

Synthesis and Properties of 1-Deamino-, 9-Decarboxy- and 1-Deamino-9-Decarboxy-Bradykinin¹

Amongst the many analogues of bradykinin which have been studied¹, there are compounds which demonstrate that the presence of each of the guanidino groups in positions 1 and 9², but not the β -hydroxy group in position 6³, are essential for the kinin activity. We wish to report the synthesis of three further analogues of bradykinin for establishing the importance of both the terminal amino and carboxyl groups of bradykinin, which are the only remaining functional groups normally considered as chemically reactive. The analogues described and studied are 1-deamino-bradykinin, 9-decarboxy-bradykinin, and 1-deamino-9-decarboxy-bradykinin.

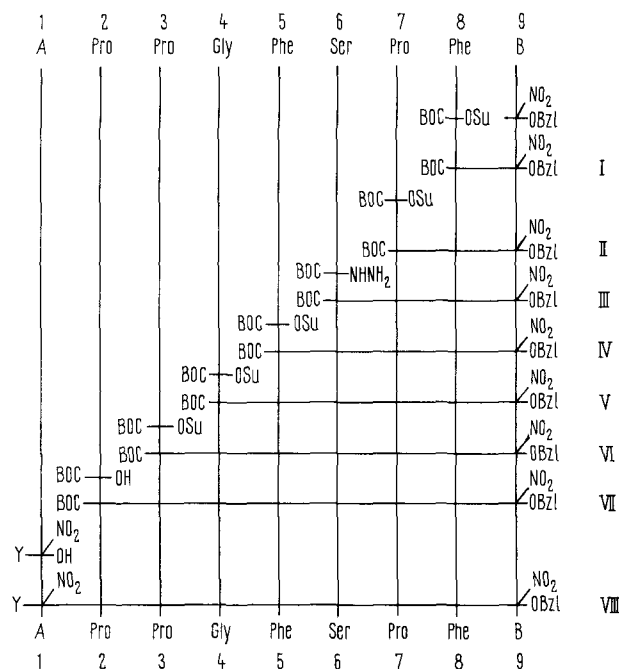
The synthesis of the corresponding protected nonapeptides VIIIb, VIIIc, VIII d was achieved by the route illustrated in scheme 1⁴, which was first tested by synthesizing bradykinin (VIIIa).

Nitro-agmatine hydrobromide (X), required for the synthesis of the 9-decarboxy-analogue, was prepared according to scheme 2. Crude N-monobenzyloxycarbonyl-1,4-diaminobutane, prepared (31%) from the diamine

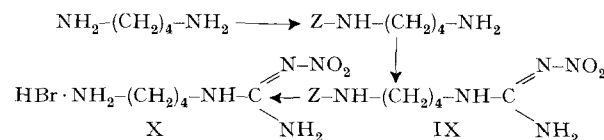
and benzylphenylcarbonate⁵, was refluxed with 3,5-dimethyl-1-nitroguanylpyrazole⁶ in EtOH. Partial evaporation and addition of Et₂O resulted in the precipitation of IX, 74%, m.p. 123–124° (EtOH) (Found: C, 50.7; H, 6.2; N, 22.8%. C₁₅H₁₉N₅O₄ requires C, 50.5; H, 6.2; N, 22.6%). The benzyloxycarbonyl group was cleaved with HBr–AcOH to give X, 98%, m.p. 175–176° (MeOH–Et₂O) (Found: C, 23.8; H, 5.5; N, 27.2; Br, 31.0%. C₅H₁₄N₅O₂Br requires C, 23.5; H, 5.5; N, 27.4; Br, 31.2%).

3,5-Dimethyl-1-nitro-guanylpyrazole reacted with 4-amino-valeric acid under reflux in aqueous dioxane to give 4-nitro-guanylvaleric acid, 53%, m.p. 200–203° (Found: C, 35.5; H, 6.1; N, 27.1%. C₆H₁₂O₄N₄ requires C, 35.3; H, 5.9; N, 27.4%). The protected nonapeptides VIII (c) and VIII (d) were prepared by coupling (DCI) this acid to the free bases derived from VII (a) and VII (b), respectively.

Hydrogenolysis of the protected nonapeptides in acetic acid-water-HCl over 5% palladium charcoal gave the corresponding crude, unprotected hydrochlorides, which



Scheme 1. Synthesis of (a) bradykinin (A = Arg, B = Arg; Y = BOC); (b) 9-decarboxy-bradykinin (A = Arg, B = Agm; Y = Z); (c) 1-deamino-bradykinin (A = Guv, B = Arg); and (d) 1-deamino-9-decarboxy-bradykinin (A = Guv, B = Agm).



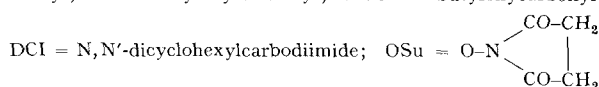
Scheme 2. Synthesis of nitro-agmatine hydrobromide.

¹ See E. SCHRÖDER and K. LÜBKE, *The Peptides* (Academic Press, New York 1966), vol. 2, p. 65.

² E. SCHRÖDER, *Ann. Chem.* 679, 207 (1964); 673, 220 (1964). – E. D. NICOLAIDES, H. A. DE WALD and M. K. CRAFT, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 104, 15 (1963); *J. med. Chem.* 6, 739 (1963).

³ M. BODANSKY, M. A. ONDETTI, J. T. SHEEHAN and S. LANDE, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 104, 24 (1963); *J. Am. chem. Soc.* 85, 991 (1963).

⁴ Abbreviations: Amino-acid and peptides are abbreviated as recommended by the Committee on Nomenclature which reported at the 5th European Peptide Symposium, Oxford, 1962, Proceeding Ed. G. T. YOUNG (Pergamon Press, New York 1963). In addition, Agm = agmatine; Guv = ω -guanylvaleric acid; Bzl = benzyl; Z = benzyloxy-carbonyl; BOC = t-butyloxycarbonyl;



⁵ H. ZAHN and F. SCHMIDT, *Makromolek. Chem.* 36, 1 (1959).

⁶ R. A. HENRY, R. C. MAKOSKY, G. B. L. SMITH, *J. Am. chem. Soc.* 73, 474 (1951). – A. F. S. A. HABEED, *Biochim. biophys. Acta* 93, 533 (1964).

Compound	$[\alpha]_D^{25}$	Amino-acid analysis	Biological activity in relation to bradykinin
Bradykinin	– 94.4 (c = 2, H ₂ O)	Arg _{1.9} Ser _{1.0} Pro _{2.8} Gly _{1.0} Phe _{2.0}	1
9-Decarboxy-bradykinin	– 104.3 (c = 0.5, H ₂ O)	Arg _{1.0} Ser _{1.0} Pro _{2.9} Gly _{1.0} Phe _{2.0}	1/200–1/400
1-Deamino-bradykinin	– 51.2 (c = 1, DMF)	Arg _{1.1} Ser _{1.0} Pro _{2.9} Gly _{1.0} Phe _{2.0}	1/4.4
1-Deamino-9-decarboxy-bradykinin	– 98.7 (c = 1, H ₂ O)	Ser _{1.0} Pro _{2.8} Gly _{1.0} Phe _{2.0}	1/10,000

were purified by carrier-free preparative electrophoresis and countercurrent distribution. Their constants are compiled in the Table.

The biological activities of the analogues on the isolated rat uterus, in relation to bradykinin (1.0) are mentioned in the Table, from which it appears that the terminal carboxyl group is very important in this test whereas the terminal amino group seems of lesser significance.

Zusammenfassung. Es wird über die Synthese von 1-Deamino-bradykinin, 9-Decarboxy-bradykinin und 1-Deamino-9-decarboxy-bradykinin und über deren biologische Aktivität berichtet. Nach dem verwendeten Testsystem scheint die endständige Carboxylgruppe für die

Aktivität bedeutsamer zu sein als die endständige Aminogruppe.

W. D. JOHNSON^{7,8}, H. D. LAW⁸
and R. O. STUDER⁹

F. Hoffmann-La Roche Co., Ltd.,
Chemical Research Department,
Basel (Switzerland), 11 April 1969.

⁷ Part of the PhD Thesis of W. D. JOHNSON.

⁸ Department of Chemistry and Biology, Liverpool Regional College of Technology.

⁹ Chemical Research Department, F. Hoffmann-La Roche & Co., Ltd., Basle (Switzerland).

Zur Bindung von Biliverdin an das Protein im Crenilabrus-Blau

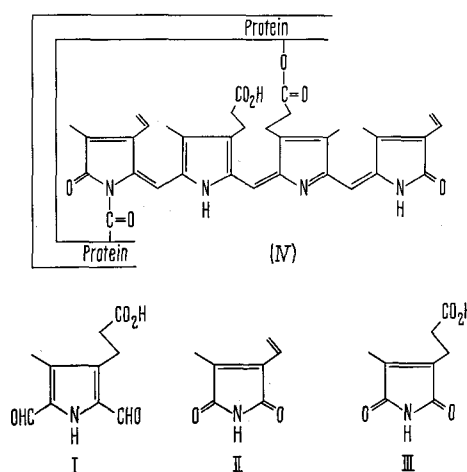
In einer früheren Mitteilung¹ berichteten wir über die Charakterisierung der farbgebenden Gruppe von Crenilabrus-Blau, einem Chromoprotein des Mittelmeerfisches *Crenilabrus pavo* C.V., als Biliverdin. Die Bindung dieses Farbstoffs an das Protein ist sicher keine salzartige oder Adsorptionsbindung, da die farbgebende Gruppe weder durch organische Lösungsmittel noch durch wässrige Harnstofflösungen oder pH-Veränderungen freigelegt wird. Von den möglichen kovalenten Bindungen wurde bisher – aufgrund der leichten Spaltbarkeit durch Methylat – nur eine Esterbindung für wahrscheinlich gehalten. Einen näheren Einblick in die Bindungsverhältnisse hat nun der Chromsäureabbau von Crenilabrus-Blau gewährt.

Zum Abbau werden je 6,05 mg Chromoprotein (entsprechend 97 µg Biliverdin) in 0,25 ml Wasser gelöst und mit 0,1 ml Azeton versetzt; zum Vergleich dienen die mit 0,25 ml Wasser versetzten Lösungen von 50 bzw. 100 µg Biliverdin in 0,1 ml Azeton. Die Ansätze werden je 1 h mit 0,2 ml Oxydationslösung [1% CrO₃ in 2*n* H₂SO₄; a) bei 20°C; b) bei 100°C bzw. 1% KHSO₄/1% Na₂Cr₂O₇ bei 20°C] stengelassen. Die Abbauprodukte werden dann mit 0,2 ml Äther extrahiert und dünnstschichtchromatographisch identifiziert²; aus den Fleckengrößen werden die Mengen mit Hilfe von Vergleichsproben abgeschätzt.

Dass einer der mittleren Ringe (II bzw. III) und einer der äusseren (I bzw. IV) nicht an das Protein gebunden sein kann, zeigt der Chromatabbau des Chromoproteids: Dabei entstehen der Pyrroldialdehyd (I) und Methylvinylmaleinimid (II) in einer Menge, die jeweils einem Pyrrolring entspricht. In Übereinstimmung damit liefert der Chromsäureabbau bei 20°C (II) und Hämatinsäureimid (III) aus jeweils einem Ring. Das bedeutet, dass zwei Bindungen zum Protein vorhanden sein müssen, eine von einem der mittleren und eine von einem der äusseren Ringe des Biliverdins, sofern nicht die Abbauprodukte der anderen beiden Ringe durch Sekundärreaktionen verlorengehen. Die fehlenden Imide sollten beim Chromsäureabbau bei 100°C (Hydrolyse) gefunden werden; tatsächlich erhält man jetzt (III) in der für zwei Ringe erwarteten Menge, jedoch verschwindet das Methylvinylmaleinimid dabei fast vollständig. Offensichtlich addieren sich die Vinylgruppen des Gallenfarbstoffs besonders leicht in der Hitze an Thiolgruppen des Proteins (s. unten). Nach Vorbehandlung von Crenilabrus-Blau

mit Alkali (1 h bei 20°C in 0,1*n* NaOH) ergibt der Chromsäureabbau bei 20°C hingegen (II) aus zwei Ringen und (III) aus einem Ring. Demnach wurde durch die milde Alkalibehandlung die Bindung des äusseren Rings gelöst, während die (vermutliche Ester-) Bindung des inneren Rings unter diesen Bedingungen erhalten bleibt. Den freien, chloroformlöslichen Farbstoff erhält man erst durch Einwirkung von heissem Alkali.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich die in Formel (IV) gezeigten Bindungsverhältnisse für das Biliverdin im Crenilabrus-Blau ableiten. Die Empfindlichkeit gegen kaltes Alkali spricht für das Vorliegen einer N-Azyl-Bindung am äusseren Ring, die Labilität gegen heisses Alkali für eine Esterbindung am inneren Ring³. Damit



¹ L. ABOLINŠ und W. RÜDIGER, *Experientia* 22, 298 (1966).

² W. RÜDIGER, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 348, 129 (1967); *Biochemical Society Symposium on Porphyrins and Related Compounds*, London (1968).

³ Welcher der inneren und welcher der äusseren Ringe gebunden ist, ist nicht bekannt; in Analogie zum Phykoerythrin werden hier Bindungen an den Ringen I und III formuliert.