(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

Ausschliessungspatent

ISSN 0433-6461

(11) 1594 26

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes zum Patentgesetz

Int.Cl.³ 3(51) C 07 C 103/52
C 07 D207/16
C 07 D207/22
C 07 D277/06
C 07 D403/12
C 07 D417/12

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 07 C/ 2305 741
(31) 156749

(22) 04.06.81
(32) 05.06.80

(44) 09.03.83
(33) US

(71) siehe (73)
(72) RYAN, JAMES W.,DR.;CHUNG, ALFRED;US;
(73) THE UNIVERSITY OF MIAMI, FLORIDA;US;
(74) IPB (INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN), 1020 BERLIN, WALLSTRASSE 23/24

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES INHIBITORS FUER DAS ANGIOTENSIN UMWANDELNDE ENZYM

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen eines Inhibitors für das Angiotensin umwandelnde Enzym. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines neuen Inhibitors, der für alle Patienten, unabhängig von der Verabreichungsform und ohne Nebenwirkungen zu verursachen, angewandt werden kann. Erfindungsgemäß werden basische Salze von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) hergestellt, worin

R für Wasserstoff, Formyl, Acetyl, Propanoyl, Butanoyl, Phenylacetyl, Phenylpropanoyl, Benzoyl, Cyclopentancarbonyl, tert-Butyloxycarbonyl, Cyclopentancarbonyl-L-lysyl, Pyro-L-glutamyl-L-lysyl, L-Lysyl, L-Arginyl oder Pyro-L-glutamyl steht,

A Phenylalanyl, Glycyl, Alanyl, Tryptophyl, Tyrosyl, Isoleucyl, Leucyl, Histidyl oder Valyl bedeutet und hierbei die α-Aminogruppe dieser Reste an den Rest R in Amidbindung geknüpft ist,

R_1 Wasserstoff oder Methyl darstellt,

R_2 für L-Prolin, L-3,4-Dehydroprolin, D,L-3,4-Dehydroprolin, L-3-Hydroxyprolin, L-4-Hydroxyprolin, L-Thiazolidin-4-carbonsäure oder L-5-Oxo-prolin steht und hierbei die Iminogruppe dieser Reste in Imidbindung an die benachbarte Gruppe

geknüpft ist und

n Null oder 1 bedeutet, wobei falls n gleich ist Null, R_1 für Methyl steht. Formel I

Berlin, den 17.11.81
59 298 12
AP C07C/230 574/1

Herstellungsverfahren für einen Inhibitor für Angiotensin umwandelndes Enzym

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen eines Inhibitors für das Angiotensin umwandelnde Enzym.

Die erfindungsgemäß hergestellte Verbindung wird angewandt als Arzneimittel, insbesondere als antihypertensiv wirkendes Mittel zur Behandlung von Bluthochdruck.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Das Angiotensin umwandelnde Enzym, eine im folgenden als ACE bezeichnete Peptidyldipeptidhydrolase, spielt in der Physiologie der Hypertension eine zentrale Rolle und ist in der Lage, das die Aminosäuresequenz

AspArgValTyrIleHisProPheHis Leu

besitzende Decapepdid Angiotensin I durch Abspalten des eine endständige Carboxygruppe aufweisenden Restes HisLeu in das Octapepdid Angiotensin II überzuführen. Im folgenden werden für die Reste verschiedener Aminosäuren und für andere Verbindungen folgende Symbole verwendet:

Ala = L-Alanin
Arg = L-Arginin
Asp = L-Asparaginsäure
Boc = t-Butyloxycarbonyl
Glu = Glutaminsäure
<Glu = pyro-L-Glutaminsäure (L-5-Oxo-prolin)
Gly = Glycin
Hip = Hippursäure (Benzoylglycin)
His = L-Histidin

Ile = L-Isoleucin
Leu = L-Leucin
Phe = L-Phenylalanin
Pro = L-Prolin
ΔPro = L-3,4-Dehydroprolin
Ser = L-Serin
Trp = L-Tryptophan
Tyr = L-Tyrosin
Val = L-Valin
ACE = Angiotensin umwandelndes Enzym
Hepes = N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure

Angiotensin I entsteht unter der Einwirkung des Enzyms Renin, einer in Nieren oder anderen Körpergeweben und in Plasma anzutreffenden Endopeptidase, auf im Blutserum enthaltenes α-2-Globulin.

Der Blutdruck wird durch gewisse im Blut enthaltene Peptide beeinflußt. Eines dieser Peptide, das Angiotensin II, ist ein stark wirksamer Pressor, also ein den Blutdruck steigernder Stoff. Das die Aminosäuresequenz ArgProProGlyPheSerProPheArg aufweisende Nonapeptid Bradykinin ist ein stark wirksamer Depressor, also ein den Blutdruck erniedrigender Stoff. Zusätzlich zur direkten Pressorwirkung besitzt das Angiotensin II auch eine die Ausschüttung von Aldosteron steigernde Wirkung, wobei durch das Aldosteron ebenfalls der Druck erhöht wird, da Aldosteron extracelluläre Salze und Flüssigkeiten zurückhält. Angiotensin II ist im Blut normaler Menschen in meßbaren Mengen feststellbar und ist im Blut von renale Hypertension zeigenden Patienten in erhöhten Konzentrationen enthalten.

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

Die Aktivität des ACE ist sowohl im normalen Menschen als auch in an überhöhten Blutdruck leidenden Menschen, in der Regel in einer größeren Menge enthalten, als sie zum Aufrechterhalten der beobachteten Pegel an Angiotensin II erforderlich ist. Es wurde jedoch gefunden, daß bei an überhöhtem Blutdruck leidenden Patienten durch Behandeln derselben mit ACE-Inhibitoren der Blutdruck stark abgesenkt werden kann /Gavras, I., et al., New Engl. J. Med. 291, 817 (1974)/.

ACE ist eine Pepdidyldipeptidhydrolase und katalysiert die Hydrolyse der vorletzten Peptidbindung am C-terminellen Ende verschiedener acylierter Tripeptide und größerer, eine nicht blockierte α-Carboxygruppe aufweisender Polypeptide. Unter der Wirkung des ACE wird die vorletzte Peptidbindung am carboxy-terminellen Ende hydrolytisch abgespalten, wobei als Reaktionsprodukte ein Dipeptid und der entsprechende Rest des ursprünglichen Peptids erhalten wird.

Die Reaktionsfähigkeit des Enzyms hängt stark vom Substrat ab. Zumindest eine der vom Stickstoff des Prolins gebildeten Peptidbindungen wird überhaupt nicht hydrolysiert. Offensichtlich schwankt die Michaelis-Konstante (K_m) vom Substrat zu Substrat über mehrere Größenordnungen. Allgemeine Angaben über kinetische Parameter von durch Enzyme katalysierten Reaktionen sind in Lehninger, A., Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York, 1970, Seiten 153-157, angegeben. Zahlreiche der als Inhibitoren für die enzymatische Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II bezeichneten Peptide sind letzten Endes nur Substrate mit einem niedrigeren Wert für K_m als Angiotensin I und sind daher zutreffender als konkurrenzierende Substrate zu be-

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

zeichnen. Beispiele für solche konkurrenzierende Substrate sind unter anderem Bradykinin und das auch als SQ20475 bezeichnete und die Aminosäuresequenz <GluLysTrpAlaPro besitzende Peptid BPP_{5a}.

Ondetti hat in der US-PS 3 832 337 zahlreiche als ACE-Inhibitoren brauchbare synthetische Peptidderivate angegeben.

Die Rolle des ACE in der Pathogenese der Hypertension hat dazu geführt, nach Inhibitoren für dieses Enzym zu suchen, die als antihypertensiv wirkende Stoffe brauchbar sind (siehe beispielsweise US-PSen 3 891 616, 3 947 575, 4 052 511 und 4 053 651). Ein äußerst stark wirksamer und bei oraler Verabreichung eine hohe biologische Wirkung entfaltender Inhibitor ist das in der US-PS 4 046 889 angegebene und mit SQ14225 bezeichnete D-3-Mercapto-2-methylpropanoyl-L-prolin, welches auch von Cushman, D.W. et al., in Biochemistry 16, 5484 (1977), und von Ondetti, M. et al., in Science 196, 441 (1977) beschrieben wird und einen I_{50}-Wert von $2,3.10^{-8}$ molar besitzt. Der von Cushman et al. in der oben erwähnten Literaturstelle angegebene I_{50}-Wert stellt jene Inhibitorkonzentration dar, welche erforderlich ist, in einem das Substrat in einer wesentlich oberhalb K_m liegenden Konzentration enthaltenden normierten Versuchssystem das Enzym zu 50 % zu inhibieren. Die erhaltenen I_{50}-Werte sind dann direkt miteinander vergleichbar, wenn alle die Reaktion beeinflussenden wesentlichen Faktoren wie die Enzymquelle und ihre Reinheit, das verwendete Substrat und dessen Konzentration und die Zusammensetzung des beim Versuchssystem verwendeten Puffers konstant sind. Alle im folgenden angegebenen Werte für I_{50} wurden im gleichen

Versuchssystem und unter Verwendung des gleichen Enzyms (ACE aus menschlichem Urin) und bei einer etwa 1/2 K_m liegenden Konzentration des Substrats durchgeführt und sind deshalb unmittelbar miteinander vergleichbar, wenn auch Abweichungen von durch andere Autoren angegebenen Daten möglich sind. Derartige Abweichungen sind aus unbekannten Gründen in der Literatur feststellbar, wie sich beispielsweise aus den von Cushman, D.W., et al., in Experientia 29, 1032 (1973) und den von Dorer, F.E., et al., in Biochim. Biophys. Acta 429, 220 (1976) angegebenen Werte für I_{50} des BPP_{9n} ergibt.

Der Wirkungsmechanismus von SQ14225 wurde auf ein in Analogie zum besser bekannten verwandten Enzym Carboxypeptidase A entwickeltes Modell des Wirkungszentrums von ACE gegründet. Es wurde angenommen, daß dieses Wirkungszentrum einen die endständige Carboxygruppe des Substrats bindenden kationischen Bereich und eine Tasche oder Spalte aufweist, welche die Seitenkette der C-terminellen Aminosäure bindet und den heterocyclischen Ring des endständigen Prolinrestes besonders stark bindet. Eine ähnliche Tasche oder Spalte wurde auch für den vorletzten Aminosäurerest vorausgesetzt, wobei auf Grund von veröffentlichten Daten eine ziemlich strenge sterische Forderung erfüllt sein müßte, da die D-form des Inhibitors wesentlich stärker wirksam ist als dessen Stereoisomer oder dessen 3-Methylderivat und unsubstituierter Analoga. Die im Inhibitor vorliegende und mutmaßlich an das nahe dem katalytisch wirkenden Zentrum gelegene aktive Zentrum gelegene Sulfhydrylgruppe spielt bei der Inaktivierung des Enzyms durch den bekanntermaßen für die katalytische Wirkung wesentlichen Zinkrest eine zentrale Rolle. Am Sulfhydrylrest vorhandene

Substituenten wie eine Methylgruppe oder eine S-Acetylgruppe verringerten die Wirksamkeit des Inhibitors beträchtlich (vgl. Cushman, D.W., et al., Biochemistry, oben).

In vitro durchgeführte Untersuchungen über den Reaktionsmechanismus, über welchen SQ14225 und dessen Analoga das ACE inhibieren, wurden durch die Instabilität dieser Moleküle unter Umgebungsbedingungen etwas gestört. Beispielsweise wurde festgestellt, daß eine frisch bereitete wäßrige Lösung von SQ14225, welche beispielsweise 1 mg dieser Verbindung pro ml enthält, bei einem pH-Wert von etwa 8 beim Stehenlassen während 30 Minuten stark an Aktivität verliert und daß die Aktivität dieser Lösung bei noch längerem Stehenlassen weiterhin absinkt. Es wird angenommen, daß dieser Aktivitätsverlust hauptsächlich auf eine Dimerisierung des SQ14225 an den endständigen Sulfhydrylgruppen zurückzuführen ist und hierbei ein als Inhibitor weitgehend unwirksames Disulfid entsteht. Da die freie Sulfhydrylgruppe stark reaktionsfähig ist und leicht zu polaren Säureresten wie einer Sulfongruppe oder einer Sulfoxidgruppe oxydiert werden kann, kann der in vitro zu beobachtende Aktivitätsverlust von wäßrigen Lösungen des SQ14225 während des Stehenlassens zum gewissen Teil als Folge zumindest einer derartigen Oxydationsreaktion angesehen werden, im Zuge derselben ein als Inhibitor für ACE im wesentlichen unwirksames Sulfon oder Sulfoxid entsteht.

Derzeit zur Verfügung stehende klinische Versuchsberichte über SQ14225, welches in einigen solcher Berichte unter dem Namen "Captopril" aufscheint, geben Grund zu der Annahme, daß dieser Stoff im normalen Magen- und Darmtrakt der

meisten Patienten hinreichend stabil ist, um bei oraler Verabreichung als Inhibitor für ACE wirksam zu sein. Es ist jedoch noch nicht klar, ob SQ14225 bei einigen Patienten im wesentlichen unwirksam bleibt. Wegen der hohen Reaktionsfähigkeit der freien Sulfhydrylgruppen kann SQ14225 ohne weiteres mit Serum- oder Zellproteinen oder -peptiden oder mit anderen im Magen- oder Darmtrakt vorliegenden und eine freie Sulfhydrylgruppe aufweisenden Stoffen gemischte Disulfide bilden und zusätzlich auch Dimere im Zuge eines oxydativen Abbaus bilden. Ein durch Reaktion mit einem Protein entstandenes gemischtes Disulfid könnte antigenetisch wirken, und das Entstehen solcher Stoffe ist einigermaßen wahrscheinlich, da gelegentlich bei klinischer Anwendung allergische Reaktionen beobachtet wurden (vgl. Gavras, et al., New England J. Med. 298, 991 (1978). Gegebenenfalls entstandene Disulfide und Abbauprodukte des SQ14225 sind bestenfalls als Inhibitoren größtenteils unwirksam. Es kann daher angenommen werden, daß in Abhängigkeit vom Verabreichungsweg und vom einzelnen Patienten das Ansprechen auf eine verabreichte Dosis an SQ14225 Schwankungen unterliegt. Darüber hinaus können in zumindest einigen Patienten unerwünschte Nebeneffekte und Schwierigkeiten beim Versuch eine wirksame Konzentration an Inhibitor im Körper aufrechtzuerhalten, auftreten.

Thioester werden insofern als äußerst reaktionsfähig angesehen, als die Thioesterbindung leicht gespalten wird und hierbei eine Sulfhydrylverbindung und eine Carbonsäure entsteht. Thioester werden deshalb häufig beim Acylieren unter milden Bedingungen als Zwischenprodukte eingesetzt. Derartige Gruppen, beispielsweise die Acetylthiogruppe, wurden deshalb auch bereits gemäß den US-PSen 3 832 337 und

4 046 889 vorgesehen. Es wird weiterhin angenommen, daß auch bei der Biosynthese von zyklischen Peptiden, z. B. Tyrocidin oder Gramicidin S Thioester als Zwischenprodukte auftreten (vgl. Lipmann, F. in Accounts Chem. Res. 6, 361 (1973).

Thioester, welche ACE stark inhibieren und bei oraler Verabreichung antihypertensiv wirken, sind bereits in der Anmeldung APA 61 K/215.457 beschrieben worden.

Mit der Verbindung SQ14225 verwandte Verbindungen sind bereits in den US-PSen 4 046 889, 4 052 511, 4 053 651, 4 113 715 und 4 154 840 beschrieben. Vom besonderen Interesse sind die statt des 5-gliedrigen heterozyklischen Prolinrings einen 4- oder 6-gliedrigen Ring aufweisenden Analoga der Verbindung SQ14225. Die Inhibitionswirkung solcher Analoga ist jedoch nicht mit jener der Verbindung SQ14225 verglichen. Es wird darüber berichtet, daß durch Austausch des L-Prolins gegen D-Prolin die Inhibitionswirkung von 3-Mercaptopropanoylaminosäuren drastisch verringert wird (Cushman, D.W., et al., oben).

Der sich beim Austauschen des Prolinrestes gegen den Rest des L-3,4-Dehydroprolin ergebende Effekt wurde bereits in verschiedenen Systemen untersucht. Wenn in 7-Stellung des Bradykinins L-3,4-ΔPro eingeführt wird, resultiert ein Bradykininderivat beträchtlich verringerter physiologischer Wirkung (vgl. Fisher, G.H., et al., Arch. Biochem. Biophys. 189, 81 (1978). Andererseits wird beim Einführen von L-3,4-ΔPro in die 3-, 5-, 8- oder 9-Stellung des ACE-Inhibitors BPP_{9a} dessen Inhibitionswirkung erhöht (vgl. Fisher, G.H. et al., FEBS Letters 107, 273 (1979). Die Patentinhaberin hat in der älteren Anmeldung A 5962/79 bereits

angegeben, daß die in dieser Anmeldung beschriebenen und den Rest Δ Pro aufweisende Verbindungen eine hohe Inhibitionswirkung besitzen und auch antihypertensiv wirken, jedoch kann derzeit noch kein Grund dafür angegeben werden, weshalb durch Ersatz des Prolins durch Pro verschiedene Effekte erzielt werden. In ähnlicher Weise besitzt man noch kein klares Bild über den Einfluß von an verschiedenen anderen Stellen eines ACE-Inhibitors an Stelle anderer Reste eingeführter anderer Prolinderivate oder Analoga.

Bisher ist der Einfluß der an der linken Seite des Schwefelatoms von in der erwähnten älteren Anmeldung beschriebenen Thioesterverbindungen stehenden Aminosäure noch nicht bestimmt worden. Es wird angenommen, daß diese Aminosäure als zusätzliche Erkennungsstelle für das Enzym wirkt. Falls dies zutrifft, müßte erwartet werden, daß eine an dieser Stelle einen Aminosäurerest enthaltende Verbindung ein besserer Inhibitor wäre.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines neuen Inhibitors für Angiotensin umwandelndes Enzym, der für alle Patienten, unabhängig von der Verabreichungsform und ohne unerwünschte Nebenwirkungen zu verursachen, für die Behandlung von Bluthochdruck angewendet werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

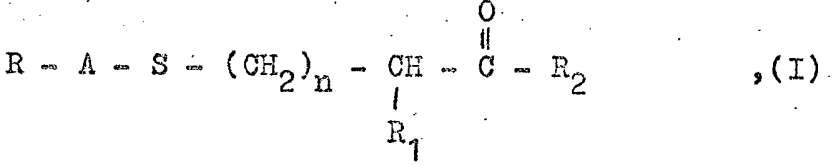
Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen, die als Inhibitoren für Angiotensin umwandelndes Enzym mit den gewünschten Eigenschaften und Verfahren zu ihrer Herstellung aufzufinden.

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

Die Anmelderin hat gefunden, daß zahlreiche Aminosäuren, substituierte Aminosäuren oder analoge Verbindungen für den Rest A in Verbindungen der später angegebenen allgemeinen Formel (I) eingesetzt werden können und hierbei wirksame Antihypertensiva und wirksame Inhibitoren für ACE erhalten werden. Die Anmelderin hat weiterhin gefunden, daß Hydroxyprolin, Proline, L- und D,L-3,4-Dehydroprolin, Thiazolidin-4-carbonsäure und L-5-oxo-prolin-derivate durchwegs wirksame Antihypertensiva und starke Inhibitoren für ACE ergeben.

Die Patentinhaberin hat beispielsweise in der älteren Anmeldung APA 61 K/215.457 angegeben, daß Verbindungen der unten stehenden allgemeinen Formel (I) stark wirksame Antihypertensiva sind und gegenüber ACE stark inhibierend wirken, jedoch hat die Anmelderin zu diesem Zeitpunkt noch nicht Salze solcher Verbindungen geprüft, weshalb die Anmelderin damals nicht wußte, ob solche Salze wirksam sein würden oder nicht. Die Anmelderin hat nun Salze dieser Verbindungen hergestellt und festgestellt, daß diese Salze wirksame Antihypertensiva sind und starke Inhibitoren für ACE darstellen.

Dementsprechend bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zum Herstellen von neuen basischen Salzen von Verbindungen der allgemeinen Formel



,(I)

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

worin

R für Wasserstoff, Formyl, Acetyl, Propanoyl, Butanoyl, Phenylacetyl, Phenylpropanoyl, Benzoyl, Cyclopentancarbonyl, tert-Butyloxycarbonyl, Cyclopentancarbonyl-L-lysyl, Pyro-L-glutamyl-L-lysyl, L-Lysyl, L-Arginyl oder Pyro-L-glutamyl steht,

A Phenylalanyl, Glycyl, Alanyl, Tryptophyl, Tyrosyl, Isoleucyl, Leucyl, Histidyl oder Valyl bedeutet und hierbei die α-Aminogruppe dieser Reste an den Rest R in Amidbindung geknüpft ist,

R_1 Wasserstoff oder Methyl darstellt,

R_2 für L-Prolin, L-3,4-Dehydroprolin, D,L-3,4-Dehydroprolin, L-3-Hydroxyprolin, L-4-Hydroxyprolin, L-Thiazolidin-4-carbonsäure oder L-5-Oxo-prolin steht und hierbei die Iminogruppe dieser Reste in Imidbindung an die benachbarte Gruppe

$$\begin{matrix} O \\ \| \\ -C- \end{matrix}$$

geknüpft ist und

n Null oder 1 bedeutet, wobei, falls n gleich ist Null, R_1 Methyl darstellt. Der Rest der Aminosäure A kann in optisch aktiver Form vorliegen, d.h., daß A in L-, D- oder D,L-Form vorliegen kann.

Alle der oben genannten Verbindungen stellen Inhibitoren für ACE dar und sind oral verabreicht wirksame Antihypertensiva.

Basische Salze der oben angegebenen Art werden gemäß der Erfindung dadurch hergestellt, daß eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) in ein Salz übergeführt wird.

Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bilden mit verschiedensten anorganischen und organischen Basen basische Salze. Solche Salze sind beispielsweise Ammoniumsalze, Alkalimetallsalze, Erdalkalimetallsalze, Salze mit organischen Basen, Salze mit Aminosäuren u. dgl. Beispiele für Alkalimetallsalze sind Natriumsalze oder Kaliumsalze. Beispiele für Erdalkalimetallsalze sind Kalziumsalze oder Magnesiumsalze. Beispiele für Salze mit organischen Basen sind solche mit Benzathin, N-Methyl-D-glucamin oder Hydrabamin. Beispiele für Salze mit Aminosäuren sind solche mit Arginin oder Lysin. Kaliumsalze oder Lysinsalze sind bevorzugt. Nicht-toxische, physiologisch verträgliche Salze werden ebenfalls bevorzugt.

Die Salze werden gemäß der Erfindung vorzugsweise dadurch hergestellt, daß eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) in Form der freien Säure mit einem Äquivalent der das gewünschte Kation liefernden Base in einem Lösungsmittel oder in einem Medium, in welchem das entstehende Salz unlöslich ist oder in Wasser umgesetzt wird, wobei bei Verwendung von Wasser das Wasser durch Gefriertrocknen entfernt wird.

Die erfindungsgemäß hergestellten Salze inhibieren die Umwandlung des Decapeptids Angiotensin I in Angiotensin II und sind deshalb zum Verringern oder zum Beseitigen von durch Angiotensin erzeugten erhöhten Blutdruck brauchbar. Unter der Einwirkung des Enzyms Renin auf Angiotensinogen, einem im Blutplasma vorhandenen Pseudoglobulin, entsteht Angiotensin I, das durch das Angiotensin umwandelnde Enzym (ACE) in Angiotensin II übergeführt wird, das seinerseits ein stark wirksamer Pressor (wirkt blutdruckerhöhend) ist und als der in verschiedenen Säugetieren wie Ratten und

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

Hunden überhöhten Blutdruck erzeugende Wirkstoff erkannt worden ist. Die erfindungsgemäß herstellbaren Verbindungen greifen nun in die Reaktionsfolge

$$\text{Angiotensinogen} \xrightarrow{\text{(Renin)}} \text{Angiotensin I} \xrightarrow{\text{(ACE)}} \text{Angiotensin II}$$

durch Inhibieren des das Angiotensin umwandelnden Enzyms ein und verringern oder verhindern das Entstehen des als Pressor wirkenden Angiotensins II. Durch Verabreichen eines Präparats, welches eines der in Frage kommenden Salze von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) oder eine Kombination solcher Salze enthält, wird in Säugetieren auf Angiotensin zurückzuführende Hypertension gemildert. Bei Verabreichung von etwa 0,1 bis 100 mg/kg.d, vorzugsweise etwa 1 bis 50 mg/kg.d, der erfindungsgemäß herstellbaren Verbindungen in Form einer Einzeldosis oder vorzugsweise auf 2 oder 4 Einzeldosen verteilt, kann der Blutdruck in einem durch einen von S.L. Engel, T.R. Schaeffer, M.H. Waugh und B. Rubin, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143, 483 (1973) beschriebenen Tierversuch bestimmbaren Ausmaß verringert werden. Der Wirkstoff wird vorzugsweise oral verabreicht, kann jedoch auch parenteral, beispielsweise subcutan, intramuskulär, intravenös oder interperitoneal, verabreicht werden.

Salze von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können zu oral verabreichbaren Präparaten wie Tabletten, Kapseln oder Elixieren oder zu parenteral verabreichbaren Präparaten wie sterilen Lösungen und Suspensionen verarbeitet werden, wobei etwa 10 bis 500 mg eines Salzes oder eines Gemisches von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) mit einem physiolo-

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

gisch annehmbaren Vehicel, Träger, Excipiens, Bindemittel, Konservierungsmittel, Stabilisierungsmittel, Geschmackszusätzen usw. in eine der pharmazeutischen Praxis entsprechende Einheitsdosis eingebracht werden können. Die Menge an Wirkstoff in solchen Präparaten entspricht einer im oben angegebenen Bereich liegenden Dosierung.

Beispiele für in Tabletten, Kapseln u. dgl. verwendbare Hilfsstoffe sind Bindemittel wie Tragant, Akaziengummi, Maisstärke oder Gelatine, ein Excipiens wie Dicalciumphosphat, ein zerfallsfördernder Stoff wie Maisstärke, Kartoffelstärke, Alginsäure u. dgl., ein Schmiermittel wie Magnesiumstearat, ein Süßstoff wie Saccharose, Lactose oder Saccharin und ein Geschmackszusatz wie Pfefferminz, Wintergrünöl oder Kirschenaroma. Falls die Einheitsdosis als Kapsel vorliegt, kann darin zusätzlich zu den oben angegebenen Stoffen ein flüssiger Träger wie ein pflanzliches Öl enthalten sein. Verschiedene andere Stoffe können in Form von Beschichtungen vorliegen, jedoch kann die physikalische Erscheinungsform der Einheitsdosis auch in anderer Weise modifiziert werden. Beispielsweise können Tabletten mit Schellack, Zucker oder mit beiden dieser Stoffe beschichtet werden. Ein Sirup oder ein Elixier kann zusätzlich zum Wirkstoff, Saccharose als Süßstoff, Methyl- und Propylparaben als Konservierungsmittel, einen Farbstoff und einen Geschmackszusatz wie Kirschen- oder Orangengeschmacksstoff enthalten.

Für die Injektion geeignete sterile Präparate können in in der pharmazeutischen Industrie üblicherweise durch Auflösen oder Suspendieren des Wirkstoffes in einem Vehicel wie Wasser für Injektionszwecke, einem natürlichen pflanzlichen

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

Öl wie Sesamöl, Kokosnußöl, Erdnußöl, Baumwollsamenöl usw. oder einem synthetischen Fett wie Äthyloleat o. dgl. hergestellt werden. Erforderlichenfalls können auch Puffersubstanzen, Konservierungsmittel u. dgl. eingearbeitet werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird im folgenden durch Ausführungsbeispiele näher erläutert, die die Herstellung von Salzen von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und auch die Anwendbarkeit und die Wirkung dieser Salze erläutern. Diese Ausführungsbeispiele schränken den Erfindungsgegenstand nicht ein.

Beispiel 1

Herstellung des Natriumsalzes des N^{α}-[3-(N^{α}-Benzoyl-D,L-phenylalanylthio)-2-D-methylpropanoyl]-L-prolins

Eine Lösung von 234,3 mg (0,5 mmol) N^{α}-[3-(Bz-D,L-phenylalanylthio)-2-D-methylpropanoyl]-L-prolin in 1 ml absolutem Äthanol wurde unter Rühren mit 0,5 mmol $NaHCO_3$ in Form einer 1m-Lösung in Wasser versetzt, worauf vom Reaktionsgemisch die Lösungsmittel mittels eines rotierenden Verdampfers bei einer Temperatur von etwa 35 °C abgedampft und der hierbei erhaltene ölige Rückstand in frischem Äthanol aufgenommen wurde und schließlich das Lösungsmittel erneut mittels des rotierenden Verdampfers abgedampft wurde. Diese Arbeitsweise wurde nochmals mit absolutem Äthanol und dann noch 2-mal mit Benzol vorgenommen. Der hierbei erhaltene weiße Rückstand wurde in einem Vakuumexsiccator über P_2O_5 getrocknet und dann aus 95-%igem Äthanol und Benzol umkristallisiert, womit mit einer Ausbeute von 55,1 % 135 mg weißer Kristalle mit einem Zersetzungspunkt von 185 bis 186 °C (Erweichungspunkt

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

bei 153 °C) erhalten wurden. Das in einer KBr-Tablette bestimmte Infrarotabsorptionsspektrum zeigte Zwitterionenbanden bei 1398 und bei 1600 cm^{-1} und eine Thioesterbande bei 1682 cm^{-1}. Bei der bei einem pH-Wert von 2 und 5 durchgeführten Papierelektrophorese und bei der an Silikagelplatten unter Verwendung von drei verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführten Dünnschichtchromatographie zeigte sich nach Umsetzung mit Phenazin-methosulfat-Reagens lediglich ein einziger im kurzwelligen UV erkennbarer Fleck.

Analyse:

berechnet für $C_{25}H_{27}N_2SNaO_5 \cdot 2H_2O$: 57,02 % C, 5,93 % H, 5,32 % N, 6,09 % S

gefunden 56,37 % C, 5,59 % H, 5,30 % N, 5,99 % S

Beispiel 2

Herstellung des Kaliumsalzes des N^{α}-/3-(N^{α}-Benzoyl-D,L-phenylalanylthio)-2-D-methylpropanoyl/-L-prolins

Das Kaliumsalz dieser Verbindung wurde nach der in Beispiel 1 angegebenen Arbeitsweise unter Verwendung von 1m-$KHCO_3$-Lösung statt der 1m-$NaHCO_3$-Lösung hergestellt. Beim Umkristallisieren wurden 70 mg eines weißen Feststoffes mit einem Zersetzungspunkt von 132 bis 134 °C erhalten. Bei der Bestimmung des Infrarotabsorptionsspektrums, bei der Papierelektrophorese und bei der Dünnschichtchromatographie wurden die gleichen Werte erhalten wie für das gemäß Beispiel 1 hergestellte Natriumsalz.

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

Beispiel 3

Herstellung des L-Lysinsalzes des N^{α}-[3-(N^{α}-Benzoyl-D,L-phenylalanylthio-2-D-methylpropanoyl]-L-prolins

Eine Lösung von 234,3 mg (0,5 mmol) N^{α}-[3-(N^{α}-Benzoyl-D,L-phenylalanylthio)-2-D-methylpropanoyl]-L-prolin in 1 ml absolutem Alkohol wurde mit einer Lösung von 73,1 mg (0,5 mmol) des in Form der freien Base vorliegenden L-Lysins in 0,3 ml entsalztem Wasser tropfenweise und unter Rühren versetzt, worauf vom Reaktionsgemisch die Lösungsmittel mittels eines rotierenden Verdampfers abgedampft wurden. Der hierbei erhaltene Rückstand wurde in frischem absolutem Äthanol aufgenommen, worauf das Lösungsmittel erneut mittels eines rotierenden Verdampfers abgedampft wurde. Diese Arbeitsweise wurde noch 2-mal mit absolutem Alkohol und dann noch 2-mal mit Benzol vorgenommen. Durch Trocknen des hierbei erhaltenen Rückstandes in einem Vakuumexsiccator über P_2O_5 wurden 0,292 g eines einen Zersetzungspunkt von 152 bis 154,4 °C besitzenden Stoffes erhalten, der beim Umkristallisieren aus mit einigen Tropfen Wasser und Benzol versetztem absolutem Alkohol 141 mg eines weißen Niederschlages mit einem Zersetzungspunkt von 162,5 bis 163,5 °C (Erweichungspunkt bei 160 °C) lieferte. Das in einer KBr-Tablette bestimmte Infrarotabsorptionsspektrum zeigte Zwitterionenbanden bei 1389 und 1620 cm^{-1}, eine Carbonylbande einer Amidgruppe bei 1641 cm^{-1} und eine Thioesterbande bei 1678 cm^{-1}. Die bei einem pH-Wert von 5 durchgeführte Papierelektrophorese und die unter Verwendung von drei verschiedenen Lösungsmittelsystemen an Silikagelplatten durchgeführte Dünnschichtchromatographie zeigte die Anwesenheit von Lysin und der genannten Verbindung. Bei Verwendung anderer Basen statt der gemäß den Beispielen 1 bis 3 verwendeten Basen $NaHCO_3$,

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

$KHCO_3$ oder Lysin können entsprechend den Angaben in diesen Beispielen weitere physiologisch annehmbare Salze hergestellt werden. Obzwar gemäß den Beispielen 1 bis 3 Salze des N^{α}-[3-(N^{α}-Benzoyl-D,L-phenylalanylthio)-2-D-methylpropanoyl]-L-prolins hergestellt werden, können selbstverständlich auch physiologisch annehmbare Salze irgendeiner anderen Verbindung der allgemeinen Formel (I) in der gleichen Weise hergestellt werden.

Beispiel 4

Wirksamkeit bei oraler Verabreichung des Natriumsalzes des N^{α}-[3-(N^{α}-Benzoyl-D,L-phenylalanylthio)-2-D-methylpropanoyl]-L-prolins

Ein Körpergewicht zwischen 150 und 190 g besitzende Ratten wurden über Nacht nüchtern gehalten und dann durch intraperitoneales Verabreichen von 50 bis 60 mg Pentobarbital/kg anästhesiert, worauf an den Ratten eine Tracheotomie vorgenommen wurde und die Ratten anschließend mechanisch beatmet wurden. Zwecks Injektion von Angiotensin I wurde eine Kanüle in eine Femorvene eingeführt. Zwecks direkter Messung des arteriellen Blutdruckes wurde eine weitere Kanüle in eine Carotidarterie eingeführt. Um Coagulation zu verhindern, wurden 1000 Einheiten Heparin über die Femorvene zugeführt. Der Blutdruck wurde mittels eines an einen Vielfachschreiber angeschlossenen Druckgebers gemessen. Den Ratten wurden auf dem Injektionswege 400 ng/kg Angiotensin I in 20 µl 0,9 Gew.-%iger NaCl-Lösung gelöst, verabreicht, d.h., daß die verabreichte Menge an Angiotensin I ausreichend war, den mittleren arteriellen Blutdruck um 60 mbar zu erhöhen. Nach dem Ansprechen der jeweiligen Ratte auf das verabreichte Angiotensin I wurde die oben genannte, zu prüfende Verbin-

dung in einer Menge von 10 /umol/kg gelöst in 0,15 ml H_2O und 10 /ul 1n-$NaHCO_3$-Lösung über einen Magenschlauch zugeführt. Der Einfluß des in einer Menge von 400 ng/kg verabreichten Angiotensin I auf den mittleren arteriellen Blutdruck wurde in bestimmten Zeitabständen gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse waren folgende:

Zeit nach oraler Verabreichung (in Minuten)	Ansprechverhalten des Blutdruckes auf 400 ng/kg Angiotensin I (in % des Vergleichswertes)
-5	100 (60 mbar)
+5	82
10	33
15	24
20	27
30	27
40	22
50	24
60	27
90	36
120	44
150	62
180	60
210	71
240	73

Beispiel 5

Wirkung des Kaliumsalzes des N^{α}-[3-(N^{α}-Benzoyl-D,L-phenylalanylthio)-2-D-methylpropanoyl]-L-prolins bei intravenöser Verabreichung

Die Wirksamkeit dieser Verbindung bei intravenöser Verabreichung wurde entsprechend den Angaben in Beispiel 4 bestimmt, wobei jedoch die zu prüfende Verbindung intravenös in einer Menge von 1 µmol/kg verabreicht wurde. Die erhaltenen Ergebnisse waren folgende:

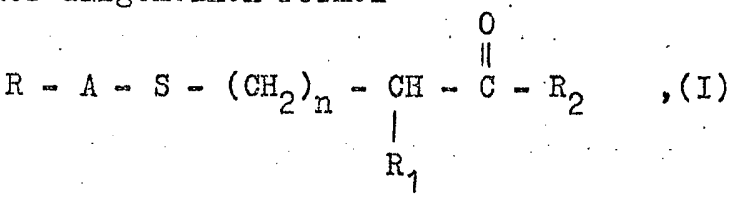
Zeit nach intravenöser Verabreichung (in Minuten)	Ansprechverhalten des Blutdruckes auf 400 ng/kg Angiotensin I (in % des Vergleichswertes)
-5	100 (72 mbar)
+5	46
10	37
15	41
20	37
30	44
40	50
50	39
60	46
90	52
120	59

Ohne aus dem Rahmen der Erfindung zu treten, können zahlreiche Abänderungen der erläuterten Ausführungsbeispiele getroffen werden.

Berlin, den 17.11.81
59 298 12

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zum Herstellen eines Inhibitors für das Angiotensin umwandelnde Enzym, gekennzeichnet dadurch, daß eine Verbindung der allgemeinen Formel



,(I)

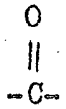
worin

R für Wasserstoff, Formyl, Acetyl, Propanoyl, Butanoyl, Phenylacetyl, Phenylpropanoyl, Benzoyl, Cyclopentancarbonyl, tert-Butyloxycarbonyl, Cyclopentancarbonyl-L-lysyl, Pyro-L-glutamyl-L-lysyl, L-Lysyl, L-Arginyl oder Pyro-L-glutamyl steht,

A Phenylalanyl, Glycyl, Alanyl, Tryptophyl, Tyrosyl, Isoleucyl, Leucyl, Histidyl oder Valyl bedeutet und hierbei die α-Aminogruppe dieser Reste an den Rest R in Amidbindung geknüpft ist,

R_1 Wasserstoff oder Methyl darstellt,

R_2 für L-Prolin, L-3,4-Dehydroprolin, D,L-3,4-Dehydroprolin, L-3-Hydroxyprolin, L-4-Hydroxyprolin, L-Thiazolidin-4-carbonsäure oder L-5-Oxo-prolin steht und hierbei die Iminogruppe dieser Reste in Imidbindung an die benachbarte Gruppe



geknüpft ist und

n Null oder 1 bedeutet, wobei, falls n gleich ist Null, R_1 für Methyl steht, mit einer Base zu einem Salz umgesetzt wird.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Natrium-, Kalium-, Calcium-, Magnesium-, Benzathin-, Hydrabamin-, N-Methyl-D-glucamin-, Arginin- oder Lysinsalz hergestellt wird.

3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß ein Salz einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) hergestellt wird, in welcher A für Phenylalanyl, R_1 für Methyl und R_2 für L-Prolin steht und n gleich ist 1.

4. Verfahren nach einem der Punkte 1, 2 oder 3, gekennzeichnet dadurch, daß die freie Säure der allgemeinen Formel (I) mit 1 Äquivalent der das gewünschte Kation liefernden Base umgesetzt wird, wobei zweckmäßig in einem Lösungsmittel oder in einem Nicht-Lösungsmittel für das entstehende Salz gearbeitet wird und bei Verwendung von Wasser als Lösungsmittel das Wasser vorzugsweise durch Gefriertrocknen abgetrieben wird.