niveau des α_1 -uoprotéines (flèche d). L'immuno-électrophorégramme (Figure 3B) confirme non seulement l'existence d'une telle différence chez les individus de même sexe, mais confirme de plus le site α -protéique de cette différence (flèche d).

Discussion. L'analyse des protéines urinaires permet de faire, à l'échelle protéique, l'étiquetage génétique et sexuel⁷; constituant une nouvelle tribune d'analyse du degré de purification d'un matériel biologique; il semble bien en effet que la diminution, par des croisements rapprochés, des différences génétiques entre les individus de même race, pourrait laisser une signature au niveau des variations phénotypiques sur les uoprotéines, variations dont l'importance pourrait diminuer en fonction de l'augmentation du degré de pureté génétique. D'autre part, il serait utile d'étudier soit l'influence pharmacologique des hormones sexuelles soit l'influence physiologique des phases de la maturation sexuelle sur les variations phénotypiques reliables au sexe.

Summary. We show that phenotypical variations of rat urinary proteins are either sex-linked (variations at the rho-uoprotein and major urinary protein level) or related to the genetic purity (variations at the α -uoprotein level).

D. DUFOUR

avec la collaboration technique de
G. GAUTHIER et S. LEMIEUX

Centre de Biomédecine, Université Laval, Québec
(Canada), le 10 août 1965.

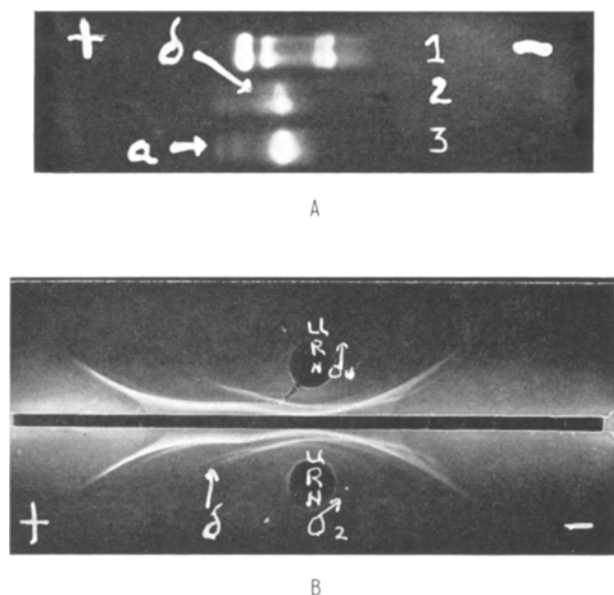


Fig. 3. Mise en évidence, par électrophorèse sur membranes d'acétate de cellulose des protéines urinaires concentrées (65 mg de protéines/ml) (A) et par A.I.E. (B), du site uoprotéique de la variation phénotypique reliable à la pureté génétique, chez le rat de race Sprague Dawley (voir Figure 3A, et Figure 3 B, flèche d). A: 1, migration de référence du sérum normal du rat; 2, urine concentrée du pool₁ constitué par l'urine de 10 rats mâles; 3, urine concentrée du pool₂ constitué par l'urine de 10 autres rats mâles, de même race.

Synthetic Peptides Related to Eledoisin¹. Physalaemin-Like Peptides

Recently² a new endecapeptide, *physalaemin*, was isolated from methanol extracts of the skin of *Physalaemus fuscumaculatus*, a South-American amphibian.

Bio-assay and chemical analysis showed that physalaemin was closely related to eledoisin, both from a biological and a chemical point of view. The proposed structure was confirmed by synthesis^{3,4}.

This communication describes briefly some chemical characteristics and some biological actions of 22 synthetic peptides related to physalaemin or to its active frag-

ments. Owing to the close resemblance between physalaemin and eledoisin, it is evident that the study of the present group of polypeptides will be relevant also to the understanding of the relationship between chemical structure and biological activity in eledoisin-like peptides.

¹ Part V, for part IV see ⁷.

² V. ERSPAMER, A. ANASTASI, C. BERTACCINI, and J. M. CEI, *Exper.* 20, 489 (1964).

³ L. BERNARDI, G. BOSISIO, O. GOFFREDO, and R. DE CASTIGLIONE, *Exper.* 20, 490 (1964).

⁴ F. CHILLEMI, *Gazz. chim. Ital.* 95, 402 (1965).

⁵ P. GRABAR et C. A. WILLIAMS, *Biochem. biophys. Acta* 10, 193 (1953).

⁶ D. DUFOUR et A. TREMBLAY, *Rev. immunol. Paris*, acceptée et sous presse (1965).

⁷ J. S. FINLAYSON, M. POTTER et C. A. RUNNER, *J. nat. Cancer Inst.* 10, 193 (1963).

Chemical formula ^a	Relative biological activity ^e				M.p. (dec.)	[α] _D ²⁰ in 95% AcOH (c = 1%/o)	Electro- phoretic mobility ^d	Molecular formula	Elementary analysis		
	Hypo- tensive effect in dog	Contr. of rabbit large intestine	Contrac- tion of guinea- pig ileum	Contr. of rat uterus					Calculated	found	
1 H-Pyr-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂ (Eledoisin)	100	100	100	100	~180°	-57° (EtOH 95%)	0.35	C ₅₉ H ₈₆ O ₁₆ N ₁₄ S · CF ₃ COOH · 7 H ₂ O	C 48.2 F 48.3	6.7 6.6	12.9 12.5
2 H-Pyr-Ala-Asp-Pro-Asp(NH ₂)-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂ (Physalaemin)	440-460	160-170	180-220	13-16	~170- 180°	-49° (EtOH 95%)	0.64	C ₅₃ H ₇₀ O ₁₄ N ₁₃ S · 2 CF ₃ COOH · H ₂ O	C 48.9 F 48.7	6.0 6.1	13.0 12.7
3 H-Pyr-Ala-Asp-Pro-Asp(NH ₂)-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu- <i>Et</i> -NH ₂ ^b	350-375	65	110	2-3	110°	-47° (EtOH 95%)	0.62	C ₆₀ H ₇₄ O ₁₃ N ₁₃ S · 2 CF ₃ COOH · 2 H ₂ O	C 48.1 F 47.9	6.0 6.3	12.5 12.2
4 H-—Ala-Asp-Pro-Asp(NH ₂)-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	300-320	200-450	160	1	170°	-29°	0.64	C ₄₆ H ₆₉ O ₁₀ N ₁₁ S · 2 HCl · 3.5 H ₂ O	C 50.0 F 49.9	7.1 6.9	
5 H-—Asp-Pro-Asp(NH ₂)-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	160-170	100	140	1	110°	-21.4°	0.68	C ₄₁ H ₆₂ O ₉ N ₁₀ S · 2 HCl	C 52.2 F 51.9	6.8 6.8	
6 H-—Pro-Asp(NH ₂)-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	350-380		3000	8	170°	-15°	0.76	C ₃₇ H ₅₈ O ₈ N ₈ S · 2 HCl · 2 H ₂ O	C 52.4 F 52.1	7.1 7.4	13.2 13.0
7 H-—Asp(NH ₂)-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	60-75	110-120	65	10	234-235°	-11°	0.44	C ₃₁ H ₄₄ O ₆ N ₆ S · HCl · 1/2 H ₂ O	C 55.2 F 55.0	6.9 7.2	
8 H-—Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	220-380	800-1200	260	7.5	180°	-11.5°	0.46	C ₃₂ H ₄₆ O ₈ N ₆ S · HCl · H ₂ O	C 55.1 F 55.0	7.1 7.1	
9 H-—Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.5-2	2	1	2.5	120-122°	-18°	0.47	C ₃₁ H ₄₄ O ₆ N ₆ S · HCl	C 56.0 F 56.0	6.8 6.7	12.6 12.4
10 H-—Phe-Tyr-Gly-Leu- <i>Et</i> -NH ₂ ^b	0.7-1	8	3-4	2	170-173°	-11°	0.44	C ₃₂ H ₄₆ O ₈ N ₆ S · HCl · 2 H ₂ O	C 53.7 F 53.6	7.2 7.4	11.7 11.4
11 H-—Phe- <i>m</i> -Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	0.6-0.8	4	2.5	<1	210-215°	-9°	0.81	C ₃₇ H ₅₆ O ₈ N ₈ SF · 2 HCl · 2.5 H ₂ O	C 50.7 F 50.6	7.1 7.1	12.8 12.5
12 H-—Phe- <i>Tyr</i> -Gly-Leu-Met-NH ₂ OMe	1	8-9	4.5-5	15-20	116-119°	-10.6°	0.77	C ₃₇ H ₅₆ O ₈ N ₈ S · 2 HCl · 2.5 H ₂ O	C 50.8 F 50.7	7.3 7.1	12.8 12.4
13 H-—Lys-Phe- <i>Phe</i> -Gly-Leu-Met-NH ₂ ⁶	200-250		100		160°	-22°	0.71	C ₃₈ H ₅₈ O ₉ N ₈ S · 2 HCl · 2 H ₂ O	C 51.9 F 51.8	7.3 7.5	12.7 12.4
14 H-—Lys-Phe- <i>p</i> - <i>Phe</i> -Gly-Leu-Met-NH ₂ ^c	100-110	650-700	220-230		185-190°						
15 H-—Lys-Phe- <i>m</i> -Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	180-200	1400-1600	200-220	2-4	160°						
16 H-—Lys-Phe- <i>Tyr</i> -Gly-Leu-Met-NH ₂ OMe	250	400-420	260	20	135-140°						

17	H—	Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	200-400	600-650	300-320	30	123-125° — 10°	0.69	C ₃₈ H ₈₈ O ₁₇ N ₈ S · 2 HCl · 3 H ₂ O	C	50.8	7.4
18	H—	Orn-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	200	650	160-170	5	180° — 16°	0.79	C ₃₈ H ₈₄ O ₁₇ N ₈ S · 2 HCl · H ₂ O	C	51.8	7.0
19	H—	His-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	80	90	50	2	178-180° — 12°	0.74	C ₃₇ H ₈₁ O ₁₇ N ₈ · 2 HCl	C	51.3	6.9
20	H—	Arg-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	210		90-100	3	143-145° — 21°	0.71	C ₃₇ H ₈₆ O ₁₇ N ₁₀ S · 2 CH ₃ COOH	C	54.2	7.4
21	H—	Ala-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂	16-22	80-160	35-40	2	240-245° — 29° (MeOH 50%)	0.475	C ₃₄ H ₆₉ O ₁₇ N ₇ S · HCl · 1.5 H ₂ O	C	53.5	7.0
22	H—	Ala-Asp-Pro-Asp(NH ₂)-Lys-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂	250	180-200	150-160	4	130-132° — 39° (EtOH 95%)	0.65	C ₆₀ H ₈₁ O ₁₈ N ₁₃ S · CF ₃ COOH · 2 H ₂ O	C	47.4	6.4
23	H—	Pyr-Ala-Asp-Pro-Asp(NH ₂)-Lys-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂	80-90	130	90-100	6-9	129-131° — 40° (EtOH 95%)	0.30	C ₅₅ H ₈₆ O ₁₅ N ₁₄ S · CF ₃ COOH · 4 H ₂ O	C	48.8	6.8
24	H—	Pro-Asp(NH ₂)-Lys-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂	350-400	550	220-230	25-30	233-235° — 19°	0.63	C ₄₈ H ₇₁ O ₁₆ N ₁₁ S · 2 HCl · 2 H ₂ O	C	50.3	7.6
										F	50.6	7.2

^a Unless otherwise stated all the amino acids have the L-configuration. ^b Bti = Ethionine. ^c p.F.Phe = p-Fluorophenylalanine. ^d In HCOOH:CH₃COOH:H₂O (15:10:75) with leucine as standard. ^e The activity of elodoisin is arbitrarily taken as 100; the activity of the other peptides is compared on the basis of weight and expressed in %.

The conclusions which may be drawn from the tabulated data are similar to those we have reported in previous communications⁵⁻⁷.

(1) By means of a progressive elimination of the N-terminal amino acid residue up to the C-terminal hexapeptide, it is possible to reduce notably the size of the physalaemin molecule, without consistently reducing the hypotensive action. Spasmogenic action on the rabbit and guinea-pig intestine may even increase conspicuously.

A minimum of five amino acid residues is needed in order to have an appreciable activity. This increases tremendously in the C-terminal hexapeptide which is at least half as active as physalaemin itself. However, the biological activity does not increase regularly from the C-terminal hexapeptide to the endcapeptide (physalaemin). In fact the C-terminal heptapeptide and nonapeptide are consistently less active than both the preceding and the subsequent member of the series.

(2) Substitution in the highly active hexapeptide of the lysyl residue with different amino acid residues produces a decay of the biological activity, which is maximum when alanine, a non-basic amino acid, replaces lysine.

Substitution of the tyrosine residue with its methyl ether, *m*-tyrosine, *p*-fluorophenylalanine and phenylalanine⁶ or substitution of methioninamide with ethioninamide leave the activity on the blood pressure virtually unchanged or cause only a slight reduction. (Within elodoisin-like peptides substitution of methioninamide with ethioninamide greatly increases the activity⁷.)

(3) Substitution in the physalaemin molecule itself of the tyrosine with the isoleucine residue present in elodoisin, strongly reduces the biological activity, particularly the hypotensive action. This, however, does not occur if substitution takes place in the C-terminal decapeptide or octapeptide.

(4) Exactly as in the case of elodoisin, but in an even more pronounced way, the activity ratio between physalaemin and a given physalaemin-like polypeptide may vary conspicuously according to the different test objects used in the bio-assay.

(5) With few exceptions, both physalaemin and physalaemin-like peptides show a very poor stimulant action on the rat uterus, as compared with elodoisin, in doses equiactive on blood pressure⁸.

Riassunto. Vengono riportate le proprietà di una serie di peptidi sintetici affini per struttura alla fisalemina.

L. BERNARDI*, G. BOSISIO*, F. CHILLEMI*,
G. DE CARO**, R. DE CASTIGLIONE*,
V. ERSPAMER**, and O. GOFFREDO*

Laboratori Ricerche Farmitalia, Milano and
Istituto di Farmacologia dell'Università di
Parma** (Italy), July 29, 1965.*

⁵ B. CAMERINO, G. DE CARO, R. A. BOISSONNAS, ED. SANDRIN, and E. STÜRMER, *Exper.* 19, 339 (1963).

⁶ L. BERNARDI, G. BOSISIO, F. CHILLEMI, G. DE CARO, R. DE CASTIGLIONE, V. ERSPAMER, A. GLAESSER, and O. GOFFREDO, *Exper.* 20, 306 (1964).

⁷ L. BERNARDI, G. BOSISIO, F. CHILLEMI, G. DE CARO, R. DE CASTIGLIONE, V. ERSPAMER, A. GLAESSER, and O. GOFFREDO, *Exper.* 21, 695 (1965).

⁸ The sample of synthetic elodoisin used in this study possessed 75-80% of the activity of pure natural elodoisin, that of synthetic physalaemin 95-100% of the activity of natural physalaemin.