



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 294 176 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 37/00  
C 12 N 9/99  
G 01 N 33/573  
C 12 Q 1/25

## DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

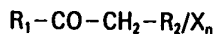
(21) DD A 61 K / 340 569 7 (22) 11.05.90 (44) 26.09.91

(71) siehe (73)  
(72) Barth, Alfred, Prof. Dr.; Demuth, Hans-Ulrich, Dr.-Dipl.-Biochem.; Fittkau, Siegfried, Dr. Dipl.-Chem.; Steinmetzer, Torsten, Dipl.-Biochem., DE  
(73) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Universitätsplatz 10, O - 4010 Halle, DE  
(74) siehe (73)

(54) **Neue Inhibitoren zur Hemmung der katalytischen Aktivität von prolin-spezifischen und anderen proteolytischen Enzymen und Verfahren zu ihrer Herstellung**

(55) Inhibitoren; Enzyme; Hydrolasen; Proteasen; Aminosäurederivate; Peptidderivate; reversible Hemmung; Diagnostika; Therapeutika; Pharmaka

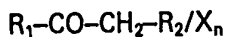
(57) Die Erfindung dient der Entwicklung, Herstellung und Anwendung von hochwirksamen, reversiblen Inhibitoren zur Hemmung unerwünschter Aktivität von Enzymen, die im Zuge ihrer katalytischen Einwirkung auf Substrate Esterbindungen spalten und knüpfen sowie Peptidbindungen spalten, isomerisieren und synthetisieren können. Die Erfindung bezieht sich auf Peptidylammonium- (bzw. amino-) methylketone der allgemeinen Formel



Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines leicht anwendbaren Verfahrens zur Kontrolle der Aktivität von Enzymen in deren gereinigter Form, sowie in normalen und pathologisch veränderten Körperflüssigkeiten, Organen, Geweben, Zellen sowie Zellkulturen menschlicher, tierischer, mikrobieller, viraler Herkunft sowohl in vitro als auch in vivo und zur synthetischen Gewinnung der Inhibitoren. Dabei kann der Rest  $R_1-CO$  stehen für  $\alpha$ -Aminosäure- oder N-geschützte  $\alpha$ -Aminosäurereste, N-geschützte Peptidylreste oder N-ungeschützte Peptidylreste, wobei diese N-Schutzgruppen Alkoxy-carbonyl, Aralkoxy-carbonyl, Alkanoyl, Cycloalkyl-carbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclyl-carbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkyl-carbamoyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxy-carbonylaminoalkanoyl Gruppierungen bzw. gemeinsam mit dem Stickstoffatom gebildete cyclische Amide darstellen können, oder aliphatische, verzweigte, aromatische sowie aromatische und substituierte und heterocyclische Acylreste wie Aralkoxy-carbonyl, Alkanoyl, Cycloalkyl-carbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclyl-carbonyl, Alkylsulphonyl, Aryl sulphonyl, Monoaralkyl-carbamoyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxy-carbonylaminoalkanoyl Gruppierungen sein können.  $R_2$  kann stehen für primäre oder sekundäre Amine (einschließlich von C-terminal geschützten und ungeschützten Aminosäuren und Peptiden außer Prolin in N-terminaler Position) und tertiäre aliphatische oder aromatische, verzweigte oder heterocyclische substituierte und unsubstituierte Amine (wie z.B. Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin, Pyridine oder Sarcosin, N-Methylalanin, Azetidincarbonsäure, Azetidincarbonsäure, Dehydroprolin, N-Methylprolin, Aminobenzoesäure, Nicotinsäure, Isonicotinsäure, Chinolinsäure, die ebenfalls an ihren Carboxylfunktionen durch Peptide oder Schutzgruppen verlängert sein können).  $R_2$  kann positiv geladen sein.  $X_n$  ( $n=1$ , im Falle positiv geladener Reste  $R_2$ ) kann stehen für  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $J^-$ ,  $CF_3COO^-$ ,  $BF_4^-$ ,  $N_3^-$  und andere negativ geladene Ionen. Die Erfindung ist für die Medizin, Immunbiochemie und die pharmazeutische Industrie zur Anwendung als Diagnostika, Therapeutika oder Pharmaka von Bedeutung.

**Patentanspruch:**

1. Verwendung von neuen, reversibel wirkenden Inhibitoren für Enzyme, die im Zuge ihrer katalytischen Einwirkung auf Substrate Esterbindungen und Peptidbindungen spalten, isomerisieren sowie knüpfen können, zur Hemmung der katalytischen Aktivität und als Diagnostika dieser Enzyme, **gekennzeichnet durch Verbindungen der allgemeinen Formel I**



in der der Rest  $R_1-CO$  für  $\alpha$ -Aminosäure- oder N-geschützte  $\alpha$ -Aminosäurereste, N-geschützte Peptidylreste oder N-ungeschützte Peptidylreste, wobei die N-Schutzgruppen Alkoxycarbonyl, Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbamoyle, Cinnamoyle,  $\alpha$ -Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen bzw. gemeinsam mit dem Stickstoffatom gebildete cyclische Amide darstellen können, oder aliphatische, verzweigte, aromatische sowie aromatische und substituierte und heterocyclische Acylreste wie Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbamoyle, Cinnamoyle,  $\alpha$ -Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen sein können und  $R_2$  für primäre oder sekundäre Amine, einschließlich von C-terminal geschützten und ungeschützten Aminosäuren und Peptiden außer Prolin in N-terminaler Position, und tertiäre aliphatische oder aromatische, verzweigte oder heterocyclische substituierte und unsubstituierte Amine (wie z. B. Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin, Pyridine oder Sarcosin, N-Methylalanin, Aziridincarbonsäure, Azetidincarbonsäure, Dehydroprolin, N-Methylprolin, Aminobenzoesäure, Nicotinsäure, Isonicotinsäure, Chinolinsäure, die ebenfalls an ihren Carboxylfunktionen durch Peptide oder Schutzgruppen verlängert sein können, wobei  $R_2$  positiv geladen sein kann, sowie  $X_n$ ,  $n = 1$  im Falle positiv geladener Reste  $R_2$  für  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $J^-$ ,  $CF_3COO^-$ ,  $BF_4^-$ ,  $N_3^-$  und andere negativ geladene Ionen steht.

2. Verfahren zur Beeinflussung der Aktivität von Enzymen, die im Zuge ihrer katalytischen Einwirkung auf Substrate Esterbindungen und Peptidbindungen spalten, isomerisieren sowie knüpfen können, **gekennzeichnet durch die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I als Inhibitor des jeweiligen Zielenzyms.**
3. Verfahren zur Herstellung diagnostisch, therapeutisch und pharmakologisch einsetzbarer Inhibitoren für Enzyme, **dadurch gekennzeichnet, daß ihre Darstellung ausgehend von  $R_1-CO-CH_2-Y$ , wenn Y gleich Cl, Br, bzw. J ist, vorzugsweise durch Einführung der substituierten Aminofunktion ( $R_2$ ) durch die Zugabe von primärem, sekundärem, tertiärem Amins, substituierten Pyridins oder eines basischen stickstoffhaltigen Heterocyclen in Aceton bei Raumtemperatur oder wenn Y gleich  $N_2$  ist, durch Versetzen des Ammoniumsalzes der Diazoverbindung in absolutem Ethanol unter Rückfluß erhitzt wird, zum gewünschten Peptidylammonium- (bzw. amino-) methylketon der allgemeinen Formel I erfolgt.**
4. Verfahren zur Herstellung neuer, reversibel wirkender Inhibitoren für Enzyme nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch, daß diese oder pharmazeutisch formulierte Komplexe zur hochaffinen, reversiblen Hemmung der katalytischen Aktivität von Enzymen in ihrer gereinigten Form oder in normalen und pathologisch veränderten Körperflüssigkeiten, Organen, Geweben, Zellen sowie Zellkulturen menschlicher, tierischer, mikrobieller, viraler Herkunft als Diagnostika, Therapeutika oder Pharmaka zur Anwendung gelangen.**

**Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft die Entwicklung von hochaffinen, reversibel wirkenden Inhibitoren für Enzyme, die im Zuge ihrer katalytischen Einwirkung auf Substrate Esterbindungen und Peptidbindungen spalten, isomerisieren sowie knüpfen können. Neben Proteasen die in extensive, unspezifische Proteolyse einbezogen sind, was letztlich den Abbau von Proteinen zu Aminosäuren bewirkt, kennt man regulatorische Proteasen, die an der Funktionalisierung von endogenen Peptidwirkstoffen beteiligt sind (KIRSCHKE, H., LANGNER, J., RIEMANN, S., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S. and P. BOHLEY, *Lysosomal cysteine proteases. Excerpta Medica [Ciba Foundation Symposium 75]*, 15 [1980]; KRÄUSSLICH, H.-G., and E. WIMMER, *Viral Proteinases. Ann. Rev. Biochem.* 57, 701 [1987]). Insbesondere im Zusammenhang mit der Neuropeptidforschung sind vor kurzem eine Reihe solcher sogenannten Konvertasen, Signalpeptidasen oder Enkephalinasen entdeckt worden (GOMEZ, S., GLUSCHANKOF, P., LEPAGE, A., MARRAKCHI, N., and P. COHEN, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5468 [1988]).

Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäure Prolin in einer Vielzahl von Peptidhormonen wird für prolin-spezifische Peptidasen eine den Signalpeptidasen analoge Funktion diskutiert (YARON, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of Biologically Active Peptides. *Biopolymers* 26, 215 [1987]; WALTER, R., SIMMONS, W. H., and T. YOSHIMOTO, Proline Specific Endo- and Exopeptidases. *Mol. Cell. Biochem.* 30, 111 [1980]).

Dabei hat die Aminosäure Prolin in diesen Peptiden zwei Funktionen: Sie bestimmt durch ihre besondere Struktur die Konformation der Peptide, und sie schützt diese Peptide vor Abbau durch unspezifische Proteasen (KESSLER, H., Konformation und biologische Wirkung von cyclischen Peptiden. *Angew. Chem.* 94, 509 [1982]). Insbesondere für die nach dem Prolin spaltenden Peptidasen Prolyl Endopeptidase (PSE oder PPCE) und Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) konnten Beziehungen zwischen natürlichen Substraten und selektiver Spaltung wahrscheinlich gemacht werden, u. a. durch:

- Aktivierung von Substanz P und DP IV
- Metabolismus von TRH durch PSE und DP IV
- Konvertierung von Promellitin zu Mellitin
- Funktionalisierung des Hefe-Pheromon  $\alpha$ -Faktors
- Inaktivierung der  $\alpha$ -Fibrinkette durch DP IV
- Metabolisierung der  $\beta$ -Casomorphine durch PSE und DP IV.

Inhibitoren derartiger Enzyme dienen dazu, deren unerwünschte Aktivität in verschiedenen pathologischen Zuständen, bei Fermentationsprozessen in der Lebensmittelindustrie, unter Laborbedingungen wirksam zu unterdrücken.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen wirken u. a. auf die Aktivität von Peptidhydrolasen (Proteasen, Proteinasen, Peptidasen), Lipasen, Esterasen, Synthetasen, Transacylasen, Isomerasen, die sowohl kovalente als auch nichtkovalente Zwischenprodukte mit ihren Substraten während der Katalyse bilden und zur Ausprägung ihrer Aktivität katalytisch aktive Serin-, Cystein- oder Asparatreste enthalten oder mit Hilfe von Metallionen katalytisch wirksam sind.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind zur Anwendung als Pharmaka bei der Therapie verschiedener Erkrankungen in der Humanmedizin, Veterinärmedizin, Pharmakologie, als Feinchemikalien in der Biotechnologie, Biochemie, Immunbiochemie, Molekularbiologie, Genetik, Pharmazie, Lebensmittelindustrie und für die pharmazeutische Industrie geeignet.

#### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die selektive Hemmung von Enzymen (insbesondere von Peptidhydrolasen) zu therapeutischen, wissenschaftlichen und technischen Zwecken gelingt bisher insbesondere durch den Einsatz reversibler natürlicher Inhibitoren, die durch langwierige Verfahren aus mikrobiellem, tierischem und pflanzlichem Material isoliert werden müssen (KATUNUMA, N., H. UMEZAWA and H. HOLZER, Hrsg., *Proteinase Inhibitors*. Springer-Verlag, Berlin [1983]), sowie durch synthetische Substanzen, wie z. B. durch Statinpeptide, Haloenollactone, Peptidboronsäuren und Peptidaldehyde (SANDLER, M., and H. J. SMITH, Hrsg., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press, Oxford [1989]).

Um eine selektive Inhibierung zu erreichen, müssen oft sehr aufwendige synthetische Verfahren zur Anwendung gebracht werden. So erfolgt die Synthese eines immunsuppressiv wirksamen Inhibitors des Cyclophilins durch verlustreiche Kondensation von vier Struktursegmenten zu einem 23gliedrigen Ringsystem (STINSON, S., *Chem. Eng. News.* 67, 6, 29 [1989]). Andererseits besitzen verschiedene Inhibitoren, wie Peptidylhalomethylketone, Peptidaldehyde, Peptidyl-N-Nitrosamide aktivierte Carbonyl- bzw. Methylengruppen, die die Stabilität der Verbindungen in biologischem Material stark einschränken und darüber hinaus unspezifisch u. a. sehr mutagen wirken (Methode in *Enzymology*, Bd. XLVI, Academic Press, New York [1977]; FITTKAU, S., JAHREIS, G., PETERS, K., and L. BALSPIRI, *J. Prakt. Chem.* 328, 529 [1986]).

Daraufhin wurde von uns ein leicht anwendbares, robustes Verfahren entwickelt, das zur spezifischen Hemmung der katalytischen Aktivität von Peptidhydrolasen führt, die während ihrer Funktion keine C-terminal freien Carboxylgruppen im Substrat benötigen und katalytisch wirksame Serin- oder Cysteinreste enthalten (FISCHER, G., DEMUTH, H.-U., and A. Barth, A., DD 158 109 [1982]).

Mit Verbindungen vom Typ der Diacyl Hydroxylamine gelingt die selektive Inhibierung von Serin- und Cysteinproteasen (DEMUTH, H.-U., *Recent Developments in Inhibiting Cysteine and Serine Proteases*, *J. Enzyme Inhibition*, 3, 249 [1990]). Dabei ist die Inhibierung prolin-spezifischer Enzyme vergleichbar unzureichend (DEMUTH H.-U., NEUMANN, U., and A. Barth, *J. Enzyme Inhibition*, 2, 239 [1989]).

Bei diesen Enzymen gelingt eine erfolgreiche Kontrolle der Enzymaktivität durch reversible Inhibitoren, die u. a. allerdings Aldehydgruppen enthalten, die als unspezifisch reaktiv bekannt sind (TSURU, D., YOSHIMOTO, T., KORIYAMA, N., and S. FURUKAWA, *Thiazolidine Derivatives as Potent Inhibitors Specific for Prolyl Endopeptidase*. *J. Biochem. [Tokyo]* 104, 580 [1988]).

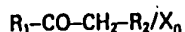
#### Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, hochwirksame, reversible Inhibitoren für die Hemmung der Aktivität von Enzymen (vorzugsweise Proteinasen, Peptidasen, Isomerasen, Esterasen, Synthetasen, Transacylasen) auf der Base von N-substituierten Peptidylammonium- (bzw. amino-) methylketonen zur Verfügung zu stellen, die sich als leicht herstellbare, hydrolytisch sehr stabile, hochwirksame und selektiv wirkende Substanzen durch Variation sowohl des Peptidylrestes als auch der N-substituierten Gruppierungen zweckgebunden, zur graduellen Abstufung ihrer Stabilität, Applizierbarkeit, Bioverfügbarkeit und inhibitorischen Potenz insbesondere in der medizinischen Therapie und Diagnose einsetzen lassen.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue reversible Inhibitoren für Enzyme (insbesondere Peptidhydrolasen) vom Typ der N-substituierten Peptidylammonium- (bzw. amino-) methylketone zu entwickeln, die sich leicht herstellen lassen und durch folgende Vorteile auszeichnen:

1. Einfache Molekülstruktur
2. Leichte synthetische und damit billige Zugänglichkeit
3. Fähigkeit durch einfachste Strukturvariationen hohe Selektivität zu erzielen
4. Fähigkeit durch geeignete Wahl der Substituenten
  - a) die Lebensdauer der Verbindungen
  - b) die Bioverfügbarkeit der Verbindungen
  - c) die Transportierbarkeit der Verbindungen
 zu beeinflussen
5. Universellere Anwendbarkeit auf verschiedene Enzymklassen, nicht nur auf Proteasen, die Cystein- und Serinreste zur Katalyse benötigen.
6. Fähigkeiten durch bestimmte N- und C-terminale Peptidsequenzen bzw. andere Reste eine sehr hohe Spezifität zu erreichen. Diese Eigenschaften werden erfindungsgemäß durch Verbindungen (bzw. Salze) der allgemeinen Formel I



erfüllt, wobei der Rest  $R_1-CO$  steht für:

- $\alpha$ -Aminosäure- oder N-geschützte  $\alpha$ -Aminosäurereste
- N-geschützten Peptidylrest oder N-ungeschützten Peptidylrest, wobei diese N-Schutzgruppen Alkoxycarbonyl, Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbonyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen bzw. gemeinsam mit dem Stickstoffatom gebildete cyclische Amide darstellen können

$R_2$  steht für:

- aliphatische, verzweigte, aromatische sowie aromatische und substituierte und heterocyclische Acylreste wie Aralkoxycarbonyl, Alkanoyl, Cycloalkylcarbonyl, Aralkanoyl, Aroyl, Heterocyclcarbonyl, Alkylsulphonyl, Arylsulphonyl, Monoaralkylcarbonyl, Cinnamoyl,  $\alpha$ -Aralkoxycarbonylaminoalkanoyl Gruppierungen
- primäre oder sekundäre Amine (einschließlich von C-terminal geschützten und ungeschützten Aminosäuren) Peptiden (außer Prolin in N-terminaler Position) und tertiäre aliphatische oder aromatische, verzweigte oder heterocyclische substituierte und unsubstituierte Amine (wie z. B. Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin, Pyridine oder z. B. Sarcosin, N-Methylalanin, Aziridincarbonsäure, Azetidincarbonsäure, Dehydroprolin, N-Methylprolin, Aminobenzoesäure, Pyridin, Nicotinsäure, Isonicotinsäure, Chinolinsäure, die ebenfalls an ihren Carboxylfunktionen durch Peptide oder Schutzgruppen verlängert sein können)
- er kann positiv geladen sein

$X_n$  ( $n = 1$ , im Falle positiv geladener Reste  $R_2$ ) steht für:

- $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $J^-$ ,  $CF_3COO^-$ ,  $BF_4^-$ ,  $N_3^-$  und andere negativ geladene Ionen.

In wäßrigen Lösungen (wie z. B. biologischen Flüssigkeiten) besitzen diese Verbindungen aufgrund der quartären Stickstoffstruktur wenn  $R_2$  ein tertiäres Amin ist (bzw. wenn  $R_2$  ein sekundäres oder primäres Amin ist, wegen des für diese Amine relativ hohen  $pK_a$ -Wertes) eine positive Ladung am Stickstoffatom, die durch Elektronenzug über die Methylengruppe die Carbonylaktivität der Ketogruppe erhöht, wodurch die Wechselwirkungen zwischen katalytischen Gruppen des Zielenzym (und damit die Affinität zwischen Inhibitor und Enzym) verstärkt werden.

Bei der Einwirkung der wäßrigen Lösung eines Stoffes der allgemeinen Formel I mit solchen Resten  $R_1$  und  $R_2$ , die von dem betreffenden Zielenzym als substratanaloge Strukturen erkannt werden, auf das betreffende, im isolierten Zustand oder in biologischem Material befindliche Enzym, wird eine zeitabhängige Inhibierung der Enzymaktivität unter Bedingungen erzielt, die für die übliche Wirkungsausprägung der Enzymaktivität charakteristisch sind und dabei von der Inhibitorkonzentration und der Struktur der Reste  $R_1$  und  $R_2$  abhängig ist.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen entfalten ihre Wirkungen derart, daß nach diffusionskontrollierter Bindung der Inhibitoren an das Zielenzym eine Konformationsänderung des Enzyminhibitorcomplexes unter Ausbildung veränderter, wesentlich stabilerer Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor erfolgt und nur eine sehr geringe Restaktivität erhalten bleibt.

Diesen Typ der Inhibierung bezeichnet man als slow-binding Inhibierung (SCULLEY, M. J., and J. F. MORRISON, Biochem. Biophys. Acta 874, 44 [1986]).

Inhibitoren der allgemeinen Formel zeichnen sich durch hohe Abbaustabilität in wäßrigen Lösungen aus. Weder Inkubation in wäßriger Pufferlösung bei 30°C noch Inkubation von Inhibitor mit Enzym ließ nach 24 h eine Strukturveränderung des Inhibitors (enzymatisch oder nichtenzymatisch) im Vergleich mit frisch bereiteter Inhibitorlösung erkennen (HPLC). Dabei kommen folgende neue Syntheseverfahren zur Anwendung:

#### 1. Variante

Die Darstellung der entsprechenden Ammonium-, bzw. Aminomethylketonen erfolgt aus den analogen Methylketonen der allgemeinen Formel  $R_1-CO-CH_2-Y$  ( $Y = Cl, Br, J$ ) unter Zugabe von primärem, sekundärem, tertiärem Amins, substituierten Pyridins oder eines basischen stickstoffhaltigen Heterocyclen (Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie Stickstoffverbindungen II und III, „Quartäre Ammoniumverbindungen“ Band XI/2, Müller, E., Hrsg., Georg Thieme Verlag Stuttgart [1958]). Die nötigen synthetischen Operationen für die Bereitstellung des Restes  $R_1-CO-CH_2-Y$  erfolgt nach den dafür üblichen peptidchemischen Methoden (WÜNSCH, E., Synthese von Peptiden, Houben-Weyl, Band 15/I, Methoden der organischen Chemie, Müller, E., Hrsg., Georg Thieme Verlag Stuttgart [1974]; FITTKAU, S., JAHREIS, G., PETERS, K., and L. BALSPIRI, J. Prakt. Chem. 328, 529 [1986]).

#### 2. Variante

Der azide Wasserstoff einer nichtquartären Ammoniumgruppe läßt sich mit Hilfe aliphatischer Diazoverbindungen gegen Alkylreste austauschen. Vergleiche die Phenacylierung von Pyridin und ähnlichen Heterocyclen zu Diazoacetophenon (KING, L. C., and F. M. MILLER, J. Am. Chem. Soc. 70, 4145 [1958]). Dabei wird das Ammoniumsalz mit der Diazoverbindung in absolutem Ethanol eine Stunde unter Rückfluß erhitzt, danach etwas Wasser zugesetzt und der Reaktionsansatz mit Aktivkohle entfärbt.

Das sich beim Abkühlen der Lösung absetzende Produkt wird aus einem geeigneten Lösungsmittel kristallisiert. Die nötigen synthetischen Operationen für die Bereitstellung des Restes  $R_1-CO-CH=N_2$  erfolgt ebenfalls nach den dafür üblichen peptidchemischen Methoden (WÜNSCH, E., Synthese von Peptiden, Houben-Weyl, Band 15/T, Methoden der organischen Chemie, Müller, E., Hrsg., Georg Thieme Verlag Stuttgart [1974]; FITTKAU, S., JAHREIS, G., PETERS, K., and L. BALSPIRI, J. Prakt. Chem. 328, 529 [1986]).

Die erfindungsgemäß erhaltenen Peptidylammonium- (bzw. amino-) methylketone entsprechend der allgemeinen Formel I oder deren pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexe können als Inhibitoren zur Hemmung der katalytischen Aktivität von Enzymen wie Proteinasen, Peptidasen, Lipasen, Esterasen, Synthetasen, Transacylasen, Isomerasen in deren gereinigter Form als auch in normalen und pathologisch veränderten menschlichen oder tierischen Körperflüssigkeiten, Organen und Geweben sowie Zellen und Zellkulturen, viraler, mikrobieller, tierischer oder pflanzlicher Herkunft sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmen und damit als hochwirksame Diagnostika, Cytostatika, Immunsuppressiva, Anti-Tumorpharmaka, antivirale Pharmaka, Anti-HIV-1-Pharmaka bzw. generell als Therapeutika bei Stoffwechsel- oder Regulationsprozessen zum Einsatz kommen, bei denen unerwünschte Aktivität oben näher spezifizierter Enzyme pathologische Veränderungen im jeweiligen Organismus induzieren.

Beispielsweise reduziert die orale als auch die intraperitoneale Gabe von Inhibitoren der Prolylendopeptidase an Ratten und Mäuse die Enzymaktivität im Gehirn der Versuchstiere. Bei Tieren in denen künstliche Amnesie mittels Scopolamin erzeugt wird, kann dieser Zustand durch orale Verabreichung von Inhibitoren wieder aufgehoben werden (YOSHIMOTO, T., KADOI, K., MATSUBARA, F., KORIYAMA, N., KANETO, H., and D. TSURU, Specific Inhibitors for Prolyl Endopeptidase and their Anti-Amnesic Effect. J. Pharmacobiodyn. 10, 730-735 [1987]; TSURU, D., YOSHIMOTO, T., KORIYAMA, N., and S. FURUKAWA, Thiazolidine Derivatives as Potent Inhibitors Specific for Prolyl Endopeptidase, J. Biochem. [Tokyo] 104, 580-586 [1988]; HIGUSHI, N., SAITO, M., HASHIMOTO, M., FUKAMI, J., and T. TANAKA, Preparation of Pyrrolidine Amide Derivatives as PSE Inhibitors for the Treatment of Amnesia. Chem. Abs. 107 [17]: 154236w [1987]).

#### Ausführungsbispiele

##### Beispiel 1

Die in den Beispielen 3 und 4 verwendeten Inhibitoren wurden nach folgender allgemeiner Vorschrift dargestellt.

Z-Phe-Ala-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Cl<sup>-</sup>, MW: 461,99

2,3g Z-Phe-Ala-Chlormethylketon (5,7 mmol) werden in 10 ml absolutem Aceton gelöst und auf -40°C abgekühlt. Dazu gibt man ca. 1 ml (11,9 mmol) ebenfalls auf -40°C abgekühltes wasserfreies Trimethylamin.

Das Reaktionsgefäß wird luftdicht verschlossen und bei Raumtemperatur 3 Tage unter gelegentlichem Schütteln stehen gelassen. Danach wird das Lösungsmittel sowie nicht umgesetztes Trimethylamin im Vakuum abgetrennt. Der Rückstand wird in Chloroform/Methanol (9:1, v/v) aufgenommen und an Kieselgel 60 getrennt. Man eluiert zu Beginn mit demselben Lösungsmittelgemisch, nach Abtrennen unpolarer Nebenprodukte eluiert man das Produkt mit reinem Methanol. Das weiße, hygroskopische Produkt enthält noch Trimethylamin (NMR). Deshalb muß das Rohprodukt an Sephadex G 10 in H<sub>2</sub>O oder an Sephadex LH20 in Methanol rechromatographiert werden.

Das Endprodukt wird zur Aufbewahrung lyophilisiert. Ausbeute: 1,2g (2,6 mmol) = 46,6% der Theorie.

Die weiße, hygroskopische Verbindung ist hervorragend wasserlöslich. TLC an Kieselgelplatten (n-Butanol, H<sub>2</sub>O, Essig),

Essigester: 1/1/1/1) R<sub>f</sub> = 0,61

FAB-MS: 427,2 (M + 1)

RP-HPLC (TSK Ultrapak 3000): Gradient H<sub>2</sub>O/Acetonitril 15-85 in 35 min

Flußgeschwindigkeit 0,5 ml/min, t<sub>R</sub> = 21 min 30s

Drehwert: +58,8, c = 1 (Methanol)

##### Beispiel 2

Z-Pro-Pro-CH<sub>2</sub>-Pyrrolidinium<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup>, MW: 457,91

1g Z-Pro-Pro-CH<sub>2</sub>-Cl (2,64 mmol) werden in 10 ml Aceton gelöst. Dazu gibt man 0,5 ml Pyridin und läßt die Reaktionsmischung 3 Tage bei Raumtemperatur stehen. Lösungsmittel und nicht umgesetztes Pyridin werden im Vakuum abgetrennt und der Reaktionsansatz in Essigester/Wasser aufgenommen. Der Essigester wird 3mal mit H<sub>2</sub>O extrahiert. Die wäßrige Phase wird zweimal mit Essigester reextrahiert. Die wäßrige Phase wird im Vakuum eingeeengt, lyophilisiert und an Sephadex G 10 bzw. Sephadex LH20 (vergl. Beispiel 1) chromatographiert.

##### Beispiel 3

Prolylendopeptidase (aus *Flavobacterium meningosepticum*) wurde unter Verwendung von Z-Phe-Ala-Ci<sub>1</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> reversibel gehemmt.

Die Reaktionslösung enthielt 40 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,6 (Ionenstärke = 0,125; eingestellt mit KCl) und 0,501 mM Gly-Pro-Pro-pNA als Substrat.

Die Inhibitorkonzentration wurde im Bereich von 37 µM bis 1,1 mM variiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym (9,9 nM) zum Reaktionsgemisch gestartet und bei 30°C durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 2,55 ml.

Durch die zeitabhängige Inhibierung des Enzyms nimmt graduell seine Aktivität gegenüber dem im Meßansatz befindlichen Substrat ab. Dabei verringert sich die enzymatische Freisetzung an p-Nitroanilin, dessen zeitabhängige Konzentrationsänderung spektralphotometrisch verfolgt werden kann. Die dabei gewonnenen Daten (Extinktions-Zeit-Wertepaare) wurden der numerischen Analyse zugeführt und entsprechend einem Modell für slow-binding-inhibition ausgewertet (MORRISON, J. F. and WALSH, Adv. Enzymol. 61, 201 [1988]).

Dabei wurde unter den obigen Bedingungen ein Gesamt-K<sub>i</sub>-Wert von 70 µM ermittelt.

Die Halbwertszeit der Inhibitoranlagerung beträgt 6 min.

**Beispiel 4**

Prolylendopeptidase (aus *Flavobacterium meningosepticum*) wurde unter Verwendung von Z-Pro-Pro-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> analog Beispiel 3 reversibel gehemmt.

Dabei wurde die Inhibitorkonzentration im Bereich von 1,2 µM bis 25 µM variiert. Die Enzymkonzentration betrug 9,9 nM und die Substratkonzentration 0,501 mM.

Dabei wurde ein Gesamt-KI-Wert von 68 nM ermittelt.

Die Halbwertszeit der Inhibitoranlagerung beträgt 1,9 min.

Verlängerte Inkubation von Enzym und Inhibitor (12 Stunden) veränderten das RP-HPLC Chromatogramm unter folgenden Bedingungen nicht: Säule RP-8, HP; Eluent Acetonitril/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 M) 45/55 (v/v); Elutionsgeschwindigkeit 0,6 ml/min; homogener Peak nach 7 min 10 sec.

**Beispiel 5**

Prolylendopeptidase (aus *Flavobacterium meningosepticum*) wurde unter Verwendung von Z-Pro-Pro-CH<sub>2</sub>-Pyridinium<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> analog Beispiel 3 und 4 reversibel gehemmt.

Dabei wurde die Inhibitorkonzentration im Bereich von 0,1 µM bis 1,5 µM variiert. Die Enzymkonzentration betrug 9,9 nM und die Substratkonzentration 1,40 nM.

Dabei wurde ein Gesamt-KI-Wert von 2 nM ermittelt.

Die Halbwertszeit der Inhibitorbindung beträgt 3 min.