



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 81 10 19 (P. 233499)

Pierwszeństwo: 20 10 80 dla zastrz. 1—6
Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 82 05 24

Opis patentowy opublikowano: 1987 06 30

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Warszawa

Int. Cl.³ C07C 103/52
A61K 37/02

Twórca wynalazku _____
Uprawniony z patentu: Eli Lilly and Company, Indianapolis (Stany
Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowych peptydów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych peptydów o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku w którym R oznacza atom wodoru, A oznacza ugrupowanie D-aminokwasu, to jest D-Ala, R₁ oznacza atom wodoru, X oznacza atom bromu, jodu lub chloru albo grupę metylową, grupę trójklorometylową lub grupę metoksyłową, B oznacza N-/CH₃- Met lub NH-Pgl, a Z oznacza grupę CONH₂, a także farmakologicznie dopuszczalnych addycyjnych soli tych związków z kwasami.

Związki o wzorze przedstawionym na rysunku działają silnie przeciwbólowo, a ponadto wykazują duże powinowactwo do receptorów δ /enkefalin w porównaniu z ich zdolnością do wiązania się z receptorami μ /morfiny. Tak więc, związki te charakteryzuje zmniejszony poziom morfinopodobnych efektów ubocznych. Zwiększona zdolność wiązania się z receptorami enkefalin stanowi o wielkiej przydatności omawianych związków w leczeniu schizofrenii.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku są analogami enkefalin o podstawionym pierścieniu fenyloalaniny. Rodzaj i pozycja podstawienia są ściśle określone, a mianowicie w pozycji 4 peptydu znajduje się ugrupowanie L-fenyloalaniny podstawionej w położeniu meta.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku są cennymi środkami przeciwbólowymi.

Ostatnio z mózgow i płynu mózgowo-rdzenio-

2

wego ssaków wyekstrahowano endogenne substancje o działaniu morfinopodobnym. Substancje te, zwane enkefalinami, zidentyfikowali Hughes i inni (Nature, 253, 577 (1975) jako pentopeptydy o następujących sekwencjach:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH

Związkom tym nadano nazwy odpowiednio metioninoenkefalina i leucinoenkefalina. Związki te wykazują wprawdzie działanie przeciwbólowe przy podawaniu do komór mózgowych myszom (Buscher i inni, Nature, 261, 423 (1976)), jednak są one praktycznie pozbawione tego działania przy podawaniu pozajelitowym.

Od chwili odkrycia enkefalin prowadzono wiele badań nad wytworzeniem ich analogów w nadziei opracowania związków o wzmożonym działaniu i użyteczności w praktyce przy podawaniu pozajelitowym lub doustnym.

Dutta i inni (Life Sciences, 21, str. 559—562 (1977)) dokonali pewnych modyfikacji strukturalnych, które ich zdaniem zwiększają siłę działania. Autorzy sugerują, iż silniejsze działanie uzyskuje się dzięki dowolnej z poniższych modyfikacji, względnie wszystkich tych modyfikacji:

a) podstawienie Gly w pozycji 2 pewnymi D- lub α -aza-amino-kwasami,

b) przemiana końcowej grupy karboksylowej w ester metylowy lub amid,

c) modyfikacja Phe w pozycji 4 drogą podstawie-

nia α -aza, N-metylowania lub uwodornienia pierścienia aromatycznego.

Roemer i inni (Nature, 268, str. 547—549 (1977)) sugerują modyfikację Met⁵ do odpowiedniego karbinolu oraz utlenienie przy atomie siarki w Met do sulfotlenku.

Z belgijskiego opisu patentowego nr 859 026 znane jest wprowadzanie ugrupowania D-aminokwasu w pozycję 2 analogów enkefality, przeprowadzenie końcowej grupy karboksylowej w amid i N-zalkilowanie ugrupowania aminokwasu w pozycji 5. Zabiegi te mają wzmacniać siłę działania i polepszać bioprzyswajalność.

Podstawione w pierścieniu analogi 4-fenylalaninyloenkefality znane są z literatury.

A. R. Day i inni opisali w Res. Comm. in Chem. Path. and Pharmacol., 14 (4), 597—603 (1976) H-Tyr-Gly-Gly-p-Cl-Phe-Nle-OH.

R. J. Miller i inni opisali w Vitamins and Hormones, 36, 297—382, Academic Press (1978) H-Tyr-D-Ala-Gly-p-Cl-Phe-D-Leu-OH, H-Tyr-D-Ala-Gly-p-Cl-Phe-D-Leu-OMe i H-Tyr-D-Ala-Gly-p-Cl-Phe-D-Leu-NH₂.

W referacie zatytułowanym „Opioid Activity of Enkephalin Analogues” zaprezentowanym przez Pless'a i innych na XV Sympozjum Europejskim na temat peptydów, 4—9 września 1978 r., Gdańsk, PRL, omówiono H-Tyr-D-Ala-Gly-p-Cl-Phe-Met/O/OH.

Z pracy D. H. Coy'a i innych opublikowanej w BBRC, 83, (3), 977—983 (1978) znany jest H-Tyr-D-Ala-Gly-F₃Phe-Met-NH₂.

W opisie patentowym Rep. Płd. Afryki nr 77/0579 ujawniono pentapeptydowe analogi enkefality o różnych podstawnikach w pierścieniu reszty fenyloalaniny.

Z belgijskiego opisu patentowego nr 886 677 znane są pentapeptydowe analogi enkefality, w których pierścień fenyloalaniny jest podstawiony w położeniu para atomem fluoru.

Na 176th Amer. Chem. Soc. National Meeting, 11—14 września 1978 r., Miami Beach, St. Zjedn. Ameryki, R. Miller w swym referacie zatytułowanym „Structural Pharmacology and Neurobiology of the Enkephalins and Endomorphins” ujawnił pewne analogi enkefality o p- podstawionej reszcie fenyloalaniny w pozycji 4, a mianowicie związki podstawione atomem chloru lub bromu.

Meltzer i inni opisali w Life Sciences, 22, 1931—1933 (1978) kilka analogów enkefality, a mianowicie związki podstawione atomem chloru lub grupą metoksylową w położeniu para pierścienia fenyloalaniny.

Cechą sposobu według wynalazku jest to, że z odpowiednio zabezpieczonego związku o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku, w którym wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie, odszczepia się grupy zabezpieczające przy użyciu środka odszczepiającego, po czym powstały związek wyodrębnia się ewentualnie w postaci farmakologicznie dopuszczalnej soli.

Grupy zabezpieczające mogą być obecne na każdym z aminokwasów lub na żywicznym nośniku stosowanym podczas syntezy w fazie stałej. Grupy te są grupami powszechnie stosowanymi w syn-

tezie peptydów dla ochrony aminokwasów w procesie sprzęgania, z włączeniem żywicznego nośnika stosowanego w syntezie w fazie stałej.

Farmakologicznie dopuszczalnymi nietoksycznymi addycyjnymi solami peptydów wytwarzanych sposobem według wynalazku i kwasów są sole kwasów nieorganicznych i organicznych, takie jak np. sól kwasu solnego, siarkowego, sulfonowego, winowego, fumarowego, bromowodorowego, glikolowego, cytrynowego, maleinowego, fosforowego, bursztynowego, mrówkowego, octowego, azotowego, benzoowego, askorbinowego, p-toluenosulfonowego, benzenosulfonowego, naftalenosulfonowego, propionowego, itp. Korzystne są sole kwasu solnego, octowego i bursztynowego. Sole wytwarza się znanymi metodami.

Jak wynika ze wzoru przedstawionego na rysunku, nowe peptydy są pentapeptydami.

Ważną cechą nowych peptydów jest ich konfiguracja stereochemiczna. Dla uproszczenia, reszty aminokwasów ponumerowano kolejno poczynając od reszty z końcową funkcją aminową. Chiralność reszt aminokwasów od pozycji 1 do 4 jest następująca: L, D, brak, L. Reszta w pozycji 3 pochodzi od glicyny, zatem chiralność w tym przypadku nie występuje. W pozycji 5 (pozycja C-końcowa) chiralność odpowiada chiralności odpowiedniego domniemanego L-aminokwasu lub D-aminokwasu względnie ich mieszaniny racemicznej.

Poniżej podano pewne warunki dla poszczególnych pozycji peptydów wytwarzanych sposobem według wynalazku.

A. Pozycja 1. Pozycja ta odpowiada amino-końcowej części peptydu. Resztą jest tu reszta pochodząca z L-tyrozyny. Reszta ta jest N-niepodstawiona (R=H). Związki takie przy podawaniu pozajelitowym wykazują wyjątkowo silne działanie przeciwbólowe.

B. Pozycja 2. Resztą aminokwasową (A) obecną w pozycji 2 peptydów wytwarzanych sposobem według wynalazku musi być stereoizomer D, i jest nią D-Ala.

C. Pozycja 3. Resztą aminokwasu obecną w tej pozycji jest reszta glicyny.

D. Pozycja 4. Resztą aminokwasu obecną w tej pozycji jest reszta pochodząca z m-podstawionej L-fenyloalaniny /Phe/X/. Podstawnikiem X w położeniu meta jest atom bromu, jodu lub chloru albo grupa metylowa, trójfluorometylowa lub metoksylova. Korzystnie X oznacza atom bromu, jodu lub chloru, a najkorzystniej atom bromu lub chloru.

E. Pozycja 5. Reszta -B-Z w C-końcowej pozycji peptydów wytwarzanych sposobem według wynalazku jest resztą aminokwasu przeprowadzonego w amid /Z= -C(O)/NH₂/. Chiralność tej reszty odpowiada konfiguracji L, D lub DL, przy czym korzystnie jest to L. Grupą B jest N/CH₃/ — Met lub NH — Pgl.

W opisie i zastrzeżeniach stosuje się powszechnie używane w chemii peptydów skróty, a mianowicie:

Ala	— alanina
Gly	— glicyna
Leu	— leucyna
Met	— metionina
Pgl	— fenyloglicyna
Phe	— fenyloalanina
Tyr	— tyrozyna
Me	— metyl
Et	— etyl
Boc	— t-butyloksykarbonyl
Bzl	— benzyl
DCC	— N,N'-dicykloheksylokarbodiimid
HBT	— 1-hydroksybenzotriazol
DMP	— N,N-dwumetyloformamid
TFA	— kwas trójtłurooctowy
DIEA	— dwuetyloaminoetyl

Związki wyjściowe, to jest związki o wzorze przedstawionym na rysunku z ochronionymi grupami funkcyjnymi wytwarza się stosując technikę znaną w syntezie peptydów. W trakcie wytwarzania niektórych tych związków może zajść częściowa racemizacja, przy czym jednak stopień tej racemizacji nie jest wystarczający na to, by zakłócić w znaczącym stopniu działanie przeciwbólowe tych związków.

Związki wyjściowe syntetyzuje się w procesie prowadzonym w fazie stałej lub w klasycznym procesie w roztworze. W procesie w fazie stałej łańcuch peptydu tworzy się stopniowo, stosując żywiczny nośnik, na ogół żywicę benzhydrioloaminową lub chlorometylowaną żywicę polistyrenową. Produkt odszczepia się od nośnika za pomocą HF w temperaturze 0°C lub za pomocą kwasu octowego, a następnie oczyszcza, zazwyczaj chromatograficznie. W procesie realizowanym w roztworze łańcuch peptydowy wytwarza się poddając reakcji różne zaktywowane i zabezpieczone aminokwasy w prawie dowolnej kolejności, po czym wszelkie obecne jeszcze grupy zabezpieczające usuwa się za pomocą środka odszczepiającego, takiego jak kwas, np. kwas trójtłurooctowy (TFA), p-toluenosulfonowy (TSA), benzenosulfonowy (BSA), metanosulfonowy (MSA), lodowaty kwas octowy wespół z gazowym HCl lub kwas mrówkowy. Zazwyczaj stosuje się także środek odszczepiający jon karbonyowy, taki jak anizol, tioanizol lub trójetylosilan, korzystnie anizol. Wszystkie warunki powyższych reakcji są dobrze znane specjalistom z dziedziny chemii peptydów. Przykładowo, temperatura reakcji z TFA wynosi od około -10°C do 30°C.

Bez względu na stosowaną metodę, wytwarzanie związków wyjściowych obejmuje sprzęganie aminokwasów lub fragmentów peptydowych w reakcji grupy aminowej jednego z nich z grupą karboksylową następnego. W reakcji tej powstaje wiązanie amidowe. Dla uzyskania skutecznego sprzężenia należy najpierw zabezpieczyć wszystkie grupy funkcyjne nie biorące bezpośredniego udziału w reakcji sprzęgania, stosując odpowiednie grupy zabezpieczające, a następnie odpowiednio zaktywować grupę karboksylową, która ma brać udział w sprzęganiu. Wymaga to starannego dobo-

ru kolejności reakcji i warunków reakcji oraz odpowiednich grup zabezpieczających. Każdy z aminokwasów użytych do wytworzenia peptydów zawierających odpowiednie grupy zabezpieczające i/lub odpowiednio zaktywowane grupy funkcyjne otrzymuje się metodami znanymi w chemii peptydów.

W każdym etapie syntezy związków wyjściowych stosuje się wybrane kombinacje grup zabezpieczających, a mianowicie te kombinacje, w przypadku których stwierdzono najkorzystniejszy przebieg reakcji. Możliwe jest także stosowanie innych kombinacji, przy czym ich działanie może się okazać mniej korzystne. Przykładowo jako grupy zabezpieczające grupy aminowe można stosować grupę benzyloksykarbonylową III-butoksykarbonylową III-rz.amyloksykarbonylową, p-metoksybenzyloksykarbonylową, adamantyloksykarbonylową i izobornyloksykarbonylową. Dla zabezpieczania grupy hydroksy ugrupowania tyrozylowego stosuje się na ogół grupę benzylową (Bzl), przy czym z równym powodzeniem można stosować grupę p-nitrobenzylową (PNB), p-metoksybenzylową (PMB), itp.

Grupami zabezpieczającymi grupę karboksylową mogą być dowolne grupy tworzące ugrupowania estrów, np. grupa metylowa, etylowa, benzylova, p-nitrobenzylova, p-metoksybenzylova, 2,2-trójtłuroetylova, itp.

Sprzęganie odpowiednio N-zabezpieczonych aminokwasów lub fragmentów peptydów polega na uaktywnieniu wolnej grupy karboksylowej aminokwasu lub fragmentu peptydu na reakcję sprzęgania. Aktywację prowadzi się jednym ze znanych sposobów. Jeden z takich sposobów polega na przeprowadzeniu grupy karboksylowej w ugrupowanie mieszanego bezwodnika. Wolną grupę karboksylową aktywuje się poddając ją reakcji z innym kwasem, na ogół pochodną kwasu węglowego, np. chlorkiem kwasu węglowego. Przykładami chlorków kwasowych stosowanych do wytwarzania mieszaných bezwodników są chloromrówczan etylu, chloromrówczan fenylu, chloromrówczan II-rz.butylu, chloromrówczan izobutylu, chlorokw. piwaloilu, itp., korzystnie chloromrówczan izobutylu.

Inny sposób aktywowania grupy karboksylowej na reakcję sprzęgania polega na jej przemianie w ugrupowanie aktywnego estru, takiego jak ester 2,4,5-trójtłurofenylowy, pięcióchlorofenylowy, p-nitrofenylowy, itp.

Innym sposobem sprzęgania jest dobrze znana reakcja sprzęgania azydów.

Korzystny sposób sprzęgania w syntezie związków wyjściowych polega na stosowaniu N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) w celu zaktywowania wolnej funkcji karboksylowej, a zatem umożliwienia reakcji sprzęgania. W tym celu stosuje się równomolowe ilości DCC i aminokwasu lub fragmentu peptydu, w obecności równomolowej ilości 1-hydroksybenzotriazolu (HBT). Obecność HBT zapobiega niepożądanym reakcjom ubocznym, w tym ewentualnej recemizacji.

W określonych etapach syntezy związków wyjściowych konieczne jest odszczepienie grup zabez-

pieczających. Fachowiec z dziedziny chemii peptydów łatwo dobierze takie grupy zabezpieczające, które ulegać będą selektywnemu odszczepianiu, to znaczy w przypadku których będzie możliwe odszczepienie jednej lub więcej niż jednej z tych grup, ale nie wszystkich grup zabezpieczających obecnych w aminokwasie lub fragmencie peptydu. Sposoby odszczepiania grup zabezpieczających są znane, patrz np. Schröder i Lübke, *The Peptides*, Volume I, Academic Press, Nowy Jork, (1965), a zwłaszcza tablica na str. 72—75.

Odszczepianie grup zabezpieczających grupy karboksylowe można realizować drogą zmydiania alkaliem. W celu deestryfikacji zabezpieczonych grup karboksylowych stosuje się mocne alkalia, np. NaOH, KOH, LiOH, itp. Warunki zmydiania są dobrze znane w chemii peptydów. Wiele grup zabezpieczających grupy karboksylowe można także usunąć drogą katalizowanej hydrogenolizy, np. z użyciem palladu na węglu jako katalizatora. Ponadto w przypadku stosowania grupy p-nitrobenzylowej lub 2,2,2-tróchloroetylowej jako grup zabezpieczających grupy karboksylowe, odszczepianie grup zabezpieczających można realizować drogą redukcji w obecności cynku i kwasu solnego.

Wiele grup zabezpieczających grupy aminowe ulega odszczepieniu pod wpływem kwasów, np. kwasu mrówkowego, kwasu trójfluorooctowego (TPA), kwasu p-toluenosulfonowego (TSA), kwasu benzenosulfonowego (BSA), kwasu naftalenosulfonowego, itp., z wytworzeniem odpowiednich addycyjnych soli z kwasami. Odszczepienia innych grup, np. grupy benzyloksykarbonylowej, można realizować działając na zabezpieczony aminokwas lub fragment peptydu mieszaniną HBr i kwasu octowego, z wytworzeniem odpowiedniego bromowodorku. Zastosowany sposób i odczynnik zależy zawsze od chemicznego i fizycznego charakteru związków podlegających reakcji odszczepiania grup zabezpieczających. Powstałą addycyjną sól z kwasem można przeprowadzić w postać związku łatwiej dopuszczalnego farmakologicznie przez działanie żywicą jonowymienną, np. DEAE Sephadex A 25, Amberlyst A 27, itp.

Grupę zabezpieczającą grupę hydroksylową można zachowywać podczas całej sekwencji reakcji syntezy, a usunąć dopiero w ostatnim etapie, jednocześnie z odszczepieniem grup zabezpieczających grupy aminowe. W zależności jednak od warunków reakcji odszczepienie grup zabezpieczających grupy karboksylowe, grupę zabezpieczającą grupę -CH można usunąć wcześniej. Gdy grupę zabezpieczającą grupę karboksylową usuwa się przez zmydianie alkaliem, to wówczas grupa zabezpieczająca grupę -CH pozostaje nienaruszona, natomiast w przypadku katalizycznej hydrogenolizy, zostaje ona usunięta. Nie stanowi to żadnego problemu w przypadku wytwarzania związków wyjściowych, gdyż ich wytwarzanie może przebiegać w obecności reszty tyrozylowej o wolnej grupie hydroksylowej, np. reszty tyrozylowej.

Zgodny z klasyczną metodą syntezy w roztworze korzystny sposób wytwarzania związków wyjściowych polega na tym, że sprężaniu poddaje się osobno przygotowane trójpeptydy N-końcowe

i dwupeptydy C-końcowe, po czym usuwa się ewentualnie jeszcze obecne grupy zabezpieczające. Oddzielnie wytworzony dwupeptyd C-końcowy może być zsyntezowany tak, by zawierał ugrupowanie amidu, alkoholu, eteru lub estru. Alternatywnie, może on zawierać grupę będącą prekursoremżądanego ugrupowania C-końcowego. Wytwarzanie pentapeptydów ilustruje schemat, na którym Z oznacza resztę C-końcową w postaci ostatecznej lub prekursorowej, AA oznacza resztę aminokwasu, a cyfra przyporządkowana symbolowi AA oznacza pozycję danego aminokwasu w sekwencji stanowiącego produkt peptydu.

Schemat ilustruje jedynie jedną z możliwych sekwencji reakcji prowadzących do wytworzenia związków wyjściowych. Inny sposób syntezy w roztworze polega na stopniowym kolejnym dodawaniu aminokwasów do łańcucha peptydowego, poczynając od C-końcowej reszty kwasowej. W sposobie tym, a także w innych możliwych sposobach stosuje się metody preparatywne opisane powyżej.

Dla fachowca jest oczywiste, iż w warunkach silnie alkalicznych, np. takich jak stosowane w wyżej opisanej reakcji alkilowania, może zaistnieć na atomie węgla w pozycji α racemizacja. Stopień racemizacji może być różny, w zależności od danego aminokwasu. Zaistnienie racemizacji można zmniejszyć do minimum stosując nadmiar środka alkilującego i skracając maksymalnie czas reakcji. Jednak nawet w przypadku zaistnienia nadmiernej racemizacji produkt można oczyścić przez krystalizację w postaci soli odpowiedniej chiralnej aminy, np. soli d/+- α -fenyloetyloaminy.

C-końcową funkcję wyjściowych peptydów jest grupa karboksylowa, przeprowadzona w ugrupowanie amidu. Przemianę w amid prowadzi się drogą aktywizacji grupy karboksylowej za pomocą DCC w obecności HBT, otrzymując ester HBT. Ester poddaje się reakcji z bezwodnym amoniakiem otrzymując niepodstawiony amid.

Korzystnymi związkami wytwarzanymi sposobem według wynalazku są L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-bromo-fenyloalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamid, L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-trójfluorometylofenyloalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamid, L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-chlorofenyloalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamid i L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-metylofenyloalanylo-L-/Na-metylo-/metioninoamid. Związki te wytwarza się np. działając na odpowiednie zabezpieczone związki ciekłym bezwodnym HF, a następnie kwasem octowym.

Korzystnymi związkami są także L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-metoksyfenyloalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamid, L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-jodofenyloalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamid i L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-bromofenyloalanylo-L-/Na-metylo/glicynamid. Związki te wytwarza się np. działając na odpowiednie zabezpieczone związki wyjściowe kwasem trójfluorooctowym.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku są cennymi lekami, wykazującymi działanie przeciwbólowe i neuroleptyczne. Są one szczególnie użyteczne w łagodzeniu bólu i zmniejszaniu

zaburzeń emocjonalnych przy podawaniu doustnym lub pozajelitowym ssakom, zwłaszcza ludziom.

Związki o wzorze przedstawionym na rysunku można podawać same lub wespół z farmakologicznie dopuszczalnymi zaróbkami, przy czym wzajemne proporcje ustala się w zależności od rozpuszczalności i charakteru chemicznego danego związku, wybranej drogi podawania i zgodnie ze standardową praktyką farmaceutyczną.

Korzystnie związki o wzorze przedstawionym na rysunku podaje się w postaci preparatów przeznaczonych do podawania pozajelitowego, to jest domięśniowo, podskórnego lub dożylnego. Preparatami takimi są jałowe roztwory i zawiesiny do wstrzyknięć oraz jałowe przeznaczone do wstrzyknięć preparaty o przedłużonym uwalnianiu. Szczególnie korzystne jałowe roztwory do wstrzyknięć sporządza się w izotonicznym roztworze soli lub dekstrozy. Jałowe preparaty do wstrzyknięć można sporządzać i przechowywać jako takie lub przygotowywać je bezpośrednio przed użyciem przez dodanie jałowego medium, np. wody do określonej odważki sterylnego składnika umieszczonego np. w fiolce lub ampulce, zapewniającej jałowość. Odważka może także zawierać sól lub dekstrozę w ilości zapewniającej powstanie roztworu izotonicznego po dodaniu jałowego medium.

Korzystne są także preparaty doustne, takie jak tabletki, kapsułki, itp., zawierające określoną ilość substancji czynnej. Ponadto preparatom można nadawać postać proszków, granulatów, roztworów lub zawiesin w środowisku wodnym lub niewodnym i emulsji.

Tabletki można wytwarzać przez prasowanie jednego lub więcej składników w postaci sypkiej, np. w postaci proszku lub granulatu, na ogół zmieszanych z jednym lub więcej niż jednym składnikiem dodatkowym, takim jak lepiszcze, środek poślizgowy, obojętny rozcieńczalnik, środek powierzchniowo czynny, bufor, środek smakowy, zagęszczacz, konserwant, dyspergator, itp.

Najodpowiedniejszą dawkę związku o wzorze przedstawionym na rysunku określa lekarz w zależności od sposobu podawania, rodzaju związku, leczzonego pacjenta i rodzaju kuracji. Na ogół jednak stosuje się od około 10 μg do około 2 mg na 1 kg wagi ciała pacjenta, korzystnie około 100–500 μg , przy podawaniu domięśniowym lub podskórnym oraz od około 1 μg do około 200 μg na 1 kg wagi ciała pacjenta, korzystnie około 3–50 μg , przy podawaniu dożylnym. Przy podawaniu doustnym zazwyczaj stosuje się około 1–500 mg na 1 kg wagi pacjenta, korzystnie około 50–200 mg, a zwłaszcza około 50–100 mg.

Wytwarzanie i działanie związków wytwarzanych sposobem według wynalazku ilustrują poniższe przykłady, w których skróty mają wyżej podane znaczenie.

Przykład I. Wytwarzanie L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-bromofenyloalanylo-L-N-metylo-/metioninoamidu w postaci octanu.

A. Sól kwasu trójfluorooctowego i L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-D,L-m-bromofenyloalanylo-L-N-metylo-/metioninylo-żywicy benzhydrioloaminowej.

W automatycznym syntetyzatorze do syntezy w

fazie stałej (Beckman 990 Peptide Synthesizer) syntetyzuje się peptydo-żywicę z użyciem 3,5 g żywicy benzhydrioloaminowej (Beckman, 0,47 mmoli — N/g). Żywicę zobojętnia się 40% roztworem dwuizopropylaoetyloaminy (DIEA) w chlorku metylenu, a następnie prowadzi się sprzęganie z Boc-/N-Me-/Met-OH i DCC w chlorku metylenu, otrzymując żywicę podstawioną Boc-/N-Me-/Met-. Stosując program nr 1 sprzęgania wstępnego dołącza się kolejno Boc-D,L-/m-Br-/Phe-OH, Boc-Gly-OH, Boc-D-Ala-OH i Boc-Tyr-OH, a następnie stosując program nr 2 sprzęga się dany aminokwas. Program nr 2 realizuje się raz dla każdego aminokwasu z wyjątkiem D,L-/m-Br-/Phe-OH, dla którego program ten prowadzi się trzykrotnie. Powstałą Boc-peptydo-żywicę poddaje się odszczepieniu grup zabezpieczających zgodnie z etapami 1–8 programu nr 1, otrzymując 4,04 g tytułowego związku. Przemycania w programach nr 1 i 2 prowadzi się stosując 8 ml na 1 g żywicy.

Program nr 1.

1. Trzykrotne przemycie za pomocą CH_2Cl_2 .
2. Działanie mieszaniną $\text{TFA}:\text{Et}_3\text{SiH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (30:5:65 objętościowo) w ciągu 5 minut.
3. Działanie jak w etapie 2 w ciągu 20 minut.
4. Dwukrotne przemycie CH_2Cl_2 .
5. Przemycie mieszaniną $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1).
6. Dwukrotne przemycie metanolem.
7. Przemycie mieszaniną $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1).
8. Dwukrotne przemycie CH_2Cl_2 .
9. Działanie 40% roztworem DIEA w CH_2Cl_2 cztery razy po 2 minuty.
10. Powtórzenie etapów 4–8.
11. Działanie 2,5 równoważnika żądanej pochodnej aminokwasu w CH_2Cl_2 i 2,25 równoważnika DCC w CH_2Cl_2 w ciągu 120 minut.
12. Czterokrotne przemycie CH_2Cl_2 .
13. Powtórzenie etapów 5–7.
14. Trzykrotne przemycie CH_2Cl_2 .

Program nr 2

1. Przemycie 40% roztworem DIEA w CH_2Cl_2 cztery razy po 2 minuty.
2. Dwukrotne przemycie CH_2Cl_2 .
3. Przemycie mieszaniną $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1).
4. Dwukrotne przemycie metanolem.
5. Przemycie mieszaniną $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1).
6. Dwukrotne przemycie CH_2Cl_2 .
7. Trzykrotne przemycie mieszaniną $\text{DMF}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1).
8. Działanie 2,5 równoważnika żądanej pochodnej aminokwasu w mieszaninie $\text{DMF}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1) i 1,25 równoważnika DCC w CH_2Cl_2 w ciągu 120 minut.
9. Czterokrotne przemycie mieszaniną $\text{DMF}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1).
10. Powtórzenie etapów 4–6.

B. Fluorowodorek L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-D,L-m-bromofenyloalanylo-L-N-metylo-/metioninoamidu.

Peptydo-żywicę z części A poddaje się reakcji z ciekłym bezwodnym HF pod zmniejszonym ciś-

nieniem, w temperaturze 0°C w ciągu 60 minut, stosując anizol jako środek odszczepiający. Składniki lotne usuwa się z mieszaniny reakcyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym peptydo-żywicę rozciera się w eterze i przesącza w celu usunięcia resztek HF i anizolu. Peptyd ekstrahuje się z żywicy przez roztrarcie w 10% kwasie octowym. Ekstrakt liofilizuje się, otrzymując 533 mg surowego związku tytułowego.

C. Chromatograficzne oczyszczanie produktu.

Surową mieszaninę diastereoizomerów peptydowych chromatografuje się na kolumnie (5 × 72 cm) do chromatografii z odwróconymi fazami, wypełnionej żelalem krzemionkowym C₁₈. Chromatografowanie prowadzi się pod niskim ciśnieniem (6,3 kG/cm²) stosując jako eluent 23% roztwór acetonitrylu w 0,1 n octanie amonu. Po zebraniu 2000 ml eluatu zbiera się kolejno otrzymywane w ciągu 1,5 minuty frakcje o objętości 17,1 ml każda. Frakcje 79–115 łączy się i liofilizuje. Zliofilizowany produkt chromatografuje się na kolumnie (2,5 × 100 cm) wypełnionej Sephadexem G-1ż za pomocą 0,2 n kwasu octowego, w celu usunięcia resztkowego octanu amonu. Frakcje liofilizuje się, otrzymując 198,7 mg tytułowego związku w postaci bezpostaciowej białej substancji stałej.

$$[\alpha]_D^{25} + 20,4^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

$$[\alpha]_{365}^{25} + 75,4^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

Analiza elementarna dla C₃₁H₄₃BrN₆O₈S (739,697)

Obliczono: C 50,34, H 5,86, N 11,36, Br 10,80

Stwierdzono: C 50,11, H 5,56, N 11,07, Br 11,03

Analiza aminokwasów

	Tyr	Ala	Gly	m-BrPhe	NH ₃	% peptydu
(1)	1,00	0,99	0,99	1,01	0,91	103
(2)	1,00	0,99	1,00	1,01	0,93	99

Przykład II. Wytwarzanie octanu L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-metoksifynyloalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamidu.

A. Na-III-rz.butylloksykarbonylo-D,L-m-metoksifynyloalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamid.

Do zawiesiny chlorowodoru Na-metylometioninoamidu (1,29 g, 6,47 mmola) w 7,0 ml zimnego (0°C) DMF dodaje się DIEA (1,11 ml, 6,47 mmola). Następnie do mieszaniny dodaje się kolejno roztwór Boc-D,L-/m-MeO/Phe-OH (1,91 g, 6,47 mmola) w 5,0 ml DMF, HBT (1,75 g, 12,9 mmola) i roztwór DCC (1,33 g, 6,47 mmola) w DMF (13 ml). Mieszaninę reakcyjną miesza się w temperaturze 0°C w ciągu 4 godzin, a następnie w temperaturze pokojowej w ciągu 16 godzin, stosując osuszającą rurkę z CaSO₄. Mieszaninę przesącza się w celu usunięcia dwucykloheksylomocznika (DCU), a przesącz odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując pomarańczową pozostałość, którą rozpuszcza się w 100 ml octanu etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno wodą (3 × 100 ml), buforem pH 10 (3 × 100 ml), 0,1 n HCl (3 × 100 ml) i wodą (3 × 100 ml), suszy nad siarczanem magnezowym i przesącza. Z przesącza usuwa się pod zmniejszonym ciśnieniem rozpuszczalnik, otrzymując 2,23 g (wydajność 81%) tytułowego związku. Chromatogram cienkowarstwowy wykazuje obecność DCU w produkcie.

B. Chlorowodorek D,L-m-metoksifynyloalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamidu.

Do roztworu związku z części A (2,23 g, 5,24 mmole) w kwasie octowym (10 ml) dodaje się anizol (1,6 ml) i 1,62 n HCl w kwasie octowym (16,2 ml). Roztwór miesza się stosując rurkę z CaSO₄ w temperaturze pokojowej w ciągu 1 godziny, a następnie rozcieńcza 470 ml eteru. Wytrącony osad odsącza się, przemywa eterem (3 × 15 ml) i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 25°C, otrzymując 1,53 g (wydajność 81%) tytułowego związku.

C. N-III-rz.butylloksykarbonylo-L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-D,L-m-metoksifynyloalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamid.

Do 7,0 ml dwumetyloformamidu (DMF) dodaje się 4,2 mmole (2,48 g) soli Boc-L-Tyr-D-Ala-Gly-OH i dwucykloheksyloaminy, po czym mieszaninę chłodzi się na łaźni acetonowo-lodowej do temperatury -10°C i dodaje 0,09 ml (0,84 mmola) N-metylomorfoliny i 0,55 ml (4,2 mmola) chloromrówczanu izobutyliu. Mieszaninę miesza się w ciągu 2 minut, a następnie dodaje do niej ochłodzoną do temperatury -10°C mieszaninę produktu z części B (1,51 g, 4,2 mmola) i N-metylomorfoliny (0,47 ml, 4,2 mmola) w DMF (16,5 ml). Powstałą mieszaninę miesza się z użyciem rurki z CaSO₄ w ciągu 16 godzin na łaźni lodowo-acetonowej. Po odsączeniu składników nierozpuszczalnych przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując żółtą pozostałość, do której dodaje się 50 ml octanu etylu i 50 ml wody. Warstwę wodną oddziela się i przemywa octanem etylu (3 × 50 ml), po czym warstwy octanowe łączy się i przemywa kolejno 5% NaHCO₃ (3 × 50 ml), 1,5 n kwasem cytrynowym (3 × 50 ml) i wodą (3 × 50 ml), a następnie suszy nad siarczanem magnezowym, przesącza i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując 2,84 g (wydajność 93%) związku tytułowego.

D. Trójfluorooctan L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-D,L-m-metoksifynyloalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamidu.

Do produktu z części C (2,84 g, 3,89 mmola) dodaje się anizol (3,5 ml) i kwas octowy (35 ml). Powstały roztwór miesza się z użyciem rurki z CaSO₄ w temperaturze pokojowej w ciągu 1,25 godziny, a następnie zależa pod zmniejszonym ciśnieniem. Do otrzymanego żółtego oleju dodaje się 900 ml eteru, po czym wytrącony osad odsącza się i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 25°C, otrzymując 2,61 g (90% wydajności) surowego tytułowego związku.

E. Chromatograficzne oczyszczanie produktu

Stosuje się tok postępowania z części C przykładu I w celu rozdzielenia dwóch diastereoizomerów. Otrzymuje się 758 mg tytułowego związku.

$$[\alpha]_D^{25} + 25,6^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

$$[\alpha]_{365}^{25} + 92,9^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

Analiza elementarna dla C₃₂H₄₆N₆O₈S (690,822)

Obliczono: C 55,64 H 6,71 N 12,17

Stwierdzono: C 55,50 H 6,60 N 12,32

Analiza aminokwasów

Tyr	Ala	Gly	m-MeOPhe	NH ₃	% peptydu
1,00	1,00	1,01	1,12	1,02	96

Przykład III. Stosując tok postępowania z przykładu I otrzymuje się z odpowiednich związków wyjściowych następujące związki.

Octan L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-trójfluorometylofenoalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamidu

$$[\alpha]_D^{25} + 15,29^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

$$[\alpha]_{365}^{25} + 56,47^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

Analiza elementarna dla C₃₂H₄₃F₃N₆O₈S (728,794)

Obliczono: C 52,74 H 5,93 N 11,53 F 7,82

Stwierdzono: C 53,03 H 5,70 N 11,72 F 7,61

Analiza aminokwasów

Tyr	Ala	Gly	m-CF ₃ Phe	NH ₃	% peptydu
(1) 0,99	1,00	1,02	0,99	1,01	98,5
(2) 0,99	1,00	1,01	1,00	0,95	97,1

Octan L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-chlorofenoalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamidu

$$[\alpha]_D^{25} + 19,67^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

$$[\alpha]_{365}^{25} + 69,64^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

Analiza elementarna dla C₃₁H₄₃ClN₆O₈S (695,241)

Obliczono: C 53,59 H 6,23 N 12,09

Stwierdzono: C 53,84 H 6,17 N 12,31

Analiza aminokwasów

Tyr	Ala	Gly	m-ClPhe	NH ₃	% peptydu
(1) 1,01	1,00	0,96	1,04	1,01	97,4
(2) 1,00	1,01	0,99	1,01	1,02	98,1

Octan L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-metylofenoalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamidu

$$[\alpha]_D^{25} + 15,01^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

$$[\alpha]_{365}^{25} + 53,35^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

Analiza elementarna dla C₃₂H₄₆N₆O₈S (674,823)

Obliczono: C 56,96 H 6,87 N 12,47

Stwierdzono: C 57,18 H 6,58 N 12,36

Analiza aminokwasów

Tyr	Ala	Gly	m-MePhe	NH ₃	% peptydu
(1) 0,99	0,88	0,97	1,03	1,01	95
(2) 0,99	0,99	0,99	1,01	0,91	94

Przykład IV. Stosując tok postępowania z przykładu II wytwarza się z odpowiednich związków wyjściowych następujące związki.

Octan L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-jodofenoalanylo-L-/Na-metylo/metioninoamidu

$$[\alpha]_D^{25} + 12,6^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

$$[\alpha]_{365}^{25} + 50,6^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

Analiza elementarna dla C₃₁H₄₃IN₆O₈S (786,962)

Obliczono: C 47,33 H 5,51 N 10,68 J 16,13

Stwierdzono: C 47,14 H 5,53 N 10,57 J 16,31

Analiza aminokwasów

Tyr	Ala	Gly	m-JPhe	NH ₃	% peptydu
1,01	1,00	1,01	0,92	1,08	93

Octan L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-bromofenoalanylo-L-fenylglicynoamidu

$$[\alpha]_D^{25} + 78,90^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

$$[\alpha]_{365}^{25} + 299,2^\circ \quad (c = 0,5, 1n \text{ HCl})$$

Analiza elementarna dla C₃₃H₃₉BrN₆O₈ (727,618)

Obliczono: C 54,47 H 5,40 N 11,59 Br 10,98

Stwierdzono: C 54,29 H 5,12 N 11,32 Br 11,18

Analiza aminokwasów

Tyr	Ala	Gly	m-BrPhe	Pgl	NH ₃	% peptydu
1,00	1,01	1,00	0,99	0,91	1,02	91

Działanie znieczulające związków o wzorze przedstawionym na rysunku wykazywano w próbie gorącej płyty na myszach. W próbie tej stosuje się pionowy cylinder akrylanowy zawierający jako podstawę powierzchnię gorącej płyty, utrzymywanej w temperaturze 52°C. Mysz podaje się przez podskórne wstrzyknięcie, wcześniej określonej ilości badanego związku, rozpuszczonego lub zawieszonego w odpowiednim nośniku i umieszcza ją po 15 minutach od chwili podania badanego związku na powierzchni gorącej płyty. Mierzy się w sekundach opóźnienie, z jakim mysz zeskakuje z powierzchni gorącej płyty. Środek, który wykazuje działanie znieczulające daje zwiększenie tego opóźnienia w porównaniu z myszami kontrolnymi, które otrzymują tylko nośnik. Musi to następować w granicach dawki nie powodującej braku koordynacji lub możliwości wykonywania ruchów. W poniższej tablicy podano wartości ED₅₀ otrzymane w tej próbie. Pod określeniem „ED₅₀” rozumie się dawkę, która powoduje znieczulenie 50% badanych myszy. Znieczulenie określa się jako opóźnienie reakcji na bodziec w obecności badanego związku, które jest równe lub większe niż opóźnienie reakcji zwierząt kontrolnych plus dwa odchylenia standardowe. Procentowe dane dotyczące znieczulenia przekształca się na próby i oblicza się ED₅₀ metodą analizy regresyjnej danych dawka — reakcja na bodziec. Każda krzywa zależności dawki od reakcji na bodziec musi zawierać co najmniej cztery punkty, a każdy punkt określa się na podstawie danych uzyskanych dla co najmniej 10 myszy traktowanych badanym związkiem i myszy kontrolnych.

Oprócz działania przeciwbólowego związki o wzorze przedstawionym na rysunku wykazują niespodziewanie silne powinowactwo do receptorów (δ) enkefalin, co odróżnia je od znanych związków wiążących się z receptorami (μ) morfiny. Działanie względem receptorów (δ) uwiadamia się dobrze znanym teście na nasieniowodzie myszy. Zgodnie z tym testem pojedynczy nasieniowód pobrany z dorosłej myszy (Cox, 30—40 g), umieszcza się w 3 ml zmodyfikowanego roztworu Krebsa utrzymywanego w temperaturze 37°C i przedmuchiwane mieszaniną 95% O₂ i 5% CO₂. Za pośrednictwem przekątnika izometrycznego rejestruje się na poligrafie drgnięcia wywołane działaniem pola (0,15 Hz, 1 msekunda, 40V). Do kąpieli dodaje się 20—30 μl porcji badanego związku, po czym na podstawie danych uzyskiwanych podczas kumulatywnego dodawania badanego związku do kąpieli rysuje się krzywą dawka-reakcja na bodziec. Porównanie względnej siły działania agonisty przy receptorze δ przeprowadza się przy zastosowaniu wskaźnika IC₅₀ (stężenie wywołujące 50% zmniejszenia wywołanego elektrycznie napięcia). Dane uzyskane w tym teście podano w tablicy. Ciekawy i niespodziewany jest efekt silnego powinowactwa do receptorów (δ) enkefalin występujący w przypadku związków wytwarzanych sposobem według wynalazku w porównaniu ze związkami niepodstawionymi w pierścieniu (R=H).

Tablica

H-L-Tyr-D-Ala-Gly-L-/m-R/Phe-L-R₁-NH₂

Związek		ED ₅₀ /mg/kg	IC ₅₀ /nM/
R	R ₁		
Br	/N-Me/Met	0,36	0,49
Cl	/N-Me/Met	0,11	0,71
J	/N-Me/Met	— ^a	2,10
CF ₃	/N-Me/Met	0,33	1,78
CH ₃	/N-Me/Met	0,33	2,73
OMe	/N-Me/Met	0,15 ^b	2,92
J	/N-Me/Met	— ^a	2,10
Br	Pgl	— ^a	0,35
H*	/N-Me/Met	0,30	12,2

^a nie badano^b próba z użyciem myszy Harlan ND₄

* związek znany

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych peptydów o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku, w którym R oznacza atom wodoru, A oznacza ugrupowanie D-aminokwasu, to jest D-Ala, R₁ oznacza atom wodoru, X oznacza atom bromu, jodu lub chloru albo grupę metylową, grupę trójfluorometylową lub grupę metoksyową, B oznacza N/CH₃/ — Met lub NH — Pgl, a Z oznacza grupę CONH₂, a także farmakologicznie dopuszczalnych nietoksycznych addycyjnych soli tych związków z kwasami, **znamienny tym**, że z odpowiednio zabezpieczonego związku o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku, w którym wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie, odszczepia się grupy zabezpieczające przy użyciu środka odszczepiającego, po czym powstały związek wyodrębnia się ewentualnie w postaci farmakologicznie dopuszczalnej addycyjnej soli.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-bromo-feniloalanylo-L-/Na-metylo-/metioninoamidu, poddaje się reakcji trójfluorooctan L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-bromofeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metionylo-żywicy benzhy-

droloaminowej z ciekłym bezwodnym HF, a następnie z kwasem octowym.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-metoksyfeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metioninoamidu, poddaje się reakcji Na-III-rz-butylloksykarbonylo-L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-metoksyfeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metioninoamid z kwasem trójfluorooctowym.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-trójfluorometylofeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metioninoamidu, poddaje się reakcji trójfluorooctan L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-trójfluorometylofeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metionylo-żywicy benzhydrioloaminowej z ciekłym bezwodnym HF, a następnie z kwasem octowym.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-chlorofeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metioninoamidu, poddaje się reakcji trójfluorooctan L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-chlorofeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metionylo-żywicy benzhydrioloaminowej z ciekłym bezwodnym HF, a następnie z kwasem octowym.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-metylofeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metioninoamidu, poddaje się reakcji trójfluorooctan L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-metylofeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metionylo-żywicy benzhydrioloaminowej z ciekłym bezwodnym HF, a następnie z kwasem octowym.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-jodofeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metioninoamidu, poddaje się reakcji Na-III-rz-butylloksykarbonylo-L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-jodofeniloalanylo-L-/Na-metylo-/metioninoamid z kwasem trójfluorooctowym.

8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-bromofeniloalanylo-L-/Na-metylo-/glicynamidu, poddaje się reakcji Na-III-rz-butylloksykarbonylo-L-tyrozylo-D-alanylo-glicylo-L-m-bromofeniloalanylo-L-fenylglicynamid z kwasem trójfluorooctowym.



