



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

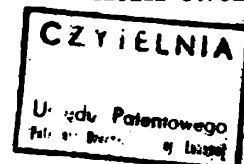
Zgłoszono: 81 10 19 (P. 233498)

Pierwszeństwo: 80 10 20 dla zastrz. 1—8
Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 82 05 24

Opis patentowy opublikowano: 1987 03 31

Int. Cl.⁸
C07C 103/52
A61K 37/02



Twórca wynalazku _____

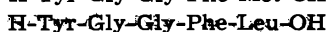
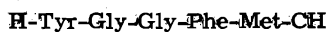
Uprawniony z patentu: Eli Lilly and Company, Indianapolis
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowych peptydów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych peptydów o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku, w którym R oznacza atom wodoru, lub grupę metylową, A oznacza D-Ala, R₁ oznacza pierwszorzędową grupę alkilową o 1—3 atomach węgla lub grupę cyklopropylometylową, X oznacza atom bromu, jodu lub chloru lub grupę metylową, a Z oznacza grupę o wzorze -C(O)NH₂ ewentualnie w postaci farmaceutycznie dopuszczalnych, nietoksycznych soli addycyjnych z kwasami, wykazujących działanie przeciwbólne.

Ostatnio z mózgu ssaków lub z płynu mózgowo-rdzeniowego (efs) wyekstrahowano substancję endogenną o właściwościach podobnych do morfiny. Substancja ta, nazwana enkefaliną, została zidentyfikowana przez Eughesa i innych, Nature, 258, 577 (1975) jako pentapeptydy o następujących sekwencjach:



Związki te nazwano, odpowiednio, metioninoenkefaliną i leucyno-enkefaliną.

Chociaż metionino- i leucyno-enkefalina wykazuje działanie przeciwbólne u myszy przy podawaniu do komory mózgowo-rdzeniowej [Buscher i inni, Nature, 261, 423 (1976)], są one jednak praktycznie pozbawione wszelkiego działania przeciwbólowego przy podawaniu pozajelitowo.

Dlatego, od czasu odkrycia enkefalin, usiłowano wytworzyć analogi enkefalin, w nadziei znaleźć-

2

nia związków wykazujących działanie i dających się praktycznie stosować w drodze podawania pozajelitowego lub doustnego dzięki ich biodostępności.

Dutta i inni, Life Sciences 21, str. 559—562 (1977) opisują pewne modyfikacje struktury, które, jak sugerują, mają tendencję do zwiększania mocy działania. Według ich sugestii aktywność działania związku można zwiększyć dzięki wszystkim trzem lub tylko jednej następującej modyfikacji:

- 10 a) podstawieniu Gly w pozycji 2 przez określone D- lub α -amino kwasy;
- b) konwersję końcowej grupy karboksylowej w ester metylowy lub amid;
- 15 c) modyfikację Phe w pozycji 4 przez podstawienie α -aza, N-metylowanie lub uwodornianie pierścienia aromatycznego.

Obecnie odkryto klasę analogów enkefalin o wysokim poziomie działania przeciwbólowego sprzężonego z małą tendencją do powstawania uzależnień nalogowych. Analogi te są cztero-peptydami zawierającymi fenyloalaninę podstawioną w pierścieniu. Są one wysoce specyficzne zarówno pod względem rodzaju podstawnika jak i pozycji podstawienia. Są to zwłaszcza cztero-peptydy zawierające L-fenyloalaninę m-podstawioną w pozycji 4 peptydu.

Z literatury znane są inne podstawione w pierścieniu 4-fenyloalaninowe analogi enkefalin, nie są one jednak m-podstawionymi analogami 4-fenyloalanin-enkefalin. A.R. Day i inni, Res. Comm.

in Chem. Path. and Pharmacol. 14 (4), 597—603 (1976) opisuje H-Tyr-Gly-Gly-pClPhe-Nle-OH. R. J. Miller i inni, Vitamins and Hormons, 36, 297—382, Academic Press (1978) wymienia H-Tyr-D-Ala-Gly-pClPhe-D-Leu-OH; H-Tyr-D-Ala-Gly-pClPhe-D-Leu-OMe; i H-Tyr-D-Ala-Gly-pClPhe-D-Leu-NHEt. Pless i inni, w referacie „Opioid Activity of Enkephalin Analogues”, przedstawionym na 15 Europejskim Sympozjum Peptydów, 4—9 wrzesień 1978, Gdańsk, Polska, omawia H-Tyr-D-Ala-Gly-pClPhe-Met/O/ol. D.H. Coy i inni, BBRC 83 (3), 977—983 wzmiankuje H-Tyr-D-Ala-Gly-F₃Phe-Met-NH₂. W opisie patentowym Republiki Południowej Afryki nr 77/0579 ujawniono pięciopeptydowe analogi enketaliny różnie podstawione w pierścieniu reszty fenyloalaniny. W belgijskim opisie patentowym nr 886 679 ujawniono cztero-peptydowe analogi enkefaliny, zawierające fluoro-podstawioną fenyloalaninę. Belgijski opis patentowy nr 870 819, opis patentowy Republiki Południowej Afryki nr 77/4479 oraz Mc Gregor i inni, Life Sciences 23, 1371—1378 (1978) ujawniają cztero-peptydowe analogi enkefaliny, ale żadna z tych publikacji nie ujawnia fenyloalaniny podstawionej w pierścieniu w pozycji 4. Referat R. Millera „Structural Pharmacology and Neurobiology of the Enkephalins and Endorphins” na 176 American Chemical Society National Meeting in Miami Beach, Floryda, St. Zjedn. Am., 11—14 wrzesień, 1978 ujawnia pewne p-podstawione w pozycji 4-fenyloalaniny analogi enkefaliny, zwłaszcza związki p-chloro- i p-bromopodstawione. Meltzer i inni, Life Sciences 22, 1931—1938 (1978) ujawniają szereg analogów enkefaliny, zwłaszcza dwa p-chloropodstawione i jeden p-metoksy-podstawione analogi fenyloalaniny.

Zadna z przytoczonych publikacji nie opisuje związku o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku, a stwierdzono, że zarówno rodzaj jak i pozycja podstawnika L-fenyloalaniny odgrywa znaczną rolę zarówno w poziomie działania przeciwbólowego analogu enkefaliny jak i w stopniu popadania w narkotyczne uzależnienie.

Sposób wytwarzania peptydów o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku, w którym wszystkie podstawniki mają poprzednio podane znaczenie polega na tym, że odszczepia się grupy blokujące z odpowiednio chronionego związku o wzorze przedstawionym na rysunku, stosując środek odszczepiający, taki jak kwas, korzystnie kwas mrówkowy, kwas trójfluorooctowy, kwas p-toluenosulfonowy, kwas benzenosulfonowy, kwas naftalenosulfonowy, kwas metanosulfonowy lub lodowaty kwas octowy w obecności gazowego HCl, z użyciem akceptora jonu karboniowego, korzystnie anizolu, tioanizolu lub trójetylosilanu, w temperaturze od około — 10°C do około 30°C.

Grupy blokujące, znajdujące się w chronionym peptydzie są znanymi grupami blokującymi stosowanymi w syntezie peptydów do ochrony aminokwasów w procesie sprzęgania i obejmują także żywczy nośnik stosowany w technice syntezy w fazie stałej.

Związki wytworzone sposobem według wynalazku wchodzi w skład preparatów farmaceutycz-

nych, zawierających zaróbkę i jako składnik aktywny związek o wzorze przedstawionym na rysunku.

Sposób według wynalazku dotyczy również wytwarzania farmaceutycznie dopuszczalnych, nietoksycznych soli addycyjnych związków o wzorze przedstawionym na rysunku z kwasami. Do soli tych należą sole addycyjne z kwasami organicznymi i nieorganicznymi, np. z kwasami takimi jak kwas solny, siarkowy, sulfonowy, winowy, fumarowy, bromowodorowy, glikolowy, cytrynowy, maleinowy, fosforowy, bursztynowy, octowy, azotowy, benzoosowy, askorbinowy, p-toluenosulfonowy, benzenosulfonowy, naftalenosulfonowy, propionowy i inne. Korzystnymi solami addycyjnymi są sole z kwasem solnym, octowym lub bursztynowym. Wszystkie powyższe sole otrzymuje się w znany sposób.

Jak można stwierdzić na podstawie różnych znaczeń podstawników występujących we wzorze przedstawionym na rysunku, związki objęte tym wzorem strukturalnym są cztero-peptydami, których C-końcówką część stanowi pierwszorzędowy amid.

Istotną cechą związków o wzorze przedstawionym na rysunku jest ich stereokonfiguracja. Dla wygody reszty aminokwasowe cztero-peptydów o wzorze przedstawionym na rysunku są ponumerowane kolejno począwszy od reszty przy końcowej funkcji aminowej. Chiralność reszt aminokwasowych, czytając od pozycji 1 do pozycji 4, jest L, D, żadna, i L. W pozycji 3 znajduje się reszta glicyny i dlatego nie występuje w tej reszcie chiralność.

Grupa R₁ we wzorze przedstawionym na rysunku oznacza „pierwszorzędową grupę alkilową o 1—3 atomach węgla”. Pod określeniem tym rozumie się metyl, etyl i n-propyl.

Jeśli chodzi o poszczególne pozycje reszt w cztero-peptydzie o wzorze przedstawionym na rysunku, przeważają następujące względy.

A) Pozycja 1.

Pozycja ta reprezentuje koniec peptydu zakończony grupą aminową. Resztą aminokwasu jest reszta L-tyrozyny. Reszta ta może być N-niepodstawiona i w tym przypadku R oznacza atom wodoru. Ponadto reszta ta może być N-jednopodstawiona, będąc resztą N-metylo. W związkach o wyjątkowo wysokim poziomie działania przeciwbólowego przy podawaniu pozajelitowym, reszta tyrosylowa znajdująca się w pozycji 1 korzystnie jest N-niepodstawiona. W związkach o wyjątkowo wysokim poziomie działania przeciwbólowego przy podawaniu doustnym, reszta tyrosylowa jest korzystnie N-podstawiona.

B) Pozycja 2.

Reszta aminokwasu (A) znajdująca się na drugiej pozycji peptydów o wzorze przedstawionym na rysunku musi być D-stereoizomerem i jest nią D-Ala.

C) Pozycja 3.

Reszta aminokwasu znajdująca się w tej pozycji

eji jest reszta pochodząca od glicyny (Gly).

D) Pozycja 4.

Reszta aminokwasu znajdująca się w tej pozycji jest reszta pochodząca z m-podstawionej L-fenylalaniny [Phe(X)]. Reszta ta jest podstawiona przy atomie azotu grupy aminowej (R₁) metylem, etylem, n-propylem lub cyklopropylometylem.

Ponadto reszta L-fenylalaniny jest podstawiona w pierścieniu w położeniu meta. Podstawnikiem może być atom bromu, jodu, chloru lub metyl. Korzystnie podstawnikiem tym jest atom bromu lub jodu, najkorzystniej bromu.

L-fenylalanina stanowi resztę C-końcową związku o wzorze przedstawionym na rysunku i jest aminokwasem strukturalnie przekształconym w jego amid (Z oznacza grupę -C(O)-NH₂).

W niniejszym opisie stosuje się następujące skróty, których większość jest dobrze znana i szeroko stosowana:

Ala — alanina

Gly — glicyna

Leu — leucyna

Met — metionina

Phe — fenylalanina

Tyr — tyrozyna

Me — metyl

Et — etyl

DCC — N,N'-dwucykloheksylokarbodiimid

HBT — 1-hydroksybenzotiazol

DMF — N,N-dwumetyloformamid

TFA — kwas trójfluorooctowy

eter 18-koronowy-5-1,4,7,10,13,16-heksaoksa-cyklo-oktadekan.

Związki wyjściowe, to jest związki o wzorze przedstawionym na rysunku z ochronionymi grupami funkcyjnymi wytwarza się w sposób znany w syntezie peptydów. Podczas syntezy pewnych związków wyjściowych możliwe jest, że może nastąpić częściowa racemizacja. Stopień racemizacji jednak, o ile następuje, nie jest wystarczający do znacznej zmiany działania przeciwbólowego związków o wzorze przedstawionym na rysunku.

Związki wyjściowe można syntetyzować na drodze syntezy peptydu w stanie stałym lub na drodze klasycznej syntezy w fazie roztworu. W metodzie syntezy w stanie stałym konstruuje się kolejno łańcuch peptydu stosując nośnik z żywicy, zwłaszcza z żywicy p-metylobenzohydroaminowej lub chlorometylowanej żywicy polistyrenowej. Produkt odszczepia się od żywicy HF w temperaturze 0°C lub kwasem octowym i oczyszcza, zwykle chromatograficznie. W syntezie w fazie roztworu łańcuch peptydu tworzy się przez reakcję różnych aktywowanych i chronionych aminokwasów w niemal dowolnej kolejności, po czym usuwa się wszystkie pozostałe grupy ochronne środkiem usuwającym te grupy, takim jak kwas, np. kwas trójfluorooctowy (TFA), kwas p-toluenosulfonowy (TSA), kwas benzenosulfonowy (BSA), kwas metanosulfonowy (MSA), kwas naftalenosulfonowy, lodowaty kwas octowy z gazem HCl lub kwas mrówkowy. Obecny jest zwykle także środek zdolny do wiązania jonu karbonylowego, taki jak anizol, tioanizol, lub trójetylosilan, korzystnie anizol. Wszystkie warunki reakcji są dobrze znane fa-

chowcom z dziedziny chemii peptydów. Np. temperatura reakcji z TFA wynosi od około -10°C do około +30°C.

Niezależnie od stosowanej metody, wytwarzanie wyjściowych związków polega na sprzęganiu aminokwasów lub fragmentów peptydów przez reakcję funkcji karboksylowej jednego z nich z funkcją aminową drugiego i utworzenia wiązania amidowego. W celu skutecznego przeprowadzenia sprzęgania pożądane jest, aby najpierw zdezaktywować wszystkie grupy funkcyjne nie biorące bezpośredniego udziału w reakcji przy użyciu odpowiednich grup ochronnych, a ponadto, aby odpowiednio zaktywować funkcję karboksylową, która musi być sprzęgana tak, aby umożliwić zachodzenie sprzęgania. Wszystko to wymaga dokładnego doboru zarówno kolejności reakcji, jak i warunków reakcji, a także stosowania określonych grup ochronnych, aby otrzymać pożądany produkt peptydowy. Każdy z aminokwasów stosowanych do wytwarzania związków o wyjściowych ze szczegółowo dobranymi grupami ochronnymi i/lub zaktywowanymi grupami funkcyjnymi wytwarza się w sposób dobrze znany w chemii peptydów.

W każdym etapie całkowitej syntezy związku wyjściowego stosuje się wybrane kombinacje grup ochronnych. Te szczególne kombinacje grup ochronnych są najlepsze, można jednak stosować inne kombinacje, choć przypuszczalnie z mniej zadowalającymi wynikami. I tak np. w syntezie związków wyjściowych jako grupy ochronne grupy aminowej, można zamiennie stosować grupy benzylkarbonylową, III-rzęd-butoksykarbonylową, III-rzęd-aryloksykarbonylową, p-metoksybenzylksoxykarbonylową, adamantyloksykarbonylową i izobutyryloksykarbonylową. Ponadto jako grupę ochronną grupy hydroksylowej reszty tyrozylowej stosuje się zwykle grupę benzylową (Bzl), chociaż również dobrze można też stosować i inne grupy, takie jak p-nitrobenzylowa (PNB), p-metoksybenzylowa (PMB) i podobne.

Grupami blokującymi grupę karboksylową podczas wytwarzania związków wyjściowych mogą być dowolne typowe grupy tworzące estry, obejmujące np. metyl, etyl, benzyl, p-nitrobenzyl, p-metoksybenzyl, 2,2,2-trójchloroetyl i podobne.

Sprzęganie odpowiednio chronionego N-blokowanego aminokwasu lub fragmentu peptydu z odpowiednio chronionym aminokwasem lub fragmentem peptydu z zablokowaną grupą karboksylową podczas wytwarzania związku wyjściowego polega na zaktywowaniu wolnej funkcji karboksylowej aminokwasu lub fragmentu peptydu do reakcji sprzęgania. Można to osiągnąć, stosując jeden spośród kilku znanych sposobów. Jeden z takich sposobów aktywowania polega na konwersji funkcji karboksylowej w mieszaną bezwodnik. Wolną funkcję karboksylową aktywuje się w reakcji z innymi kwasami, zwykle z pochodną kwasu węglowego, taką jak jego chlorek kwasowy. Przykładowymi chlorkami kwasowymi stosowanymi do tworzenia mieszaných bezwodników są chloromrówczan etylu, chloromrówczan fenylu, chloromrówczan II-rzęd-butylu, chloromrówczan izobutylu, chlorek piwa-

loilu i podobne. Korzystnie stosuje się chloromrówczan izobutyli.

Inny sposób aktywowania funkcji karboksylowej w celu przeprowadzenia reakcji sprzęgania polega na jej przekształceniu w aktywną pochodną estrową. Takie aktywne estry obejmują np. ester 2,4,5-trójchlorofenyłowy, ester pięciochlorofenyłowy, ester p-nitrofenyłowy i podobne. Innym dostępnym do zastosowania sposobem sprzęgania jest dobrze znana metoda sprzęgania azydowego.

Korzystny sposób sprzęgania stosowany do wytwarzania wyjściowego związku polega na stosowaniu do aktywowania wolnej funkcji karboksylowej N,N'-dwucykloheksylokarbodwumidu (DDC) pozwalając tym samym na sprzęganie. Ten sposób sprzęgania i aktywizacji prowadzi się, stosując równomolową ilość DCC w stosunku do aminokwasu lub fragmentu peptydu i w obecności równomolowej ilości 1-hydroksybenzotriazolu (HBT). Obecność HBT tłumi niepożądane reakcje uboczne, włącznie z możliwą racemizacją.

Odszczepianie wybranych grup blokujących jest konieczne w poszczególnych etapach syntezy związków wyjściowych. To usuwanie grup blokujących prowadzi się znanymi środkami powodującymi ich usuwanie. Chemik o przeciętnej wiedzy w zakresie syntezy peptydów może łatwo wybrać spośród grup ochronnych te grupy, które są przydatne w tym sensie, że można osiągnąć selektywne rozszczepianie produktu, pozwalające usunąć jedną lub więcej lecz mniej niż wszystkie grupy ochronne znajdujące się w aminokwasie lub fragmencie peptydu. Sposób ten jest dobrze znany w chemii peptydów. Dokładniejsze omówienie dostępnych technik selektywnego odszczepiania podano w literaturze, Schröder and Lubke, *The Peptides*, t. I. Academic Press, New York (1965), a zwłaszcza w tablicy zamieszczonej na stronach 72—75 tej publikacji.

Odszczepianie grup chroniących grupy karboksylowe można osiągnąć na drodze alkalicznego zmydlenia. Do deestryfikacji chronionej grupy karboksylowej stosuje się zwykle stosunkowo silne warunki alkaliczne stosując zazwyczaj wodorotlenek metalu alkalicznego, taki jak wodorotlenek sodu, wodorotlenek potasu, wodorotlenek litu i podobne. Warunki reakcji zmydlenia są również dobrze znane w technice. Wiele spośród grup blokujących grupę karboksylową można też usuwać na drodze katalitycznej wodorolizy, obejmującej np. wodorolizę w obecności katalizatora takiego jak pallad na węglu. Ponadto w tych przypadkach, w których grupą blokującą grupę karboksylową jest p-nitrobenzyl lub 2,2,2-trójchloroetyl, odblokowanie można osiągnąć przez redukcję w obecności cynku i kwasu solnego.

Wiele spośród grup blokujących grupy aminowe odszczepia się, traktując chroniony aminokwas lub peptyd kwasem, takim jak kwas mrówkowy, trójfluorooctowy (TFA), p-toluenosulfonowy (TSA), benzenosulfonowy (BSA), naftalenosulfonowy i podobne, tworząc odpowiednie sole addycyjne z kwasem. Odszczepianie innych grup można osiągnąć, traktując aminokwas lub peptyd z zablokowaną grupą aminową mieszaniną HBr i kwasu octowego, otrzymując odpowiednią sól addycyjną z kwasem bromowodorowym. Stosowanie określo-

nego sposobu lub reagenta zależy od właściwości chemicznych lub fizycznych materiałów biorących udział w konkretnej reakcji odblokowywania. Powstała sól addycyjną z kwasem można przekształcić w bardziej dopuszczalną farmaceutycznie postać przez traktowanie odpowiednią żywicą jonowymienną, taką jak DEAE Sephadex A 25, Amberlyst A 27 i podobne.

Grupę ochronną grupy hydroksylowej można zachować w peptydzie w ciągu kolejnych reakcji jego wytwarzania i usuwać ją w końcowym etapie syntezy wraz z odszczepianiem grupy blokującej grupę aminową. W zależności jednak od warunków stosowanych do usuwania grupy blokującej grupę karboksylową, można ją usuwać w jednej z wcześniejszych kolejnych reakcji prowadzących do wytworzenia peptydu. Gdy grupę karboksylową odszczepia się przez alkaliczne zmydlenie, ochroniona grupa hydroksylowa zostaje zachowana, gdy jednak do usuwania grupy ochronnej grupy karboksylowej stosuje się katalityczną wodorolizę, następuje również odszczepienie grupy chroniącej grupę karboksylową. Ta ostatnia sytuacja nie stwarza poważnych trudności, gdyż wytwarzanie związków o wzorze przedstawionym na rysunku można osiągnąć w obecności niechronionej reszty tyrosylowej.

Konkretny korzystny sposób wytwarzania związków wyjściowych polega na sprzęganiu dwupeptydu reprezentującego reszty aminokwasowe w pozycjach 2- i 3- z C-końcowym aminokwasem i następnie sprzęganiu powstałego trójpeptydu z N-końcową tyrozyną. C-końcowy aminokwas może zawierać resztę amidową, alkoholową, eterową lub estrową. Alternatywnie, może on zawierać grupę stanowiącą prekursor pożądanego reszty C-końcowej. Ogólną kolejność reakcji przedstawiono na schemacie 1, na którym Z oznacza resztę C-końcową bądź to w postaci ostatecznej bądź jako prekursor, AA oznacza resztę aminokwasu a liczba przy symbolu AA oznacza pozycję w ostatecznej sekwencji produktu peptydowego.

Na schemacie 1 przedstawiono tylko jedną kolejność reakcji wytwarzania związków wyjściowych. Możliwe są, oczywiście, także inne kolejności reakcji. Jedną z nich polega na sprzęganiu oddzielnie wytworzonego N-końcowego trójpeptydu z oddzielnie wytworzonym C-końcowym aminokwasem z następnym odszczepieniem wszystkich pozostałych grup blokujących. Inne rozwiązanie, które można stosować, polega na stopniowym, kolejnym dodawaniu poszczególnych aminokwasów do konstruowanego łańcucha peptydu poczynając od C-końcowej reszty aminokwasu. Technika prowadzenia wyżej opisanych reakcji jest taka sama, jak w przypadku innych kolejno prowadzonych czynności preparatywnych.

W niektórych związkach o wzorze przedstawionym na rysunku jedna lub więcej grup R i R₁ oznacza, zmiennie, grupę alkilową lub cyklopropylometylową. W tych przypadkach w kolejnych reakcjach prowadzących do wytworzenia wyjściowego peptydu stosuje się odpowiedni N-podstawiony aminokwas. Każdy z N-monopodstawionych aminokwasów można wytworzyć jak przedstawiono na schemacie 2, stosując jako substancję wyjścio-

wą N-chroniony aminokwas.

Jak wskazuje kolejność reakcji na schemacie 2, aminokwas najpierw traktuje się wodorkiem potasu w obecności odpowiedniego eteru koronowego, aby wytworzyć dwuanion. Produkt pośredni traktuje się następnie odpowiednim jodkiem alkilu lub cyklopropylometylo, aby otrzymać pożądaną N-podstawiony aminokwas.

Dla fachowca w dziedzinie syntezy peptydów będzie oczywiste, że racemizacja przy atomie węgla w położeniu α może występować w warunkach silnie alkalicznych, takich jak stosowane podczas opisanego wyżej alkilowania. Stopień racemizacji może być różny, zależnie od rodzaju aminokwasu. Racemizację można zminimalizować stosując nadmiar środka alkilującego i jak najkrótszy czas reakcji. Pomimo to, nawet w przypadku wystąpienia nadmiernej racemizacji, produkt można oczyścić przez przekrystalizowanie w postaci soli d-(+)- α -fenyloetyloaminy.

C-Końcowa część peptydów o wzorze przedstawionym na rysunku jest przekształcona w jej pochodną, to jest pierwszorzędowy amid. Przekształcenie w amid osiąga się przez aktywowanie grupy karboksylowej aminokwasu N-N'-dwucykloheksylokarbodwumidem (DCC) w obecności 1-hydroksybenzotriazolu (HBT), wytwarzając ester HBT, który następnie poddaje się reakcji z bezwodnym amoniakiem, otrzymując amid.

Korzystnymi związkami wytwarzanymi sposobem według wynalazku są amid L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanyloglicylo-L-(N-cyklopropylometylo)-m-bromofenyloalaniny, amid L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-bromofenyloalaniny, amid L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-bromofenyloalaniny, amid L-(N-metylo)-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-metylo)-m-metylofenyloalaniny, amid L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-chlorofenyloalaniny, amid L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-chlorofenyloalaniny, amid L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-jodofenyloalaniny, amid L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-cyklopropylometylo)-m-jodofenyloalaniny i amid L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-cyklopropylometylo)-m-jodofenyloalaniny. Związki te wytwarza się np. działając na odpowiednio zabezpieczone związki wyjściowe kwasem trójfluoroctowym.

Związki o wzorze przedstawionym na rysunku wykazują wartościowe właściwości farmaceutyczne, takie jak działanie przeciwbólowe a także neuroleptyczne. Są one szczególnie przydatne przy podawaniu pozajelitowym lub doustnym ssakom, włącznie z ludźmi, do łagodzenia bólu i polepszenia stanów zaburzeń emocjonalnych. Dodatkową wielką zaletą związków o wzorze przedstawionym na rysunku jest to, że wraz z działaniem przeciwbólowym i neuroleptycznym wykazują one bardzo niskie popadanie pacjentów w uzależnienie.

Związki o wzorze przedstawionym na rysunku można podawać same lub w połączeniu z farmaceutycznie dopuszczalnymi związkami, których ilość jest określona rozpuszczalnością i chemiczną naturą związku, wybraną drogą jego podawania, i standardową praktyką farmaceutyczną.

Korzystne są kompozycje nadające się do podawania pozajelitowego, to jest domięśniowo, podskórnie lub dożylnie. Obejmują one sterylne, nadające się do iniekcji roztwory lub zawiesiny oraz sterylne, nadające się do iniekcji depo lub preparaty powoli uwalniające składnik czynny. Szczególnie dogodnie sterylne, nadające się do iniekcji roztwory sporządza się w izotonicznym roztworze soli lub dekstrozy. Sterylne, nadające się do iniekcji kompozycje można sporządzać i przechowywać jako takie lub można je sporządzać bezpośrednio przed użyciem dodając sterylne środowisko, np. wodę, do znanej ilości wagowej sterylnego składnika zawartego w nośniku, np. fiolece lub ampułce, która zachowuje sterylność składnika. Znana ilość wagowa sterylnego składnika może też zawierać sterylną dekstrozę lub chlorek sodu w ilości zapewniającej izotoniczny roztwór lub zawiesinę po dodaniu sterylnego środowiska.

Korzystne są również kompozycje nadające się do podawania doustnego. Można je sporządzać jako oddzielne jednostki, takie jak kapsułki, tabletki i podobne, z których każda zawiera założoną ilość substancji czynnej. Ponadto można je sporządzać np. w postaci proszku lub granul, jako roztwór lub zawiesinę w środowisku wodnym lub niewodnym, lub jako emulsję.

Tabletki można sporządzać przez sprasowywanie, zwykle z jednym lub więcej składnikami pomocniczymi. Tabletki sporządza się przez sprasowywanie substancji czynnej w postaci zdolnej do swobodnego płynięcia, takiej jak proszek lub granul, i zwykle zmieszanej z jednym lub większą liczbą innych składników, takich jak środki wiążące, smarujące, obojętne rozcieńczalniki, środki zwilżające, powierzchniowo-czynne, buforujące, smakowe, zagęszczające, konserwujące, rozpraszające i podobne.

Lekarze ustalą konkretną dawkę związków o wzorze przedstawionym na rysunku, która jest najbardziej odpowiednia. Zmienia się ona w zależności od sposobu podawania, rodzaju podawanego związku, leczonego pacjenta i rodzaju leczenia. Zwykle jednak dawka wynosi około 0,5 μg do około 2 mg na kilogram wagi ciała pacjenta, a korzystnie od około 10 μg do około 100 μg na kilogram wagi ciała przy podawaniu domięśniowym lub podskórnym, i od około 0,1 μg do około 200 μg na kilogram wagi ciała pacjenta, korzystnie od około 1 μg do około 50 μg na kilogram wagi ciała przy podawaniu dożylnym. Przy podawaniu doustnym zwykła dawka waha się w granicach od około 100 μg do około 100 mg na kilogram wagi ciała pacjenta, korzystnie od około 500 μg do około 50 mg na kilogram wagi ciała, zwłaszcza od około 1 mg do około 10 mg na kilogram wagi ciała.

Następujące nieograniczające przykłady ilustrują wytwarzanie i działanie związków o wzorze przedstawionym na rysunku. Wszystkie skróty używane w przykładach zdefiniowano wyżej.

Przykład I. Wytwarzanie soli octanowej amidu L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-cyklopropylometylo)-m-bromofenyloalaniny.

A. Ester etylowy N^a-acetylo-β-cyano-D,L-m-bromofenyloalaniny.

Do mieszanej mechanicznie zawiesiny 16,8 g (0,35 mola) wodoru sodu (50% w oleju mineralnym) w 260 ml suchego THF dodaje się w temperaturze pokojowej w małych porcjach 59,56 g (0,35 mola) acetamidocyanoocetanu etylu. Do mieszaniny reakcyjnej wkrapla się roztwór 87,48 g (0,35 mola) bromku-m-bromobenzylu w 50 ml THF (suchy). Mieszaninę najpierw chłodzi się lekko a następnie miesza w ciągu 72 godzin w temperaturze pokojowej, po czym ogrzewa w ciągu 4 godzin w warunkach wrzenia pod chłodnicą zwrotną. Następnie mieszaninę chłodzi się do temperatury pokojowej, dodaje 80 ml etanolu i miesza w ciągu dalszych 30 minut, po czym wylewa do 1N HCl. Mieszaninę wodną ekstrahuje się octanem etylu, oddziela warstwę octanową i przemywa kolejno wodą, 1N kwaśnym węglanem sodu i wodą. Octan etylu suszy się nad siarczanem magnezu i zateża pod zmniejszonym ciśnieniem do oleju (107 g).

NMR δ 2,0 (acetyl), 3,4—3,5 (metylen) i 7,1—7,5 (m-bromofenyl).

B. D,L-m-bromofenyloalanina.

Produkt otrzymany w części A (107 g, 0,32 mola) zawieszają się w roztworze 58,8 g (1,47 mola) tabletek wodorotlenku sodu w 220 ml wody. Powstałą mieszaninę ogrzewa się w ciągu 24 godzin w warunkach wrzenia pod chłodnicą zwrotną. Następnie mieszaninę ochładza się do temperatury pokojowej i nastawia 6N HCl wartość pH na 6,5. Powstały osad zbiera się i suszy, otrzymując 41,01 g (53%) związku tytułowego.

C. N^a-trójfluoroacetylo-D,L-m-bromofenyloalanina.

Do 200 ml kwasu trójfluorooctowego dodaje się 46,53 g (0,19 mola) D,L-m-bromofenyloalaniny. Mieszaninę chłodzi się do temperatury 0°C i w ciągu 5 minut dodaje 29,3 ml (0,21 m) bezwodnika trójfluorooctowego. Otrzymany roztwór miesza się w ciągu 1,5 godziny w temperaturze 0°C. Mieszaninę miesza się w ciągu 3 godzin w temperaturze pokojowej, po czym zateża pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozcieńcza się 400 ml wody, a powstały osad zbiera się i suszy, i krystalizuje z mieszaniny eteru z eterem naftowym, otrzymując 28,4 g (44%) związku tytułowego.

Wyniki analizy obliczone dla C₁₁H₉NO₃BrF₃ (340,1)
C — 38,85; H — 2,67; N — 4,12.

Znaleziono: C — 39,09; H — 2,46; N — 4,32.

D. L-m-bromofenyloalanina.

Do 500 ml wody dodaje się 28 g (0,082 mola) produktu z części C. Mieszaninę poddaje się mieszanemu i dodaje 2N NaOH aż do otrzymania klarownego roztworu (pH 7,2). Dodaje się karboksypeptydazę A (25 mg) i roztwór utrzymuje się w temperaturze 37°C za pomocą łaźni wodnej z termostatem i przy wartości pH 7,2, za pomocą pH-statu typu Radiometer. Po pięciu dniach łagodnego mieszania doprowadza się pH roztworu do wartości 5,0, dodaje węgiel i mieszaninę sączy się. Wartość pH przesączu nastawia się 1N HCl na 3 i ekstrahuje go trzykrotnie octanem etylu. Na-

stępnie nastawia się za pomocą 2N NaOH wartość pH wodnego roztworu na 7,0 i zateża roztwór pod zmniejszonym ciśnieniem dopóki nie zacznie krystalizować izomer L. Mieszaninę pozostawia się do ostygnięcia do temperatury pokojowej. Powstały osad zbiera się i suszy, otrzymując 10,9 g (109%) tytułowego związku.

E. N^a-III-rzęd.-butoksykarbonylo-L-m-bromofenyloalanina.

Do mieszaniny 25 ml alkoholu III-rzęd.-butylowego i 20 ml wody dodaje się 9,0 g (0,041 mola) produktu otrzymanego w części D, a następnie 20,5 ml (0,041 mola) 2N NaOH i 8,9 g (0,041 mola) węglanu dwu-III-rzęd.-butylu. Mieszaninę poddaje się mieszanemu w ciągu 5 godzin w temperaturze pokojowej, po czym dodaje się 150 ml wody. Wodną mieszaninę ekstrahuje się eterem. Warstwę wodną zakwasza się do pH 2,5 zimnym 1N HCl i ekstrahuje eterem. Warstwę eterową ekstrahuje się wodą, suszy nad siarczanem magnezu i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem do otrzymania oleju. Olej ten rozpuszcza się w eterze naftowym i pozostawia do odstania w ciągu nocy w temperaturze 4°C. Powstałe kryształy zbiera się i suszy, otrzymując 11,3 g (80%) związku tytułowego o temperaturze topnienia 124—125°C.

[α]_D²⁵+16,7° (C=1,0, EtOH)

Wyniki analizy dla C₁₄H₁₈NO₄Br (344)

obliczono: C — 48,85; H — 5,27; N — 4,07

znaleziono: C — 49,25; H — 5,59; N — 4,04.

F. Amid N^a-III-rzęd.-butoksykarbonylo-L-m-bromofenyloalaniny.

Do 50 ml DMF dodaje się 11,5 g (0,033 mola) N^a-III-rzęd.-butoksykarbonylo-L-m-bromofenyloalaniny. Mieszaninę chłodzi się do temperatury -15°C i dodaje 3,63 ml (0,033 mola) NMM i 4,33 ml (0,33 mola) chloromrówczanu izobutylu. Mieszaninę poddaje się mieszanemu w temperaturze -15°C w ciągu 5 minut, po czym przepuszcza przez nią w ciągu jednej godziny bezwodny amoniak (gaz) w postaci pęcherzyków. Mieszaninę poddaje się mieszanemu w ciągu dalszych czterech godzin w temperaturze -15°C, po czym wylewa się ją na pokruszony lód i 1N wodorowęglan sodu. Powstały wodny roztwór ekstrahuje się octanem etylu. Oddziela się warstwę organiczną i kolejno ekstrahuje wodą, 1,5 N kwasem cytrynowym i wodą. Fazę organiczną suszy się nad siarczanem magnezu i zateża pod zmniejszonym ciśnieniem do stałej pozostałości, którą rozciera się z eterem a powstały osad gromadzi się i suszy, otrzymując 11,3 g (100%) związku tytułowego o temperaturze topnienia 146—147°C.

[α]_D²⁵+9,8° (c=0,5 MeOH)

Wyniki analizy dla C₁₄H₁₉N₂O₃Br (343,2)

obliczono: C — 48,99; H — 5,58; N — 8,16

znaleziono: C — 48,85; H — 5,33; N — 7,91.

G. Chlorowodorek amidu L-m-bromofenyloalaniny.

Do 60 ml świeżo sporządzonego 1N HCl (gaz) w lodowatym kwasie octowym zawierającym 5 ml amidu dodaje się 11,1 g (0,032 mola) produktu otrzymanego jak opisano w części F. Mieszaninę poddaje się mieszanemu w temperaturze pokojowej w ciągu 30 minut, po czym wylewa się ją do

eteru a powstały osad zbiera i suszy, otrzymując 8,75 g (98%) tytułowego związku.

$[\alpha]_{25}^D + 13,46^\circ$ ($c = 0,5$, MeOH)

Wyniki analizy dla $C_9H_{12}N_2OClBr$ (279,6)

obliczono: C — 38,67; H — 4,33; N — 10,02

znaleziono: C — 38,55; H — 4,41; N — 10,00.

H. Amid N^{α} -cyklopropylometylo-L-m-bromofenyloalaniny.

Do 50 ml bezwodnego etanolu dodaje się 4,2 g (0,015 mola) produktu otrzymanego jak opisano w części G, a następnie 5,04 g (0,06 mola) stałego bezwodnego kwaśnego węgla sodu i 2,04 g (0,015 mola) bromku cyklopropylometylu. Mieszaninę ogrzewa się w ciągu 7 godzin w warunkach wrzenia pod chłodnicą zwrotną, po czym odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem do otrzymania oleju, który rozpuszcza się w 20 ml chloroformu i przenosi na kolumnę 3×40 cm z żelem krzemionkowym Grace i Davidsona typ 62, w chloroformie. Produkt eluuje się przy stopniowym gradientcie do 10% metanolu. Produkt izoluje się według profilu gromadzonych frakcji cienkowarstwowych, otrzymując 2,2 g (49%) związku tytułowego.

NMR δ 1,6 (-NH-) i 7,0—7,4 (m-bromofenyl).

I. Amid N^{α} -III-rzęd.-butoksykarbonylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^{α} -cyklopropylometylo)-m-bromofenyloalaniny.

Do 40 ml DMF dodaje się 2,1 g (7,1 milimoli) produktu otrzymanego jak opisano w części H. Mieszaninę oziębia się do temperatury 0°C i dodaje 1,87 g (7,1 milimoli) N^{α} -III-rzęd.-butoksykarbonylo-D-alanylo-glicyny, a następnie 0,96 g (7,1 milimoli) HBT i 1,46 g (7,1 milimoli) DCC. Mieszaninę poddaje się mieszanii w ciągu 4 godzin w temperaturze 0°C , po czym w ciągu 72 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę ochładza się do temperatury 0°C , powstały osad usuwa się przez odsączenie a przesącz odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu, i roztwór ekstrahuje się kolejno 1N wodorowęglanem sodu, wodą, 1,5 N kwasem cytrynowym i wodą. Fazę organiczną suszy się następnie nad siarczanem magnezu i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem do uzyskania oleju, otrzymując 1,5 g (40%) związku tytułowego.

J. Amid N^{α} -butoksykarbonylo- N^{α} -metylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^{α} -cyklopropylometylo)-m-bromofenyloalaniny.

Do 50 ml kwasu trójfluorooctowego zawierającego 5 ml anizolu dodaje się 1,5 g (2,9 milimoli) produktu otrzymanego jak opisano w części I. Mieszaninę poddaje się mieszanii w ciągu 30 minut w temperaturze 0°C i odparowuje bez ogrzewania pod zmniejszonym ciśnieniem. Powstały olej rozcieńcza się eterem. Supernatant dekantuje się, a powstały olej suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem.

Do 15 ml DMF dodaje się 0,856 g (2,9 milimola) N^{α} -III-rzęd.-butoksykarbonylo- N^{α} -metylo-L-tyrosyny. Mieszaninę chłodzi się do temperatury -15°C i do poddawanej mieszanii roztworu dodaje się 0,32 ml (2,9 milimola) NMM i 0,38 ml (2,9 milimola) IBCF. Mieszaninę kontynuuje się w temperaturze -15°C postępując następująco:

Sól TFA trójpeptydu otrzymanego jak opisano wyżej rozpuszcza się w 10 ml DMF. Mieszaninę chłodzi się do temperatury 0°C i dodaje w jednej porcji 0,32 ml (2,9 milimola) NMM. Roztwór miesza się, aby zapewnić kompletność przebiegu reakcji. Powstałą mieszaninę dodaje się następnie do wcześniej sporządzonego roztworu mieszanego bezwodnika. Powstałą mieszaninę miesza się w ciągu 4 godzin w temperaturze -15°C , po czym pozwala na jej stopniowe ogrzanie do temperatury pokojowej i kontynuuje mieszanie przez okres nocy. Następnie mieszaninę wylewa się do 1N wodorowęglanu sodu i ekstrahuje powstały wodny roztwór octanem etylu. Oddziela się fazę organiczną i ekstrahuje kolejno wodą, 1,5 N kwasem cytrynowym i wodą. Octan etylu suszy się następnie nad siarczanem magnezu i zateża pod zmniejszonym ciśnieniem do oleju (1,6 g). Olej rozpuszcza się w acetonie i nakłada na dwie preparatywne płytki cienkowarstwowe. Płytki eluuje się mieszaniną chloroformu i metanolu 9:1. Zbiera się frakcję głównego składnika z płytek do chromatografii cienkowarstwowej TLC i eluuje z żelu krzemionkowego otrzymując 0,8 g (39%) związku tytułowego.

K. Sól octanowa amidu N^{α} -metylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^{α} -cyklopropylometylo)-m-bromofenyloalaniny.

Do 15 ml TFA zawierającego 3 ml anizolu dodaje się 0,8 h (1,2 milimola) produktu otrzymanego jak opisano w części J. Mieszaninę poddaje się w ciągu 30 minut mieszanii w temperaturze 0°C po czym suszy się ją przez wymrażanie. Pozostałe ciało stałe rozpuszcza się w 9,0 ml 0,1 M roztworu octanu amonu zawierającym 31% acetonitrylu. Roztwór nanosi się na kolumnę NPLC 4×72 cm z żelem krzemionkowym C_{18} z odwróceniem fazy. Kolumna pracuje pod ciśnieniem $4,116 \cdot 10^5$ Pa, a eluat bada się przy 280 nm. Odpowiednie frakcje łączy się i liofilizuje. Powstałe ciało stałe rozpuszcza się w 0,2 M kwasie octowym i nanosi na kolumnę z Sephadexu G-10 o wymiarach $2,5 \times 100$ cm, zrównoważoną poprzednio tym samym rozpuszczalnikiem. Eluat bada się przy 280 nm i odpowiednie frakcje łączy się i liofilizuje, otrzymując 773 cm (97%) związku tytułowego.

$[\alpha]_{25}^D + 6,64^\circ$ ($c = 0,5$; 1N HCl).

Wyniki analizy dla $C_{20}H_{40}N_5O_7Br$ (662,6)

obliczono: C — 54,38; H — 6,09; N — 10,57

znaleziono: C — 54,30; H — 5,99; N — 10,28.

Analiza aminokwasów: Ala — 0,97; Gly — 1,03; NH_3 — 0,99.

Przykład II.

Postępując jak w przykładzie I, wytwarza się z odpowiednich związków wyjściowych następujące związki:

A. Sól octanowa amidu L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanyloglicylo-L-(N-etylo)-m-bromofenyloalaniny.

$[\alpha]_{25}^D + 7,1^\circ$ ($c = 0,5$; 1N HCl).

Wyniki analizy dla $C_{22}H_{38}N_5O_7Br$ (636,5)

obliczono: C — 52,83; H — 6,02; N — 11,00

znaleziono: C — 53,09; H — 6,13; N — 11,18.

Analiza aminokwasów: Ala — 0,99; Gly — 1,01; NH_3 — 1,04.

B. Sól octanowa amidu L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-bromofenyloalaniny.

$[\alpha]_D^{25} - 8,3^\circ$ ($c = 0,5$, 1N HCl).

Wyniki analizy dla $C_{27}H_{36}N_5O_7Br$ (623)

obliczono: C — 52,09; H — 5,83; N — 11,25

znaleziono: C — 52,13; H — 6,09; N — 11,39.

Analiza aminokwasów: Tyr — 1,01; Ala — 0,99;

Gly — 0,99; NH_3 — 1,01.

C. Sól octanowa amidu L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-metylofenyloalaniny.

$[\alpha]_D^{25} + 9,2^\circ$ ($c = 0,5$, 1N HCl).

Wyniki analizy dla $C_{29}H_{41}N_5O_7$ (571,7)

obliczono: C — 60,93; H — 7,23; N — 12,25

znaleziono: C — 60,68; H — 7,00; N — 12,46.

Wyniki analizy aminokwasów: Ala — 0,98; Gly — 1,02; NH_3 — 0,96.

D. Sól octanowa amidu L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-chlorofenyloalaniny.

$[\alpha]_D^{25} - 13,7^\circ$ ($c = 0,5$, 1N HCl)

Wyniki analizy dla $C_{27}H_{36}N_5O_7Cl$ (578,1)

obliczono: C — 56,10; H — 6,28; N — 12,12

znaleziono: C — 55,84; H — 6,37; N — 12,35.

Analiza aminokwasów: Tyr — 1,02; Ala — 0,99; Gly — 0,98; NH_3 — 0,88.

E. Sól octanowa amidu L-(N-metylo)-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-chlorofenyloalaniny.

$[\alpha]_D^{25} - 9,2^\circ$ ($c = 0,5$, 1N HCl).

Wyniki analizy dla $C_{29}H_{38}N_5O_7Cl$ (592,1)

obliczono: C — 56,80; H — 6,47; N — 11,83

znaleziono: C — 57,11; H — 6,45; N — 12,15.

Analiza aminokwasów: Ala — 0,99; Gly — 1,00; NH_3 — 1,01.

F. Sól octanowa amidu L-tyrosylo-D-alanylo-L-(N-etylo)-m-jodofenyloalaniny.

$[\alpha]_D^{25} - 14,0^\circ$ ($c = 0,5$, 1N HCl).

Wyniki analizy dla $C_{27}H_{36}N_5O_7J$ (669,5)

obliczono: C — 48,44; H — 5,42; N — 10,46

znaleziono: C — 48,40; H — 5,25; N — 10,66.

Analiza aminokwasów: Tyr — 1,01; Ala — 0,99; Gly — 0,99; NH_3 — 1,05.

G. Sól octanowa amidu L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-cyklopropylometylo)-m-jodofenyloalaniny.

$[\alpha]_D^{25} + 1,18^\circ$ ($c = 0,5$, 1M CH_3COOH)

Wyniki analizy dla $C_{29}H_{38}N_5O_7J$

obliczono: C — 50,08; H — 5,51; N — 10,07

znaleziono: C — 50,00; H — 5,22; N — 10,23.

Analiza aminokwasów: Tyr — 0,99; Ala — 1,01; Gly — 0,99; NH_3 — 0,95.

H. Sól octanowa amidu L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-cyklopropylometylo)-m-jodofenyloalaniny.

$[\alpha]_D^{25} + 0,787^\circ$ ($c = 0,5$, 1M CH_3COOH)

Wyniki analizy dla $C_{30}H_{40}N_5O_7J$

obliczono: C — 50,78; H — 5,68; N — 9,81

znaleziono: C — 50,50; H — 5,40; N — 9,88.

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 $52^\circ C$. Myszy podaje się przez podskórne wstrzyknięcie, wcześniej określoną ilość badanego związku, rozpuszczonego lub zawieszonego w odpowiednim nośniku i umieszcza się 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 1 podano wartości ED_{50} otrzymane w tej próbie. Pod określeniem „ ED_{50} ” 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 probity i oblicza się ED_{50} 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 z co najmniej 10 myszy traktowanych badanym związkiem i myszy kontrolnych.

Tablica 1

Działanie znieczulające, próba gorącej płyty

Związek z przykładu	Ed_{50} , mg/kg
I	$1,2 \cdot 10^{-7}$
II A	0,003
II B	0,0049
II C	0,003
II D	0,0003
II E	0,0018
II F	0,0019

Ponadto, związki o wzorze przedstawionym na rysunku wykazują niską skłonność do fizycznego popadania w uzależnienie. Wykazano to w próbie aktywności ruchowej myszy. Ustalono wysoką korelację pomiędzy stopniem fizycznego popadania w uzależnienie od podanego związku a jego zdolnością do wywoływania aktywności ruchowej myszy, patrz Coldstein i inni, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 169, 175—184 (1969); Rethy i inni, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 176, 472—479 (1971); i Brase i inni, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 201 (2), 368—374 (1977).

Aktywność ruchową myszy mierzy się, stosując klatki cylindryczne z siatki drucianej o wysokości 5,08 cm i średnicy 27,94 cm. Sześć klatek umieszcza się w wentylowanej dźwiękoszczelnej komorze o jednolitym oświetleniu. Przez środek klatki przechodzi wiązka światła do komórki fotoelektrycznej na przeciwnym krańcu. W każdej klatce umieszcza się dwie myszy na okres jednej godziny aby przyzwyczaić je do otoczenia. Następnie pięciu parom myszy wstrzykuje się podskórnie ustaloną wcześniej dawkę badanego związku, a pozostałe pary otrzymują solankowy nośnik, wolny od badanego związku. Myszy

umieszcza się ponownie w ich odpowiednich klatkach na okres trzech godzin. Rejestruje się liczbę zliczeń w ciągu każdego 15-minutowego okresu jak również całkowitą liczbę zliczeń w ciągu 3 godzin. Każda przerwa wiązki światła stanowi jedno zliczenie.

Poniższa tablica 2 odzwierciedla średnią całkowitą ilość zliczeń dla każdej grupy 10 badanych myszy przy zastosowaniu określonego poziomu dawki badanego związku. Oczywiście jest, że w porównaniu ze związkami znanymi, związki o wzorze przedstawionym na rysunku wykazują znaczne zmniejszenie aktywności ruchowej.

Tablica 2

R-Tyr-D-Ala-Gly-(N-R₁/R₂)Phe-NH₂

Znaczenie podstawników			Dawka, mg/kg					
R	R ₁	R ₂	4	8	16	32	64	128
H	Et	m-Cl	125	613	819	2388	3667	2807
Me	Et	m-Cl	148	304	796	1978	4477	3476
H	Et	m-Br	—	200	512	1092	2820	—
Me	Et	m-Br	142	235	358	701	2523	5153
Me	Cpm	m-Br	171	140	276	320	1888	2159
H	Et	m-I	178	174	363	852	1630	2871
Me	Et	m-Me	173	255	537	1176	3231	3852
H	Et	H *	704	1204	2916	3528	—	—
Me	Et	p-F *	431	1425	2415	2033	—	—

* Związek znany

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych peptydów o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku, w którym R oznacza atom wodoru lub grupę metylową, A oznacza D-Ala, R¹ oznacza pierwszorzędową grupę alkilową o 1—3 atomach węgla lub grupę cyklopropylometylową, X oznacza atom bromu, jodu lub chloru lub grupę metylową, a Z oznacza grupę o wzorze -C(O)NH₂, ewentualnie w postaci farmaceutycznie dopuszczalnych, nietoksycznych soli addycyjnych z kwasami, **znamienny tym**, że odszczepia się grupy blokujące z odpowiednio chronionego związku o wzorze przedstawionym na rysunku, stosując środek odszczepiający, taki jak kwas, korzystnie kwas mrówkowy, kwas trójfluorooctowy, kwas p-toluenosulfonowy, kwas benzenosulfonowy, kwas naftalenosulfonowy, kwas metanosulfonowy lub lodowaty kwas octowy w obecności gazowego HCl, z użyciem akceptora jonu karbonylowego, korzystnie anizolu, tioanizolu lub trójetylosilanu, w temperaturze od około -10°C do około 30°C.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania amidu L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanyloglicylo-L-(N-cyklopropylometylo)-m-bromofenyloalaniny poddaje się reakcji amid N^α-III-rzęd.-butoksykarbonylo-N^α-metylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^α-cyklopropylometylo)-m-bromofenyloalaniny z kwasem trójfluorooctowym.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania amidu L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-bromofenyloalaniny poddaje się reakcji amid N^α-III-rzęd.-bu-

toksykarbonylo-N^α-metylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^α-etylo)-m-bromofenyloalaniny z kwasem trójfluorooctowym.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania amidu L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-bromofenyloalaniny poddaje się reakcji amid N^α-III-rzęd.-butoksykarbonylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^α-etylo)-m-bromofenyloalaniny z kwasem trójfluorooctowym.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania amidu L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-metylo)-m-metylofenyloalaniny, poddaje się reakcji amid N^α-III-rzęd.-butoksykarbonylo-N^α-metylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^α-metylo)-m-metylofenyloalaniny z kwasem trójfluorooctowym.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania amidu L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-chlorofenyloalaniny poddaje się reakcji amid N^α-III-rzęd.-butoksykarbonylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^α-etylo)-m-chlorofenyloalaniny z kwasem trójfluorooctowym.

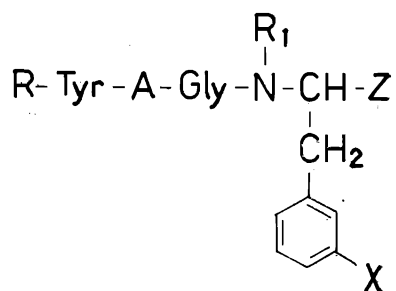
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania amidu L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-chlorofenyloalaniny, poddaje się reakcji amid N^α-III-rzęd.-butoksykarbonylo-N^α-metylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^α-etylo)-m-chlorofenyloalaniny z kwasem trójfluorooctowym.

8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania amidu L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-etylo)-m-jodofenyloalaniny, poddaje się reakcji amid N^α-III-rzęd.-butoksykarbonylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^α-etylo)-N-

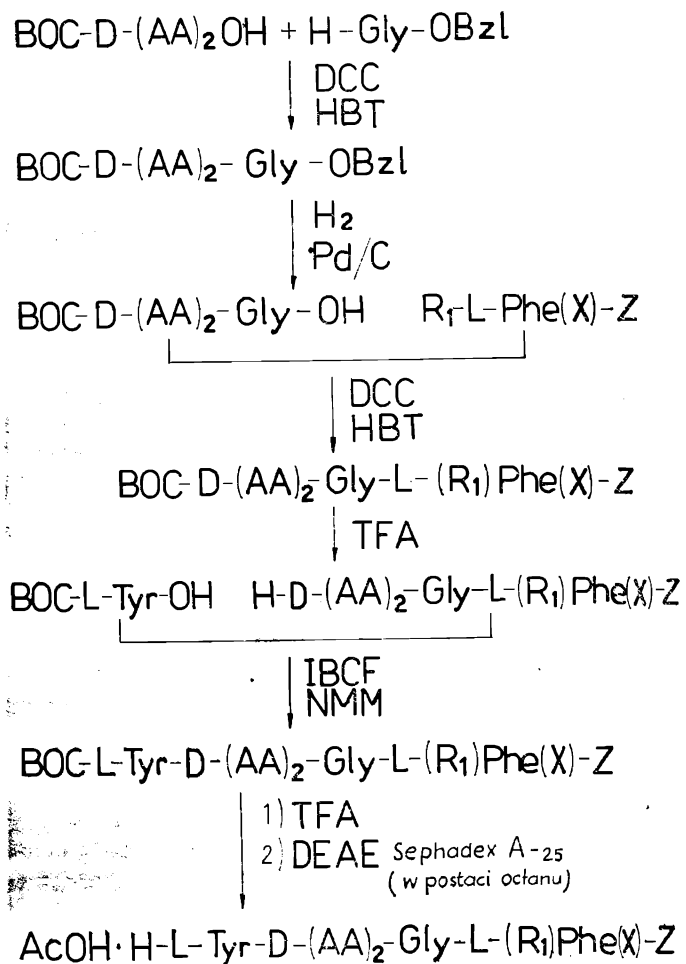
-jodofenyloalaniny z kwasem trójfluorooctowym.

9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania amidu L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-cyklopropylometylo)-m-jodofenyloalaniny, poddaje się reakcji amid N^α-III-rzęd.-butoksykarbonylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^α-cyklopropylometylo)-m-jodofenyloalaniny z kwasem trójfluorooctowym.

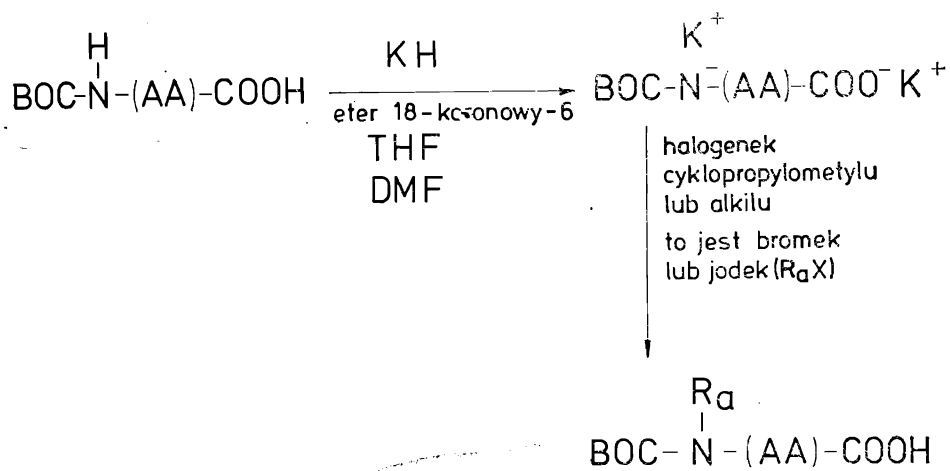
10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania amidu L-(N-metylo)tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N-cyklopropylometylo)-m-jodofenyloalaniny, poddaje się reakcji amid N^α-III-rzęd.-butoksykarbonylo-N^α-metylo-L-tyrosylo-D-alanylo-glicylo-L-(N^α-cyklopropylometylo)-m-jodofenyloalaniny z kwasem trójfluorooctowym.



Wzór



Schemat 1



Schemat 2