

254. Isolement à partir de l'hypophyse postérieure du tripeptide leucyl-arginyll-leucine et sa synthèse par une route nouvelle quant à l'incorporation de l'arginine

par Claude Gros, Michel Privat de Garilhe, Antigone Costopanagiotis
et Robert Schwyzer

(5 X 61)

Dans une précédente note¹⁾ nous avons signalé l'existence, dans la poudre d'hypophyse postérieure de Porc, d'un tripeptide auquel nous avons attribué la structure provisoire leucyl-arginyll-leucine (Leu-Arg-Leu). Ce peptide avait été obtenu au cours de l'électrophorèse de zone selon la méthode de PORATH *et al.*²⁾ de la fraction des peptides basiques de l'hypophyse postérieure contenant notamment l'hormone α -mélanophore-stimulante (α -MSH) et une hypophyso-stimuline à effet corticotrope ou « α -Corticotropin-Releasing-Factor» (α -CRF).

La présente communication a pour but de décrire l'isolement à l'état pur et en quantité significative, du tripeptide Leu-Arg-Leu, la détermination de sa structure et sa synthèse.

Préparation du peptide «e». L'extraction de la poudre de lobes postérieurs d'hypophyses de Porc, la précipitation fractionnée à l'acétone et la distribution à contre-courant ont été décrites dans des publications antérieures^{1) 3) 4)}. On a vu que, au cours de la distribution à contre-courant comportant 25 transferts, les peptides basiques se trouvaient dans une fraction dite «fraction H» qui correspondait aux tubes 18–24. Une électrophorèse analytique de cette fraction H sur papier WHATMAN 3 MM dans le système acide acétique–pyridine 0,2M (pH 5,1) permet de distinguer après révélation au bleu de bromothymol et à la ninhydrine au moins 7 taches distinctes numérotées a, b, c, d, e, f et g, dans l'ordre de leurs charges électropositives croissantes. La tache «e» est celle qui nous intéresse actuellement, à savoir le tripeptide Leu-Arg-Leu.

Afin de préparer ce tripeptide en quantité importante et à l'état pur, on fait subir à la fraction H encore 2 traitements successifs:

Une quantité de l'ordre de 500 mg de fraction H subit une seconde distribution à contre-courant dans un système constitué par une phase aqueuse 10^{-2} M en acide p-toluènesulfonique et 10^{-3} M en éthylènediamine-tétracétate de sodium, et une phase organique qui est du *n*-butanol. On effectue 25 transferts à température ordinaire, et on répartit les tubes obtenus en trois lots. Après élimination de l'acide p-toluènesulfonique et de l'éthylènediamine-tétracétate par adsorption sur Amberlite IRA 400, on obtient ainsi 3 sous-fractions:

H₁ tubes 1 à 11 (241,6 mg)

H₂ tubes 12 à 21 (98,2 mg)

H₃ tubes 22 à 26 (39,7 mg)

La fraction H₂, dont la richesse en tripeptide peut être constatée par électrophorèse sur papier, subit une électrophorèse de zones sur colonne⁵⁾. Le support de l'électrophorèse est une colonne de Pevikon 870 C⁵) de 45 × 0,9 cm. L'électrophorèse a lieu en tampon acide acétique–pyridine 0,2 M pH 5,0 sous 300 volts et 8 mA. La partie centrale de l'élution est représentée par la figure 1. Le contenu des tubes 25–40, une fois lyophilisé, fournit 8 mg d'une poudre blanche qui ne contient

¹⁾ M. P. DE GARILHE, C. GROS, J. PORATH & E. B. LINDNER, *Experientia* 16, 414 (1960).

²⁾ J. PORATH, E. B. LINDNER & S. JERSTEDT, *Nature* 182, 794 (1958).

³⁾ C. GROS & M. P. DE GARILHE, *C. r. hebdomadaire des Séances Acad. Sci.* 249, 2234 (1959).

⁴⁾ M. P. DE GARILHE, *Etudes d'Endocrinologie*, p. 317, Hermann, Paris 1961.

que le tripeptide «e» (Leu-Arg-Leu) comme composant peptidique. L'homogénéité de ce produit est contrôlée par électrophorèse sur papier et par chromatographie sur papier dans le système *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10 *v/v*).

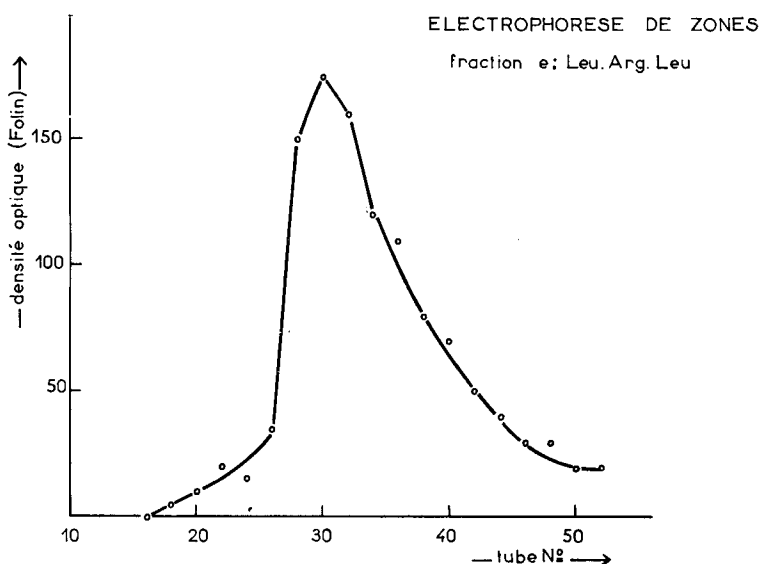


Fig. 1. *Electrophorèse sur colonne de Pevikon*⁵⁾ de la préparation H_2 . Colonne de 45 × 0,9 cm équilibrée et plongée dans un tampon acétate de pyridinium 0,2M pH 5,0; 300 volts, 7 mA; on recueille une fraction de 1,5 ml toutes les 30 min. Les tubes sont analysés pour leur teneur en peptides selon la réaction de FOLIN-LOWRY.

Structure du peptide naturel «e». L'hydrolyse acide totale de peptide fournit uniquement les amino-acides arginine et leucine (Fig. 2) identifiés par chromatographie sur papier WHATMAN No. 1 dans le système butanol-acide formique-eau (75:15:10 *v/v*) et par chromatographie dans le butanol à pH 4 selon McFARREN⁶⁾, ce dernier système permettant de distinguer Leu et Ileu.

Par le dosage des acides aminés dans l'hydrolysats total selon MOORE *et al.*⁷⁾ nous avons trouvé que 1 mg de peptide contenait: 1,1 μ mol d'arginine et 1,8 μ mol de leucine, c'est-à-dire que Arg et Leu sont sensiblement dans un rapport de 1 à 2.

L'action de la carboxypeptidase⁸⁾ a libéré uniquement la leucine.

L'action du fluorodinitrobenzène selon la méthode de SANGER⁹⁾ a abouti à la formation de dinitrophényl-leucine, caractérisée par chromatographie sur papier dans le système phénol-alcool isoamylique-eau (1:1:1 *v/v*) de BISERTE & OSTEUX¹⁰⁾.

⁵⁾ Le Pevikon C 870 est une poudre de chlorure de polyvinyle qui nous a été fournie par la Maison SUPERFOSFAT FABRIKS AKTIEBOLAG, Stockholm (Suède).

⁶⁾ E. F. McFARREN, *Anal. Chemistry* **23**, 168 (1951).

⁷⁾ S. MOORE, D. H. SPACKMAN & W. H. STEIN, *Anal. Chemistry* **30**, 1185 (1958).

⁸⁾ J. JOLLÈS-THAUREAUX, P. JOLLÈS & C. FROMAGEOT, *Biochim. biophys. Acta* **27**, 298 (1958).

⁹⁾ F. SANGER, *Biochem. J.* **45**, 565 (1949).

¹⁰⁾ G. BISERTE & R. OSTEUX, *Bull. Soc. Chim. biol.* **23**, 50 (1951).

Etant donné l'ensemble de ces faits, la seule structure possible pour le peptide «e» est celle d'un tripeptide de séquence: $H\cdot Leu\text{-}Arg\text{-}Leu\cdot OH$. Cette séquence est confirmée par comparaison avec le produit de synthèse.

Les deux peptides, naturel et synthétique, ont été comparés au cours de l'électrophorèse sur papier WHATMAN 3 MM dans le système acide acétique-pyridine (0,2M, pH 5,0) et au cours de la chromatographie sur papier dans le système butanol-acide formique-eau (75:15:10). Dans les deux cas, le comportement des 2 peptides a été identique (Fig. 2).

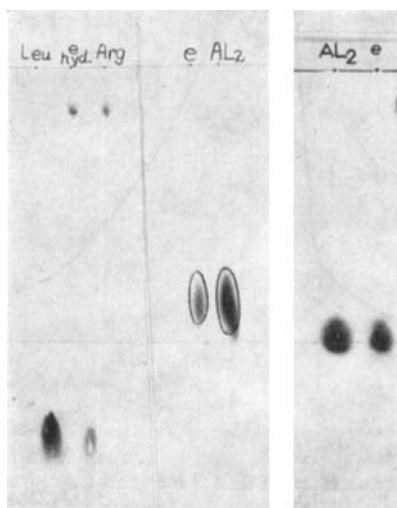


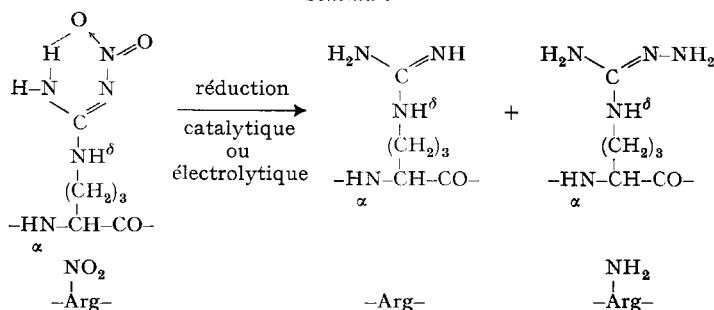
Fig. 2. De gauche à droite: 1° Chromatographie sur papier WHATMAN No. 1 dans le système *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10 *v/v*) de leucine, hydrolysât du tripeptide naturel «e», arginine, le tripeptide naturel «e» et le tripeptide synthétique Leu-Arg-Leu. 2° Electrophorèse sur papier WHATMAN 3 MM dans le tampon acétate de pyridinium 0,2M pH 5,0 pendant 6 h, sous 600 volts et 12 milliampères, du tripeptide synthétique Leu-Arg-Leu et du peptide naturel «e». Toutes les révélations ont eu lieu à la ninhydrine.

Nous nous sommes interrogés sur la signification du tripeptide Leu-Arg-Leu. On pourrait se demander si ce tripeptide ne provient pas de l'hydrolyse d'une molécule plus complexe au cours de l'extraction et des traitements divers que subit la poudre d'hypophyse. Cette hypothèse semble devoir être écartée pour 2 raisons principales: a) le fait que l'on retrouve le tripeptide de façon systématique et en quantité importante dans des préparations ayant subi des traitements divers dont aucun n'est drastique; b) l'absence de la séquence en question dans toutes les hormones déjà connues de l'hypophyse postérieure.

Il est donc possible que ce tripeptide ait un rôle biologique encore inconnu. Dans certains cas il est susceptible de provoquer la libération de corticotropine *in vitro* à partir d'antéhypophyses isolées de Rat (action CRF). Cependant l'absence de parallélisme entre l'action du tripeptide et l'action d'une préparation standard de CRF nous incite à penser qu'il s'agit d'une action non spécifique, difficile à interpréter.

Synthèse de H·Leu-Arg-Leu·OH (par A. C. et R. S.)¹¹⁾. L'incorporation du résidu de l'arginine pose le problème le plus difficile de toute la synthèse du tripeptide H·Leu-Arg-Leu·OH. A cet effet, on emploie d'ordinaire des produits dérivés de la N^ω-nitroarginine¹²⁾. Pour l'achèvement de la synthèse le groupement nitro est éliminé par réduction catalytique ou électrolytique¹³⁾. Nos expériences¹⁴⁾ nous indiquent que ces deux méthodes donnent lieu à la formation de certaines quantités de sous-produits contenant le groupement aminoguanidine (Schéma 1)¹⁵⁾. Fréquemment, ces dérivés sont très difficiles à séparer des guanidines désirées. Dans des cas simples (où il n'existe pas d'interférence avec d'autres groupements réactifs) on peut toujours les différencier des guanidines simples par leur forte coloration avec le réactif de FOLIN-CIOCALTEU¹⁶⁾. En outre, on observe souvent la formation d'une lactame entre le groupement carboxyle et l'atome N^δ au cours des synthèses peptidiques utilisant des dérivés de la nitro-arginine protégés au N^α¹⁷⁾.

Schéma 1



Tous ces inconvénients nous ont engagés à chercher d'autres dérivés qui nous permettraient d'incorporer l'arginine dans un peptide sous une forme protégée plus convenable. ZERVAS *et al.*¹⁸⁾ ont décrit la tri-carbobenzoxy-L-arginine (I) et l'emploi de ce produit pour la synthèse de peptides avec de l'arginine N-terminale. La scission des trois groupements carbobenzoxy est effectuée par hydrogénolyse catalytique, qui les élimine tous simultanément. Les mêmes auteurs ont ainsi décrit

¹¹⁾ Les abréviations utilisées ici pour désigner les acides aminés sont essentiellement formées suivant la proposition de E. BRAND & J. D. EDSALL, *Ann. Review Biochemistry* 16, 223 (1947).

BOC- = *t*-butoxycarbonyl = (CH₃)₃C·OCO-; Z- = carbobenzoxy- = -CH₂OCO-.

¹²⁾ Un bon résumé de la littérature concernant la nitro-arginine se trouve chez H. GIBIAN & E. SCHRÖDER, *Liebigs Ann. Chem.* 642, 145-162 (1961). Ces auteurs ont aussi préparé un grand nombre de nouveaux peptides de la nitro-arginine.

¹³⁾ M. E. CLUBB, P. M. SCOPES & G. T. YOUNG, *Chimia* 14, 373 (1960).

¹⁴⁾ Observations non publiées faites par le Dr. B. RINKER.

¹⁵⁾ L'aminoguanidine a été synthétisée par J. THIELE, *Ann.* 270, 23 (1892), et V. A. CONARD & R. L. SHRINER, *J. Amer. chem. Soc.* 55, 2869 (1933), par réduction (Zn + HCl) de la nitro-guanidine.

¹⁶⁾ O. FOLIN & Y. CIOCALTEU, *J. biol. Chemistry* 73, 629 (1927).

¹⁷⁾ M. BODANSZKY & J. T. SHEEHAN, *Chemistry & Ind.* 1960, 1268.

¹⁸⁾ M. ZERVAS, M. WINITZ & J. P. GREENSTEIN, *Arch. Biochemistry Biophysics* 65, 573 (1956); *J. org. Chemistry* 22, 1515 (1957); *J. Amer. chem. Soc.* 83, 3300 (1961); L. ZERVAS, T. OTANI, M. WINITZ & J. P. GREENSTEIN, *Arch. Biochemistry Biophysics* 75, 290 (1958); *J. Amer. chem. Soc.* 81, 2878 (1959).

la N^ω-dicarbobenzoxo-arginine (II) avec deux groupes protecteurs dans la fonction guanidine. Nous avons alors introduit sur l'atome N^α de ce composé le résidu *t*-butoxy-carbonyl (BOC-)¹⁹ au moyen de l'azidoformiate de *t*-butyle²⁰. De ce produit et de ses dérivés carboxyliques (peptides p. ex.) on peut éliminer sélectivement soit le groupement BOC- (par catalyse acide douce²¹) soit les groupes carbobenzoxo- (par hydrogénation catalytique, de préférence sous pression d'environ 5 at.). Le nouveau dérivé BOC·Arg(Z₂)·OH (III) permet alors de préparer facilement des peptides contenant le résidu -Arg(Z₂)- au milieu de la chaîne.

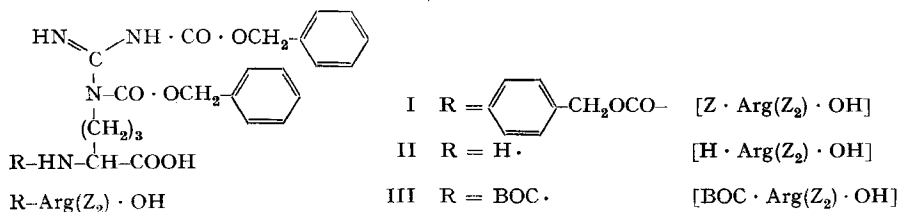
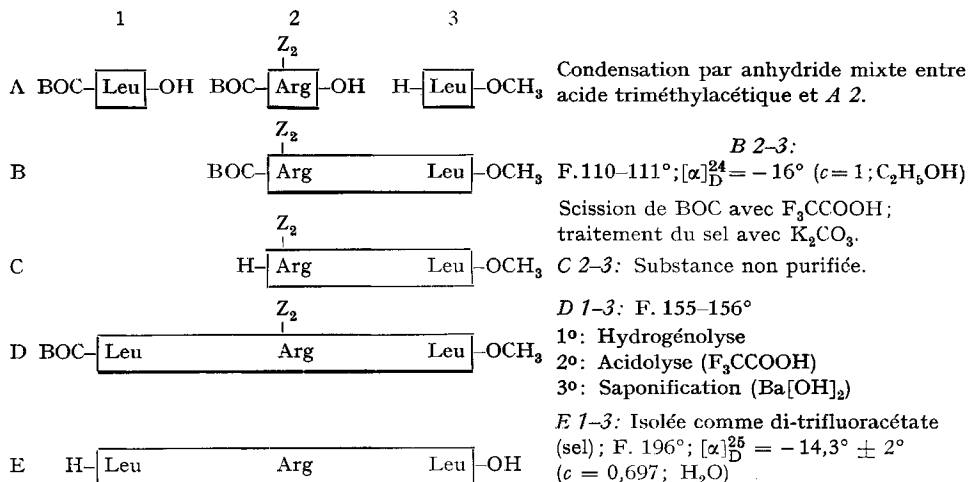


Schéma 2



La synthèse du tripeptide H·Leu-Arg-Leu·OH s'est effectuée par étapes commençant au reste C-terminal, afin d'éviter la racémisation partielle²²). Le groupe BOC- a été choisi non seulement pour la protection de N^α du résidu -Arg(Z₂)-(A₂),

¹⁹) Expériences exécutées par P. SIEBER.

²⁰) a) F. C. MCKAY & N. F. ALBERTSON, J. Amer. chem. Soc. 79, 4686 (1957); b) G. W. ANDERSON & A. C. MCGREGOR, *ibid.*, 6180; c) L. A. CARPINO, *ibid.*, 4427; d) R. SCHWYZER, P. SIEBER & H. KAPPELER, Helv. 42, 2622 (1959).

²¹) R. SCHWYZER & W. RITTEL, Helv. 44, 159 (1961).

²²) Le principe de la synthèse par étapes commençant au reste C-terminal pour éviter la racémisation partielle a été reconnu et appliqué par plusieurs auteurs, p. e. R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J. P. WALLER, Helv. 38, 1491 (1955); R. SCHWYZER & C. H. LI, Nature 182, 1669 (1958); R. SCHWYZER & P. SIEBER, Helv. 42, 972 (1959); H. SCHWARZ & F. M. BUMPUS, J. Amer. chem. Soc. 81, 890 (1959); M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, Nature 183, 1324 (1959).

mais aussi pour celle de N^α de la leucine N-terminale (A 1). On a employé des anhydrides mixtes entre le dérivé de l'acide α-aminé et soit l'acide triméthylacétique²³⁾ soit l'acide isobutylcarbonique²⁴⁾. L'acide trifluoracétique, un solvant excellent, est utilisé pour la scission à température ordinaire des groupes BOC-²¹⁾. On a hydrogéné à l'échelon du tripeptide protégé (D 1–3), puis on a éliminé BOC- et saponifié le groupe ester méthylique par Ba(OH)₂. Le tripeptide est purifié par chromatographie sur gel de silice (en colonne et en couche mince) et par distribution à contre-courant. Il cristallise à l'état pur comme di-trifluoracétate.

Partie expérimentale synthétique

*BOC-Arg(Z₂) · OH (III)*¹⁹⁾: 15,6 g de N^ω-dicarbobenzoxy-L-arginine sont dissous dans un mélange de 310 ml de dioxanne, 310 ml d'eau, 15,6 g de MgO et 9,8 ml d'azidoformiate de *t*-butyle^{20 c,d)}. Après 16 h d'agitation on évapore sous pression réduite, recouvre le résidu d'une couche d'acétate d'éthyle et acidifie avec HCl:H₂O (1:1) à 0°. L'extrait organique est lavé à l'eau et évaporé à 40°/15 Torr sans séchage préliminaire. Le résidu (14,6 g) est chromatographié sur une colonne de gel de silice «MERCK» contenant 15% d'eau avec CHCl₃. On fait l'élution avec 800 ml d'un mélange chloroforme-acétate d'éthyle (1:1 *v/v*). L'évaporation de l'éluat à 40°/15 Torr fournit 11,8 g (61%) de résidu. Celui-ci est dissous dans 55 ml de méthanol et mélangé goutte à goutte avec 15 ml d'eau. Les cristaux sont recueillis par filtration, lavés avec MeOH:H₂O (1:1) et séchés à 50°/15 Torr: 10,8 g (56%), F. (138) 141–142° (avec décomp.).

C₂₇H₃₄O₂N₄ (542,57) Calc. C 59,77 H 6,32 N 10,32% Tr. C 59,76 H 6,53 N 10,23%

BOC · Arg(Z₂) · Leu · OCH₃ (B 2–3): On prépare l'anhydride mixte de 542,3 mg de BOC · Arg(Z₂) · OH (III), dissous dans 10 ml de tétrahydrofuranne et 0,139 ml de triéthylamine, par addition (de –5° à –10°) de 0,123 ml de chlorure d'acide triméthylacétique. Après 20 min on ajoute une solution de H · Leu · OCH₃ dans quelques ml de tétrahydrofuranne, qu'on a préparée avec 1,99 g de H · Leu · OCH₃, HCl²⁵⁾ et 0,3 ml de triméthylamine dans ce solvant. On laisse réagir 30 min à –10° et une h à 20°, sépare du chlorhydrate de triéthylamine, évapore le solvant à 40°/15 Torr et dissout le résidu dans l'acétate d'éthyle. Cette solution est lavée par l'acide citrique (à 5%), NaHCO₃ (à 5%), H₂O et NaCl saturé, séchée par Na₂SO₄ et évaporée à 40°/15 Torr. Le résidu cristallise dans le mélange éther-éther de pétrole à basse température: 517 mg (77%), F. 104°. L'hydrolyse du produit (HCl conc./AcOH, 1:1, 24 h, 120°) donne les deux acides aminés Leu et Arg, identifiés par chromatographie sur papier dans le système *n*-butanol: CH₃COOH:H₂O (4:1:1 *v/v*). Une purification est effectuée par chromatographie sur Al₂O₃ (neutre, WOELM, activité III) dans CCl₄. L'éluat contient la substance, F. 110–111° (cristallisée dans l'éther avec éther de pétrole). Séchage 4 h à 60°/0,01 Torr. [α]_D²⁴ = –16° ± 1° (*c* = 1, éthanol).

C₃₄H₄₇O₉N₅ (669,72) Calc. C 60,97 H 7,07 N 10,46% Tr. C 61,05 H 7,23 N 10,38%

BOC · Leu-Arg(Z₂) · Leu · OCH₃ (D 1–3): On dissout 282 mg de BOC · Arg(Z₂) · Leu · OCH₃ (B 2–3) dans 2 ml de F₃CCOOH, laisse réagir pendant 15 min et évapore le solvant à 40°/15 Torr. Le produit est agité avec un mélange de solution saturée de K₂CO₃ et d'acétate d'éthyle à froid. La couche organique est séchée avec K₂CO₃ (10 min) et versée goutte à goutte dans une solution d'anhydride mixte qu'on a préparée de 242 mg de BOC-Leu · OH²⁰⁾ avec 0,139 ml de triéthylamine et 0,34 ml de chloroformiate d'isobutyle²⁴⁾ dans 10 ml de tétrahydrofuranne (20 min à –10°). Après une heure à –10° et une heure à 20° on filtre (de Et₃N, HCl), évapore le solvant (40°/15 Torr) et dissout le produit dans l'acétate d'éthyle. On lave avec l'acide citrique (à 5%), NaHCO₃ (à 5%), eau et sèche avec Na₂SO₄. L'huile qui reste après évaporation du solvant est cristallisée dans l'éther-éther de pétrole: 189 mg (57%), F. 155–156°, séchage 4 h à 60°/0,01 Torr. Le chromatogramme sur couche mince de gel de silice, développé par CHCl₃, indique que la substance est homogène (une seule tache brune est révélée dans la vapeur d'iode).

C₄₀H₅₈O₁₀N₆ (782,96) Calc. C 61,37 H 7,46 N 10,73% Tr. C 61,35 H 7,51 N 10,46%

²³⁾ M. T. LEPLAWY, D. S. JONES, G. W. KENNER & R. C. SHEPPARD, *Tetrahedron* 17, 39 (1960).

²⁴⁾ J. R. VAUGHAN, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 3547 (1951).

²⁵⁾ M. BRENNER & W. HUBER, *Helv.* 36, 1109 (1953); nous avons trouvé F. 137°.

$H \cdot \text{Leu-Arg-Leu} \cdot \text{OH}$, $2 \text{CF}_3\text{COOH}$ (*E* 1-3): 220 mg de $\text{BOC} \cdot \text{Leu-Arg}(\text{Z}_2)\text{-Leu} \cdot \text{OCH}_3$ sont soumis à l'hydrogénation catalytique dans 50 ml de méthanol pendant 12 h sous 5 at. de H_2 en présence de 30 mg de PdCl_2 (dissous préalablement dans 3 ml de HCl 1N). Après filtration et évaporation du solvant, le résidu est traité 15 min avec 2 ml de F_3CCOOH . On évapore le solvant et sèche le produit quelques min à 0,01 Torr. Ensuite il est dissous dans 2 ml d'eau et traité avec l'échangeur d'ions Amberlite IRA 400 sous forme d'acétate. Après filtration et évaporation on obtient 168 mg d'une huile qu'on saponifie avec 4,5 éq. d'une solution de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,39N. Après 45 min à 20° on ajoute la quantité équivalente de H_2SO_4 0,1N (et quelques gouttes de CH_3COOH), essore et évapore la solution limpide. Le résidu donne sur le chromatogramme sur couche mince une seule tache révélée par ninhydrine, mais deux taches sont révélées par la vapeur d'iode, dont l'une est identique à celle qui est positive à la ninhydrine, l'autre se trouve presque sur le front (solvant: $\text{MeOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$, 70:5:25). Par chromatographie dans le même mélange sur une colonne de gel de silice (MERCK) on obtient de 102 mg d'huile qui fournissent 88 mg de substance pure, F 165°. Les chromatogrammes sur couche mince de gel de silice et sur papier ($n\text{-BuOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{pyridine}$, 30:6:24:20 *v/v*, $R_f = 0,42$; $n\text{-BuOH}:\text{EtOH}:\text{NH}_3$ conc.: H_2O , 4:4:1:1 *v/v*, $R_f = 0,66$) indiquent l'homogénéité du produit. L'analyse, par contre, montre la présence d'une contamination inorganique (séchage comme d'habitude):

$\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_8\text{N}_6$ (520,71) Calc. C 50,75 H 8,51 N 16,14% Tr. C 49,55 H 8,75 N 16,50%
(compte tenu des 16,8% de cendres)

80 mg de ce produit sont distribués à contre-courant (35 transferts) dans le système *sec.-BuOH*: acide trifluoroacétique aqueux à 1% (1:1 *v/v*). Le tripeptide $H \cdot \text{Leu-Arg-Leu} \cdot \text{OH}$, $2 \text{F}_3\text{CCOOH}$ (*E* 1-3) se trouve dans les tubes N° 21 à 26. Après évaporation et recristallisation dans l'éthanol-acétonitrile et 4 h de séchage à $60^\circ/0,01$ Torr on obtient 43 mg de *E* 1-3, F 196°, $[\alpha]_D^{25} = -14,3^\circ \pm 2^\circ$; $[\alpha]_{405}^{25} = -35,9^\circ$. Une seule tache (ninhydrine aussi bien qu'iode) dans le chromatogramme sur couche mince de gel de silice dans le système $\text{MeOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (73:5:25).

$\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_8\text{N}_6\text{F}_6$ (628,60) Calc. C 42,08 H 6,10 N 13,39% Tr. C 42,16 H 5,65 N 13,51%

Nous remercions le Professeur E. LEDERER de l'intérêt qu'il a témoigné à ce travail, et le Docteur P. JOLLÈS, de l'aide efficace qu'il nous a apportée pour la détermination de la structure du tripeptide (C. G. et M. P. DE G.), ainsi que la maison CIBA S. A., Bâle, dont l'aide nous a permis de nous procurer les matériaux nécessaires (A. C. et R. S.).

SUMMARY

A basic peptide isolated from hog posterior pituitary was shown to have the structure leucyl-arginyl-leucine. A tripeptide of the same sequence was synthesized; both the natural and the synthetic tripeptide behave identically in chromatography and electrophoresis on paper. The physiological meaning of the compound is still unknown.

The synthesis of the tripeptide $H \cdot \text{Leu-Arg-Leu} \cdot \text{OH}$, $2 \text{F}_3\text{CCOOH}$ was effected in a stepwise manner, starting at the C-terminal, using N^α -*t*-butoxycarbonyl amino acids, and condensing them by means of the mixed anhydride procedure. N^α -*t*-butoxycarbonyl- N^ω -dicarbobenzoxy-L-arginine (III) has been prepared for the first time. It provides a new and convenient means of introducing arginine in a protected form into peptides, as the N^α -group may easily be selectively cleaved by acid catalysis and the N^ω -carbobenzoxy groups may be removed by catalytic hydrogenation—preferentially at about 5 atmospheres pressure.

Laboratoire de Chimie biologique de la
Faculté des Sciences de Paris et
Institut de Chimie organique de l'Université de Zurich