

Előírás

Zsírsav-származékok és ezeket tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására

YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE

HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM, Jeruzsálem, Izráel

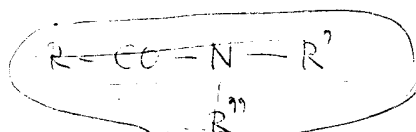
A bejelentés tárgya: 1993. 11. 3.

Feltalálója: 1992. 11. 30. (193 032) / 222

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/93/11025

A nemzetközi közzététel száma: WO/94/04000

KIVONAT



A találmány tárgyát az (I) általános képletű tiszta, többszörösen telítetlen zsírsav-amidok és származékaik képezik. A képletben

R jelentése egy 16 - 28 szénatomos, 2 - 6 kettőskötéssel bíró többszörösen telítetlen zsírsav alkenil egysége, ahol előnyösen minden kettőskötés cisz-konfigurációjú, az első kettőskötés a C-3, C-6 vagy C-9 helyzetben van a molekulának a nem-karboxil terminálisától számítva, és

R'' jelentése -H, rövid szénláncú alkilcsoport, -OH vagy $-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$, ahol n értéke kis egész szám, és

ha R'' jelentése hidrogénatom, R' jelentése rövid szénláncú alkilcsoport vagy $-(\text{CH}_2)_m\text{OH}$, ahol m jelentése kis egész szám, és

ha R'' jelentése rövid szénláncú alkilcsoport, R' jelentése $-(\text{CH}_2)_p\text{-OH}$, ahol p jelentése kis egész szám, és

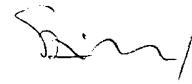
ha R'' jelentése -OH, R' jelentése $-(\text{CH}_2)_q\text{-OH}$, ahol q jelentése kis egész szám, vagy

R' és R'' mindegyike $-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$, ahol n jelentése kis egész szám,

valamint ezen vegyületek savaddíciós sói és komplexei.

Ezek a szintetikus úton előállított vegyületek a természetes előfordulású anandamid agyban kifejtett hatásának utánzására ké-

pesek, és a kannabinoid receptorhoz kötődnek. A vegyületek fiziológias aktivitással bírnak, gyulladások, migrének, görcsös állapotok, glaukóma, és szklerózis multiplex kezelésére szolgáló gyógyászati készítmények hasznos hatóanyagai. A hatóanyagok izotóppal jelzett formában is előállíthatók.



1950/501

Közzététel
pályázat

34703

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

Budapest

A

Eljárás
Zsírsavszármazékok és ezeket tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE
HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM, Jeruzsálem, Izrael**

Feltalálók:

DEVANE William A. Chevy Chase, Maryland, US

MECHOULAM Raphael, Jeruzsálem, Izrael

BEUER Aviva, Jeruzsálem, Izrael

HANUS Lumir, Jeruzsálem, Izrael

A bejelentés napja: 1993. 11. 30.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US93/11625

Elsőbbsége: 1992. 11. 30. (103 932) Izrael

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/12466

Aktaszám: 81577-2920-GÁ/KmO

A találmány tárgyát bizonyos többszörösen telítetlen zsírsav-amidok és származékaik képezik. Ezek egy része az agyban van jelen, más része szintézis terméke. Az új, tiszta vegyületek különféle farmakológiai tulajdonságokkal bírnak. Gátolják a kannabinoid próba fajlagos kötődését szinaptoszomális membránokhoz. A találmány szerinti vegyületek radioaktivitással jelzett formában is előállíthatók.

Az arachidonsav-etanolamid (anandamid) és hasonló vegyületek az agy összetevői. Az anandamid és bizonyos, ehhez hasonló vegyületek a kannabinoid receptorokhoz kötődnek. Az anandamidnak a kannabinoid receptorhoz való kötődése hasonló a Δ^9 -tetrahidrokannabinol kötődéséhez. A szervezetben számos olyan mediátor létezik, amelyek arachidonsavszármazékok, például a prosztaglandinok és a leukotriének, amelyek rokon vegyületek nagy családjaként vannak jelen. Ezek némelyike nem kötődik a kannabinoid receptorhoz, és a találmány céljainak egyike volt olyan vegyületek nyújtása és azonosítása, amelyek farmakológiai jellemzői hasonlóak az anandamid jellemzőihez. Az, hogy létezik egy receptor, és a kannabinoid aktivitáshoz szükséges nagy szerkezeti követelmények egy fajlagos endogén kannabinoid ligandum jelenlétének lehetőségét jelzik.

A következőkben a találmány összegzését adjuk.

Ez ideig nem azonosítottak még a kannabinoid receptorral kapcsolatos endogén ligandumokat. Az arachidonil-etanolamid egy új arachidonsavszármazék - triviális nevén anandamid -, ezt a vegyületet sertés agyból izolálták. Szerkezetét tömegspektrometriás és magmágneses rezonancia spektroszkópiás eljárással határozták meg, és szintézissel igazolták. Ez a vegyület a jelzett kannabinoid

próbának szinaptoszomális membránhoz való fajlagos kötődését olyan módon gátolja, amely kompetitív ligandumokra jellemző, és egér vér- és nyirokedények elektromosan keltett rángási válaszában koncentráció-függő gátlását hozza létre, amely egy a pszichotróp kannabinoidokra jellemző hatás. Hasonló vegyületeket szintetizáltunk és ezek farmakológiai jellemzőit vizsgáltuk.

A Δ^9 -tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC), a Cannabis pszichoaktív összetevője, egy fajlagos G-proteinnel kapcsolt receptorhoz kötődik az agyban. Bár patkány és ember kannabinoid receptorát klónozták, fiziológiai funkciója nem ismert. A THC jól ismert viselkedési hatásai és a receptorok nagy száma és anatómiai lokalizációja az agyban azt a feltételezést valószínűsítik, hogy a receptor-nak szerepe van a mozgás, az emlékezés, az érzelmek és a fájdalom moduláció szabályozásában más hatások mellett.

A következőkben a találmány részletes leírását adjuk.

Egy receptor létezése, és a kannabinoid aktivitáshoz megkívánt nagy szerkezeti követelmények egy fajlagos endogén kannabinoid ligandum jelenlétének valószínűségét jelzik. Endogén kannabinoid vegyületek nagy számának sorozatvizsgálatára agyból származó frakciók vizsgálatát végeztük el egy centrifugálós radioligandum kötési vizsgálat alkalmazásával. Próbaként tríciummal jelölt HU-234-t (11-hidroxi-hexahidrokannabinol-3-dimetil-heptil homológ) - amelynek K_d értéke patkány szinaptoszomális membránokban 45 pmól/l - alkalmaztunk. Sertés agy szerves oldószerben oldható extraktumát először lipidek elválasztásánál szokásosan alkalmazott módszerrel kromatografáltuk. A sertés agyakat kloroformban és/vagy metanolban homogenizáltuk és 13 000 x g mellett centrifugáltuk. A szerves oldószerben oldódó extraktumot

szilikagélen (Kieselgél 60, 70-230 mesh) frakcionáltuk a lipidek nagyobb osztályainak elválasztására alkalmazott elúciós sémát követve [C.C. Sweeley, *Methods Enzymol.* 14, 254 (1969); J.C. Dittmer és M.A. Wells, u.o., 482. oldal]. Az agyból izolált kezdeti frakciók közül számos gátolta a [^3H]HU-243 kötődését a kannabinoid receptorhoz. Különös figyelmet fordítottunk [^3H]HU-243 kötődésére a szilikonnal bevont polipropilén mikrocentrifuga-csővekhez, amelyekben a vizsgálatot végeztük. Szokásosan a beadagolt [^3H]HU-243 mintegy 15 - 20 %-a tapad a mikrocentrifuga csőhöz, ez a mennyiség kissé növekszik, ha jelzetlen kannabinoid hatóanyagok kiszorítják a radioligandumot a receptorról. Amikor a [^3H]HU-243 3-utas egyensúlyát követtük nyomon a szinaptoszomális receptorok, az oldat és a mikrocentrifuga-cső között, azt észleltük, hogy mindazok a nyers agy frakciók, amelyek gátolták a [^3H]HU-243 kötődését a receptorokhoz, ugyancsak gátolták a radioligandum kötődését a mikrocentrifuga-csőhöz. Néhány ígéretes frakciót tisztítottunk mind alacsony és közepes nyomású oszlopkromatográfiás eljárással, mind vékonyrétegkromatográfiás eljárással (TLC). A normál fázisú és a fordított fázisú rendszerek egy kombinációját alkalmaztuk. TLC: $R_f = 0,65$, analitikai RP-18 lemezen (Merck), kifejlesztőszer: metanol és diklór-metán 4:1 arányú elegye, kétszeri kifejlesztés, az első kifejlesztésnél az oldószerfront: 3,1 cm, a második kifejlesztésnél az oldószerfront: 7,4 cm [W.A. Devane, L. Hanus, Mechoulam, *Proceed. 5th Nordic Neuroscience Meet.*, Publ. Univ. Kuopio Med. 198. oldal (1991)]. Az anandamid szilícium-dioxid oszlopról (Kieselgél 60, 40-63 μm , Merck) metanol és kloroform 2:98 arányú elegyével eluálódik. Fordított fázisú oszlopról (RP-C, 40-63 μm , Sigma) metanol és víz 88:12 arányú elegyével eluálódik.

4,5 kg agyból 0,6 mg mennyiségben egy anandamid nevű vegyületet nyertünk, ez a vegyület TLC vizsgálatban egy foltot ad, és gázkromatográfiás (GC) vizsgálatban, detektorként tömegspektrométert alkalmazva többségében egy csúcsként eluálódik. Az anandamid a [^3H]HU-243 szinaptoszomális membránokhoz való fajlagos kötődését kompetitív ligandumokra jellemző módon gátolja, K_d értéke $52 \pm \text{nmól/l}$ ($n = 3$) (1. ábra). Ebben a rendszerben a $\Delta^9\text{-THC}$ K_D értéke $46 \pm 3 \text{ nmól/l}$.

Korábbi vizsgálataink eredményei - amelyekben (+)- és (-)-11-hidroxi-delta-8-tetrahidrokannabinol 1,1-dimetil-heptil-homológok gátló hatását hasonlítottuk össze egér vér- és nyirokedények elektromosan kiváltott rángási válaszára, azt jelzik, hogy ez a készítmény alkalmas modell pszichotróp kannabinoidok hatásmódjának vizsgálatára [R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, D.B. Elrick, R. Mechoulam, A.D. Corbett, Brit. J. Pharmacol, 105, 980 (1992)]. Az anandamid a rángási válasz koncentráció-függő gátlását váltja ki (2. ábra). A gátlás nem reverzibilis naloxonra (300 nmól/l). A gátlás mértéke összehasonlítható a receptorhoz való kötődés mértékével. Az anandamid szerkezetét tömegspektrometriás (MS) és magmágneses rezonancia (NMR) spektroszkópiás módszerekkel határoztuk meg. További adatokat nyertünk az anyag trimetil-szilil-(TMS)-származékának GC-MS és CID méréseiből. Az eredmények azt valószínűsítik, hogy az anandamid egy tetraén 20 szénatomos zsírsav etanolamidja.

A fenti szerkezet megerősítését adta az anandamidnak GC-MS körülmények között való viselkedése.

Hő-dehidratálás után elektron-ionizáció során (EI) m/z 329 M^+ ion és C1 alatt m/z 330 MH^+ ion jön létre. Mind az ön-C1 m/z 330

MH^+ , mind az m/z 329 M^+ képződik elektron ionizációs körülmények mellett ioncsapda berendezésben (3. ábra). A dehidratálási termékek fragmentálási mintája hasonló az EI tömegspektrum alacsony molekulatömeg tartományában anandamid és palmitil-etanol-amid esetén: m/z 85 (McLafferty átrendeződéses ion), és m/z 98 (egy γ -hasítás terméke) (4. ábra). A dehidratált palmitil-etanolamid EI tömegspektruma egy a δ -hasítási fragmentumnak megfelelő m/z 112 iont mutat. Ennek az ionnak a hiánya az anandamid GC-MS analízisében nyert EI tömegspektrumából azt a feltételezést kelti, hogy a tetraén sav első kettőskötése az 5-helyzetben van jelen (mint az arachidonil-etanolamidban, amelytől nem várható egy hasítási termék) (4. ábra).

Az 1H -NMR spektrumokat feljegyeztük. A kettőskötésű protonoknak tulajdonított csúcsok (δ , 5,30-5,45, mult) olyan protonok csúcsaival kapcsolódtak, amelyek kettős alliles protonok kémiai eltolódásaival bírnak (δ , 2,75-2,90, mult). Az ilyen kettős alliles protonok számos természetben előforduló csupa-cisz, nem-konjugált, többszörösen telítetlen zsírsavra, például linolsavra és az arachidonsavra jellemzők. Három proton párt észleltünk δ 2,01-2,27 között, ezeket két alliles metilénsoportnak és egy a karbonil egységhez képest α -helyzetben elhelyezkedő metilénsoportnak tulajdonítottuk. Ezen metilénsoportok közül csak egyiket észleltük (0,88, t). Azok a csúcsok, amelyeket két protonra észleltünk, 3,42-nél (N-CH, t), két protonra 3,72-nél (O-CH₂, t) és két protonra 2,20-nál (COCH₂, t) hasonlóak kémiai eltolódásuk és spin kapcsolódási mintájuk tekintetében azokhoz a csúcsokhoz, amelyeket szintetikus palmitil-etanolamid NMR spektrumában észleltünk. Az N-CH₂-re és az O-CH₂-re kapott csúcsok kapcsolódtak.

A fenti analitikai adatok összevetése arra a következtetésre vezetett bennünket, hogy az anandamid szerkezete az arachidonil-etanolamid szerkezet [5,8,11,14-ikozatetraénamid-(N-2-hidroxi-etil)-(mind-Z)], amely egy új kémiai egység. Ezt a következtetést szintézissel igazoltuk. Arachidonsavból és oxalil-kloridból (21) készült arachidonil-kloridot metilén-kloridban hozzáadtunk metilén-kloridban lévő 0 °C hőmérsékletű etanolaminhoz (tízszeres moláris feleslegben), nitrogéngáz atmoszféra alatt. 15 perc elteltével a reakcióelegyet vízzel mostuk, szárítottuk, és a terméket (amelyet mintegy 90 %-os hozammal kaptunk), szilícium-dioxid oszlopon kromatografáltuk (eluens: 2 % metanolt tartalmazó kloroform). Így 97 %-os tisztaságú (GC-MS alapján) arachidonil-etanolamidot nyertünk olaj formájában. A szintetikus arachidonil-etanolamid TLC, NMR (300 MHz) és GC-MS (retenciós idő és fragmentációs minta) alapján azonos volt az előzőek szerint nyert termékkel (3. ábra). A szintetikus anandamid kötődik a kannabinoid receptorhoz. $K_i = 39 \pm 5,0$ nmól/l ($n = 3$).

Az új tisztított anandamid vegyület az agy összetevőjének tűnik. Lehetséges, hogy ez a vegyület egy más vegyülettel komplex formájában, vagy más formában van jelen, de a találmány szerint megállapítottuk, hogy az itt anandamidként meghatározott vegyület az itt leírt tulajdonságok jellemzik. Hasonló vegyületeket, amelyeket itt meghatározunk, lényegében ekvivalens tulajdonságok jellemznek, ezek a találmány részét képezik.

Ezek a találmány szerinti vegyületek az (I) általános képlettel írhatók le. A képletben

R jelentése egy 16 - 28 szénatomos, 2 - 6 kettőskötéssel bíró többszörösen telítetlen zsírsav alkenil egysége, ahol előnyösen

minden kettőskötés cisz-konfigurációjú, az első kettőskötés a C-3, C-6 vagy C-9 helyzetben van a molekulának a nem-karboxil terminálisától számítva, és

R" jelentése -H, rövid szénláncú alkilcsoport, -OH vagy $-(CH_2)_n-OH$, ahol n értéke kis egész szám, és

ha R" jelentése hidrogénatom, R' jelentése rövid szénláncú alkilcsoport vagy $-(CH_2)_mOH$, ahol m jelentése kis egész szám, és

ha R" jelentése rövid szénláncú alkilcsoport, R' jelentése $-(CH_2)_p-OH$, ahol p jelentése kis egész szám, és

ha R" jelentése -OH, R' jelentése $-(CH_2)_q-OH$, ahol q jelentése kis egész szám, vagy

R' és R" mindegyike $-(CH_2)_n-OH$, ahol n jelentése kis egész szám,

valamint ezen vegyületek savaddíciós sói és komplexei.

A találmány az ilyen vegyületek izotóppal jelzett formájára is vonatkozik, ezek számos kutatási területen és vizsgálatokban alkalmazhatók.

A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti vegyületek valamelyikének hatékony mennyiségét tartalmazó gyógyászati készítmények is.

Az arachidonil-etanolamidra leírt szintetikus eljárást követve az alábbi telítetlen zsírsavak etanolamidjait állítottuk elő:

Szisztematikus név	Triviális név	Rövidített jelölés
9,12-oktadekadiénsav*	linolsav	18:2 (n-6)
6,9,12-oktadekatriénsav	δ -linolénsav	18:3 (n-6)
8,11,14-eikozatriénsav	homo- δ -linolénsav	20:3 (n-6)

Szisztematikus név	Triviális név	Rövidített jelölés
4,7,10,13,16-dokozapentaénsav	-	20:5 (n-6)
9,12,15-oktadekatriénsav	δ -linolénsav	18:3 (n-3)
5,8,11,14,17-eikozapentaénsav	-	20:5 (n-3)
4,7,10,13,16,19-dokozahexaénsav	-	22:6 (n-3)
5,8,11-eikozatriénsav	-	20:3 (n-9)

* A kettőskötések konfigurációja minden esetben cisz.

Ezek az etanolamid-származékok gyulladásgátló, analgetikus, glaukómaellenes és hányásgátló hatásúak (lásd a későbbiekben a biológiai eredményeknél). Annak érdekében, hogy a biológiai vizsgálatok szempontjából fontos ^{14}C -jelzett vegyületeket nyerjük, az előző szintetikus eljárást megismételtük ^{14}C -jelzett arachidonsavval, így 50 mCi/mmól ^{14}C -arachidonil-etanolamidot nyertünk. ^3H -arachidonsav alkalmazásával 150 Ci/mmól ^3H -arachidonil-etanolamidot állítottunk elő. ^{14}C -jelzett etanolamid alkalmazásával 50 mCi/mmól ^{14}C -arachidonil-etanolamidot állítottunk elő.

Az alábbiakban a biológiai vizsgálatok eredményeit ismertetjük.

Analgetikus hatás

A találmány szerinti vegyületeket a szokásos forró lemez tesztben vizsgáltuk.

Néhány jellemző vegyületre kapott eredményünket az I. táblázatban mutatjuk be. A vegyületeket detergensben (Emulphor: etanol:sóoldat 5:5:90 arányú elegye) oldottuk, és intravénás injekció formájában adtuk be a farki vénába 0,1 ml/10 g testtömeg injekció térfogatban.

Hányásgátló aktivitás

A találmány szerinti vegyületeket galambokban vizsgáltuk antineoplasztikus hatóanyag (ciszplatin) által kiváltott hányás ellen Feigenbaum és munkatársai [Eur. J. Pharmacol. 169, 159-165 (1989)] eljárásával. Néhány jellemző eredményt az I. táblázatban mutatunk be.

A találmány szerinti vegyületeket az analgetikus hatásnál az előzőekben leírt módon oldottuk, és szubkután adtuk be. Az injekció térfogata 1,0 ml/testtömeg kg.

Glaukóma elleni aktivitás

A vegyületek glaukóma elleni aktivitását is megvizsgáltuk a szembe adott δ -kimotripszin injekcióval kiváltott stabil glaukómában szenvedő [részleteiben leírva lásd az R. Mechoulam és munkatársai, On the therapeutic possibilities of some cannabinoids in "The Therapeutic Potential of Marihuana" (szerkesztők: S. Cohen, R.C. Stillman) Plenum Press, New York, 1975, 35-48. oldal szakirodalmi helyen] nyulakon. A vegyületek aktivitását pilokarpinéhoz (egy szokásos glaukómaellenes hatóanyag) hasonlítottuk, amely 0,01 %-os vizes oldatban csökkenti a szem belső nyomását, és a szem belső nyomásának az eredeti érték felére való visszatérését mintegy 30 órával késlelteti.

A zsírsav-etanolamidokat a szembe 0,1 %-os oldat formájában beadva kevésbé aktívnak bizonyultak, mint a pilokarpin, az eredeti szem belső nyomás érték felére való visszatérést 2 - 10 órával késleltették. A vegyületeket felhasználáshoz az analgetikus hatásnál leírtak szerint oldottuk, és tovább hígítottuk sóoldattal a kívánt koncentrációra.

Gyulladásgátló aktivitás

A vegyületeket Calhoun és munkatársai [Agents and Actions, 21, 306-a309 (1987)] módszerével vizsgáltuk. Kiszorító közegként higany helyett vizet alkalmaztunk. 1,0 µg PAF-t vagy 1,0 mg arachidonsavat 50 µl 5 % etanolt tartalmazó sóoldatban oldva szubkután injektáltuk be 20 - 25 g testtömegű nőstény egerek jobb hátsó mancsának talpi felületére. Az egereket ezen eljárás során éterrel anesztetizáltuk. A jobb láb térfogatát a laterális boka szintjéig vízkiszorítás alapján mértük a kezelés előtt, és a PAF injekció beadása után 15 perccel, vagy az arachidonsav injekció beadása után 30 perccel. A mancs térfogat változását minden egyes egernél kiszámítottuk. Eredményeinket a két vizsgált etanolamidra a II. táblázatban adjuk meg.

A hatásos dózis embernél 1 - 100 mg napi össz-dózis injekciós vagy orális adagolási mód mellett.

I. Táblázat

Analgetikus hatás és hányás csökkentése

Vegyület	Analgészia* ED ₅₀ (mg/kg)	Hányás csökkentés (50 %) (mg/kg)**
Arachidonil-etanolamid	4,2	2,5
5,8,11,14,17-eikozapentaenil-etanolamid	5,2	3,6
4,7,10,13,16,19-dokoza-hexaenil-etanolamid	6,1	4,8
5,8,11-eikozatrienil-etanolamid	7,6	6,2

* egérben. (Az adagolás részletei a szövegben szerepelnek).

** galambon. (Az adagolás részletei a szövegben szerepelnek).

II. Táblázat

Arachidonsav által kiváltott mancs ödéma gátlása ^{a,b}

Dózis (mg/kg)	Arachidonil- -etanolamid	4,7,10,13,16,19- -dokozaheptaenil- -etanolamid
0,010	56,2	-
0,025	58,4	-
0,050	74,2	52,4
0,100	98,0	66,8
0,250	100,0	72,0

- a A bemutatott eredmények mancs ödéma gátlását jelentik a hordozóanyaggal kezelt kontrollhoz viszonyítva százalékban. A szignifikancia 95 %-os ANOVA alapján. Egy vizsgálati csoport 5 egérből áll.
- b A kontroll egereknek orálisan 50 µl földimogyoróolajat adtunk. A mancs térfogat növekedése 38 ± 4 µl.

A következőkben az ábrák rövid leírását adjuk.

Az ábrák a találmány megvilágítását szolgálják.

Az 1. ábrán [³H]HU-243 kötődés kompetitív gátlását mutatjuk be természetes anandamiddal;

a 2. ábrán vér- és nyirok edények rángási válaszáinak gátlását mutatjuk be természetes anandamid hatására;

a 3. ábrán anandamid GC-MS spektruma látható;

a 4. ábra egyes találmány szerinti vegyületek szerkezetét mutatja;

az 5. ábra dehidratált homo- γ -linolenil-etanolamin (5) EI GC-MS spektruma;

a 6. ábra dehidratált dokozatetraenil-etanol-amin [(6) vegyület] EI GC-MS spektruma;

a 7. ábra homo- δ -linolenil-etanolamin (5) és dokozatetraenil-etanolamin (fent és lent) EI GC-MS spektruma;

8. ábra: az ábrán [^3H]HU-243 kompetitív kötését mutatjuk be az (5) képletű vegyület esetén négyzetekkel, a (6) képletű vegyület esetén háromszögekkel jelölve;

a 9. ábrán egyes találmány szerinti vegyületek képlete látható.

A következőkben az ábrák részletesebb magyarázatát adjuk.

1. ábra. [^3H]HU-243 kötésének kompetitív gátlása természetes anandamiddal. Szinaptoszomális membránokat készítünk agytörzs nélküli patkány teljes agyból (430-470 g testtömegű, Sprague-Dawley hím patkányok). A [^3H]HU-243-t (45-55 pmól/liter) a szinaptoszomális membránokkal (3-4 μg protein tartalmú) 90 percig 30 °C hőmérsékleten inkubálunk anandamid megjelölt koncentrációival vagy csak hordozóanyaggal (zsírsavmentes marha szérum albumin, 0,5 mg/ml végkoncentrációban). A kötött és szabad radioligandumot centrifugálással különítjük el (a vizsgálat teljes részleteinek leírása a 8. hivatkozásban szerepel). Az adatokat 100 %-os fajlagos kötődésre normalizáljuk, amit 50 nmól/l jelzetlen HU-243-val határozunk meg. A fajlagos kötődés a membránhoz kötött teljes radioaktivitás 77-82 %-a. Az adatpontok ($\square, \blacktriangle$) két független vizsgálat három párhuzamosának átlagát jelentik. A K_i értéket

($\text{átlag} \pm \text{SE}$, $n = 3$) Ligandum program alkalmazásával határoztuk meg, $K_i = 52 \pm 1,8 \text{ nmól/l}$).

2. ábra. Vér- és nyirokedények rángási válaszáinak gátlása természetes anandamiddal. MFI egerekből nyert vér- és nyirokedényeket 4 ml szilikontartalmú szervfürdőbe helyezünk 0,5 g kezdeti húzóhatás mellett. A fürdők Mg^{++} -mentes Krebs oldatot tartalmaznak, ezt 37°C hőmérsékleten tartjuk, és 95 % O_2 és 5 % CO_2 elegyét buborékoltatjuk át rajta. A szöveteket szupramaximálisan stimuláljuk 3 impulzus 0,5 s sorozatával (sorozat frekvencia 0,1 Hz, impulzus tartam: 0,5 ms). Az izometriás összehúzódásokat feljegyezzük. A természetes anandamidot Tween 80-ban és sóoldatban diszpergáljuk (lásd a 12. hivatkozást), és 40 μl térfogatban adagoljuk. A Tween 80 nem gátolja a rángási választ az alkalmazott maximális fürdőkoncentrációnál (0,63 $\mu\text{g/ml}$; $n = 6$).

3. ábra. Az anandamid GC-MS spektruma egy ion-csapda be rendezésén. Az anandamid az alkalmazott körülmények mellett (lásd a szövegben) hő-dehidratálódáson megy át, ennek folytán a fenti spektrum a megfelelő 2-oxazolin M^+ ionjának megfelelő.

4. ábra. Anandamid, palmitil-etanolamid és dihidro- és tetrahydro-oxazol ionfragmentumok szerkezete, amelyek ezen zsírsav-etanolamidokból GC-MS körülményei mellett lezajló hődehidratálódáskor képződnek (lásd a szövegben). Az m/z 112 ion csak palmitil-etanolamidból képződött.

Agyból izolált és szintetizált vegyületek

A vegyület neve

K_i

(nmól/l)

cisz-7,10,13,16-dokozatetraenoil-etanolamid $34,4 \pm 3,2$

anandamid	$39,0 \pm 5,0$
homo- τ -linolenoil-etanolamid	$53,4 \pm 5,5$

Szintetikusan előállított és vizsgált vegyületek

A vegyület neve	K_i (nmól/l)
N-propil-5,8,11,14-eikozatetraenoil-amid	$11,7 \pm 2,6$
N-etil-5,8,11,14-eikozatetraenoil-amid	$34,0 \pm 2,7$
N-metil-5,8,11,14-eikozatetraenoil-amid	$60,0 \pm 7,4$
arachidonoil- β -dimetil-etanolamid	$161,8 \pm 34,1$

(5) képletű vegyület (M = 349)

Elemzési eredmények a $C_{22}H_{39}NO_2$ képlet alapján:

Számított:	C % = 75,59;	H % = 11,25;	N % = 4,01;
Talált:	C % = 75,85;	H % = 11,01;	N % = 3,80.

(6) képletű vegyület (M = 375)

Elemzési eredmények a $C_{24}H_{41}NO_2$ képlet alapján:

Számított:	C % = 76,75;	H % = 11,00;	N % = 3,73;
Talált:	C % = 76,92;	H % = 11,34;	N % = 3,60.

Izolált és/vagy előállított aktív telítetlen acil-etanolamidok

A vegyület neve	K_i (kötődés receptorokhoz) (nmól/l)
cisz-5,8,11,14-eikozatetraenil- -etanolamid (anandamid)	$39,0 \pm 5$
20:4 (n-6) savból szintetikusan és agyból, (1) képletű vegyület;	

cisz-7,10,13,16-dokozatetraenil- -etanolamid, 22:4 (n-6) savból szintetikusan és agyból, (6) képletű vegyület;	34,4 ± 3,2
homo- γ -linolenil-etanolamid (cisz- -8,11,14-eikozatrienil-etanolamid) (cisz-8,11,14-eikozatriénsavból [20:3 (n-6)] szintetikusan és agyból, (5) képletű vegyület;	53,4 ± 5,5
cisz-4,7,10,13,16,19-dokoza- hexaenil-etanolamid (22:6 (n-3) savból, (7) képletű vegyület;	328,9
cisz-11,14-eikozadienil-etanol- amid, 20:2 (n-6) savból, (8) képletű vegyület;	1,5 μ mól/l
γ -linolenil-etanolamid (cisz- -6,9,12-oktadekatrienil-etanol- amid), cisz-6,9,12-oktadeka- triénsavból [18:3 (n-6)], (9) képletű vegyület.	4,6 ± 0,3 μ mól/l

A találmány szerinti vegyületek hatásos mennyiségét hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítmények különféle farmakológiai hatásokkal bírnak. Ezek között említhetjük a gyulladásgátló, asztmaellenes, analgetikus, glaukómaellenes, migrénellenes, és görcsoldó hatásokat. A vegyületek hangulatfokozó hatással is bírnak, továbbá szklerózis multiplex tüneteit enyhítik. Az egységdózis forma a vegyülettől és a gyógyászati alkalmazástól függően válto-

zó, általában mintegy 1 mg és mintegy 100 mg közötti. Előnyösen a hatóanyagtartalom egységdózis formánként mintegy 5 - 25 mg.

Irodalmi hivatkozások

1. Devane, W.A. és munkatársai, Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R.; Isolation and Structure of a Brain Constituent that Binds to the Kannabinoid Receptor. Science, **258**, 1946-1949 (1992);
2. Fride, E.; Mechoulam, R.; Pharmacological Activity of the Kannabinoid Agonist Anandamide, a Brain Constituent. Eur. J. Pharmacol. **231**, 313-314 (1993);
3. Vogel, Z.; Barg, J.; Levy, R.; Saya, D.; Heldman, E.; Mechoulam, R. Anandamide, a Brain Endogenous Compound, Interacts Specifically with Kannabinoid Receptors and Inhibits Adenylate Cyclase. J. Neurochem. (nyomdában);
4. Bachur, N.R.; Masek, K. ; Melmon, K.L.; Udenfriend, S. Fatty Acid Amides of Ethanolamine in Mammalian Tissues. J. Biol. Chem., **240**, 1019-1024 (1965);
5. Agranoff, B.W. az In Basic Neurochemistry; szerkesztők: Seigel G., Agranoff, B.; Albers, R.W., Molinoff, P.; a Raven Press: New York, 1989 szakirodalmi helyen;
6. Devane, W.A. és munkatársai, Breuer, A.; Jarbe, T.U.C.; Eisen, M.; Mechoulam, R.; A Novel Probe for the Kannabinoid Receptor. J. Med. Chem., **35**, 2065-2069 (1992).

Szabadalmi igénypontok

1. Lényegében tiszta (I) általános képletű vegyületek - a képletben

R jelentése egy 16 - 28 szénatomos, 2 - 6 kettőskötéssel bíró többszörösen telítetlen zsírsav alkenil egysége, ahol előnyösen minden kettőskötés cisz-konfigurációjú, az első kettőskötés a C-3, C-6 vagy C-9 helyzetben van a molekulának a nem-karboxil terminálisától számítva, és

R" jelentése -H, rövid szénláncú alkilcsoport, -OH vagy $-(CH_2)_n-OH$, ahol n értéke kis egész szám, és

ha R" jelentése hidrogénatom, R' jelentése rövid szénláncú alkilcsoport vagy $-(CH_2)_mOH$, ahol m jelentése kis egész szám, és

ha R" jelentése rövid szénláncú alkilcsoport, R' jelentése - $-(CH_2)_p-OH$, ahol p jelentése kis egész szám, és

ha R" jelentése -OH, R' jelentése $-(CH_2)_q-OH$, ahol q jelentése kis egész szám, vagy

R' és R" mindegyike $-(CH_2)_n-OH$, ahol n jelentése kis egész szám,

valamint ezen vegyületek savaddíciós sói és komplexei.

2. Egy az 1. igénypont szerinti vegyület, azzal jellemezve, hogy alkenil egysége oktadekadiénsav, oktadekatriénsav, eikozapentaénsav, dokozaheksaénsav, eikozatriénsav vagy eikozatetraénsav egység.

3. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely arachidonil-etanolamid, cisz-7,10,13,16-dokozatetraenoil-etanolamid, homo- δ -linolenoil-etanolamid, N-propil-5,8,11,14-eikozatetraenoil-amid, N-

-etil-5,8,11,14-eikozatetraenoil-amid, N-metil-5,8,11,14-eikozatetraenoil-amid vagy arachidonoil- β -dimetil-etanolamid.

4. Gyulladásgátló, asztmaellenes, analgetikus, hányásgátló, glaukómaellenes, migrénellenes, görcsoldó, hangulatjavító és szklerózis multiplex tüneteit enyhítő gyógyászati készítmény, amely hatóanyagként az 1, 2 vagy 3. igénypontok bármelyike szerinti hatóanyag hatásos mennyiségét tartalmazza.

5. A 4. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy hatóanyagként a 3. igénypont szerinti vegyületet tartalmazza.

6. A 4. vagy 5. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy humán adagolásra szolgáló egységdózisa mintegy 1 mg és mintegy 100 mg közötti mennyiségű hatóanyagot tartalmaz.

7. Az 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti vegyület radioaktívan jelzett formája.

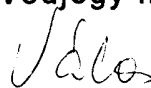
8. Egy a 7. igénypont szerinti vegyület, ahol a radioaktív jelzés ^3H vagy ^{14}C .

9. Agyban lévő kannabinoid receptorhoz való kötődésre szolgáló készítmény, azzal jellemezve, hogy az 1., 2. vagy 3. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet tartalmazza.

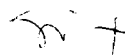
A meghatalmazott:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.



Válas Györgyné dr.

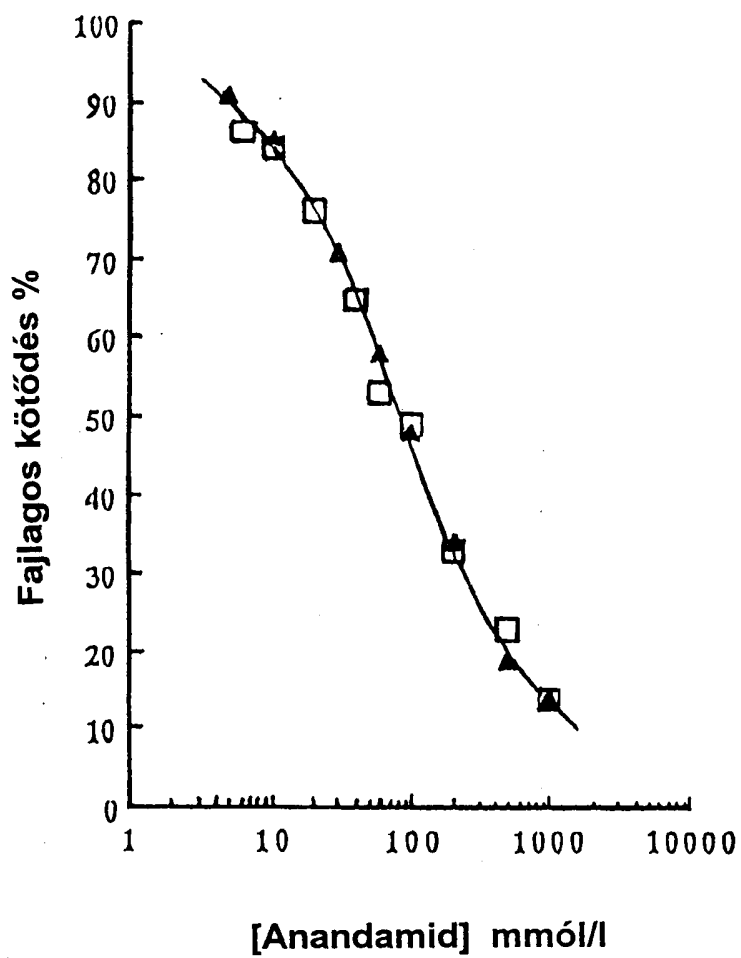


Készítette
pál

34.702

P 95 01561

8/1

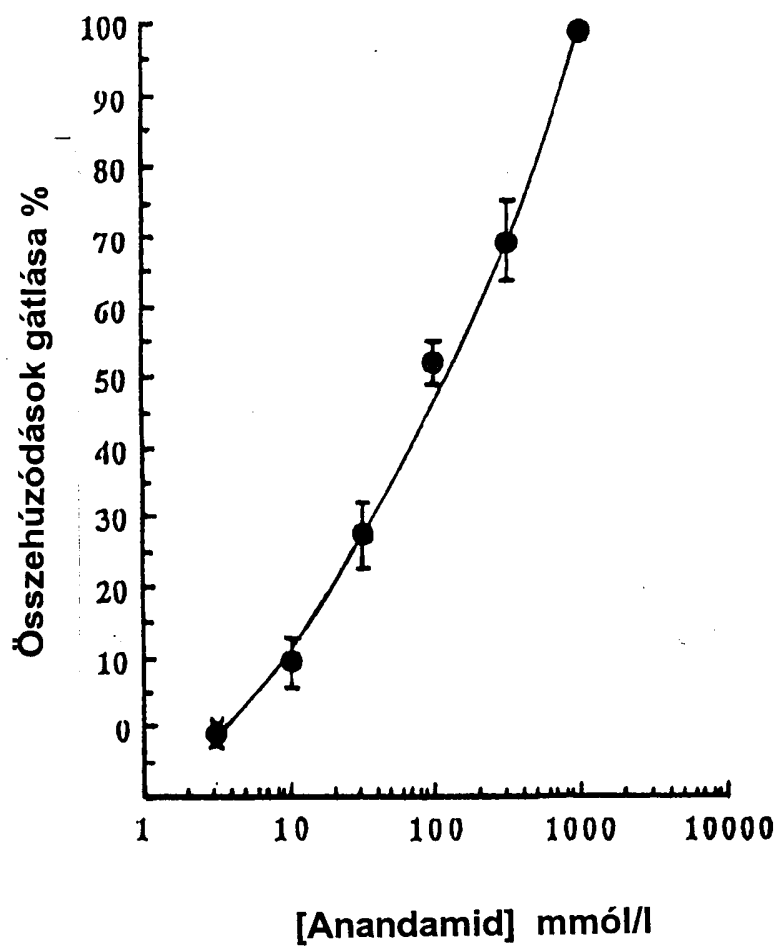


1. ábra

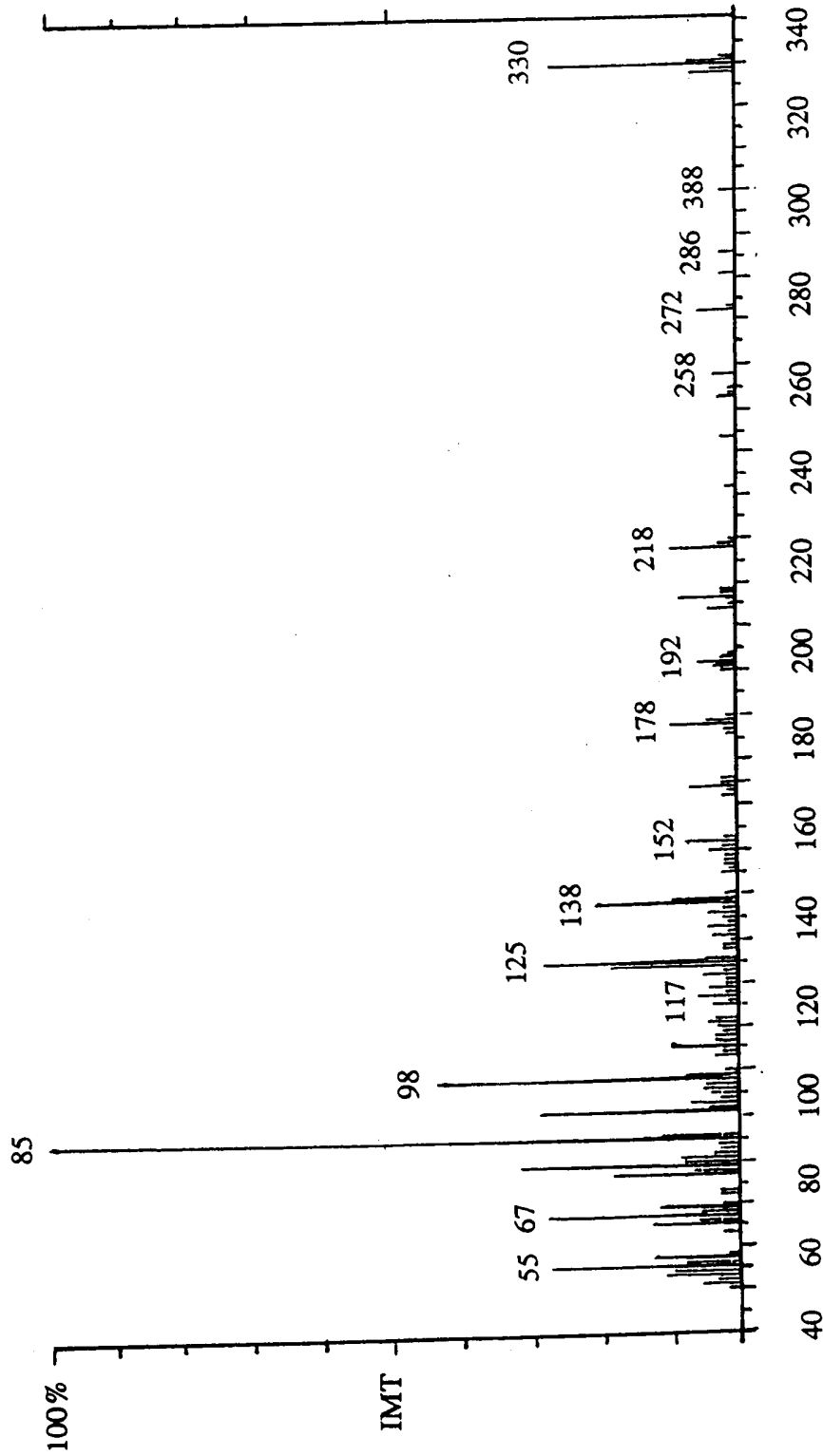
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
7.

[Signature]

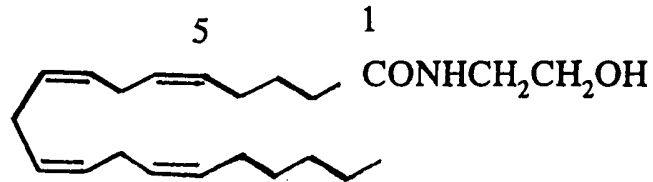
[Signature]



2. ábra



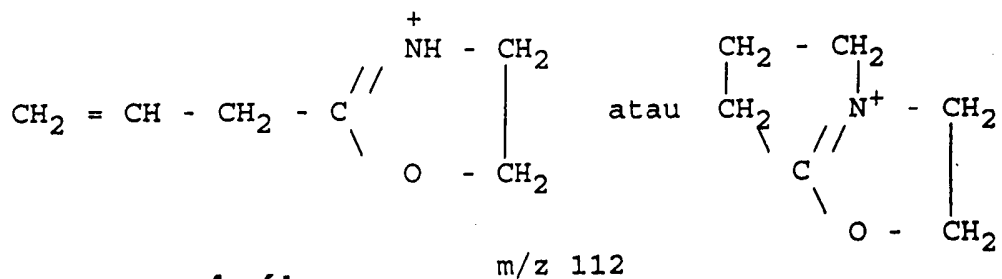
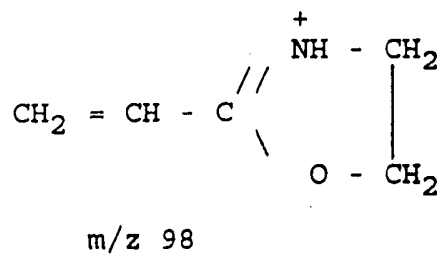
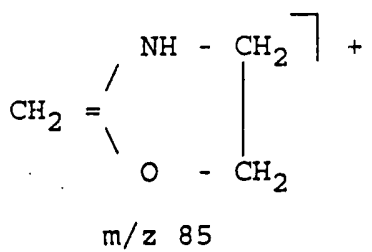
3. ábra



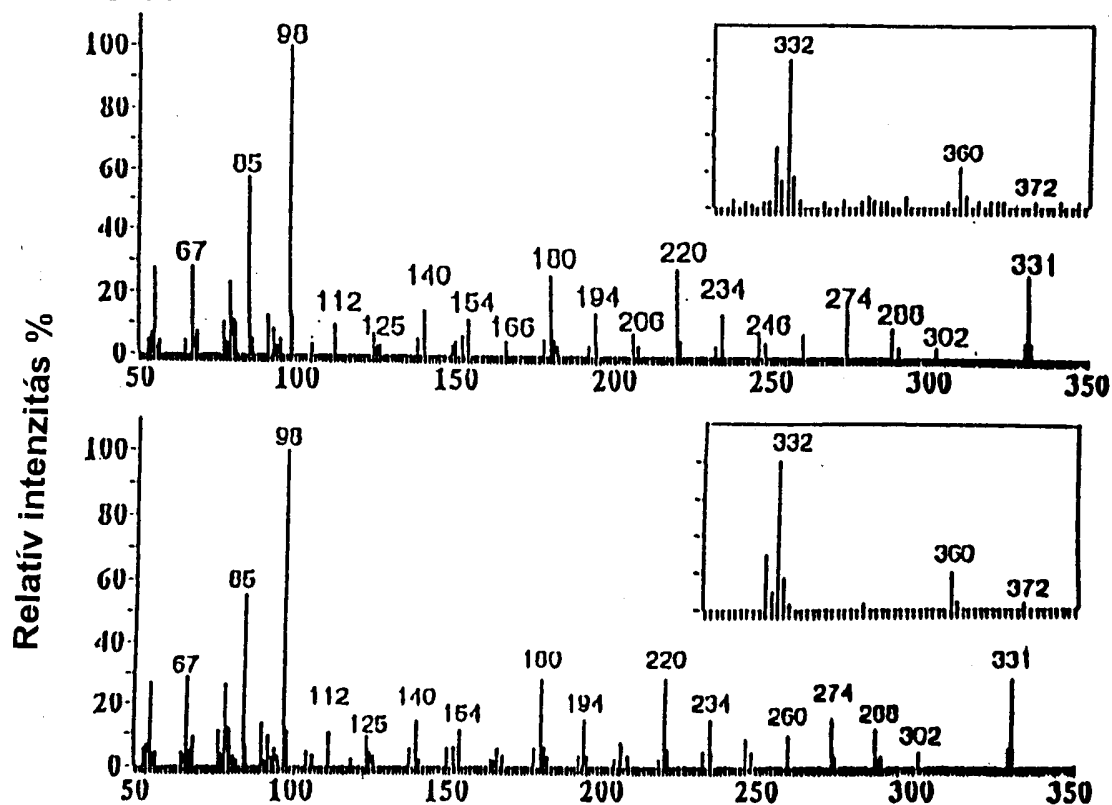
Arachidonil-etanolamid (anandamid)



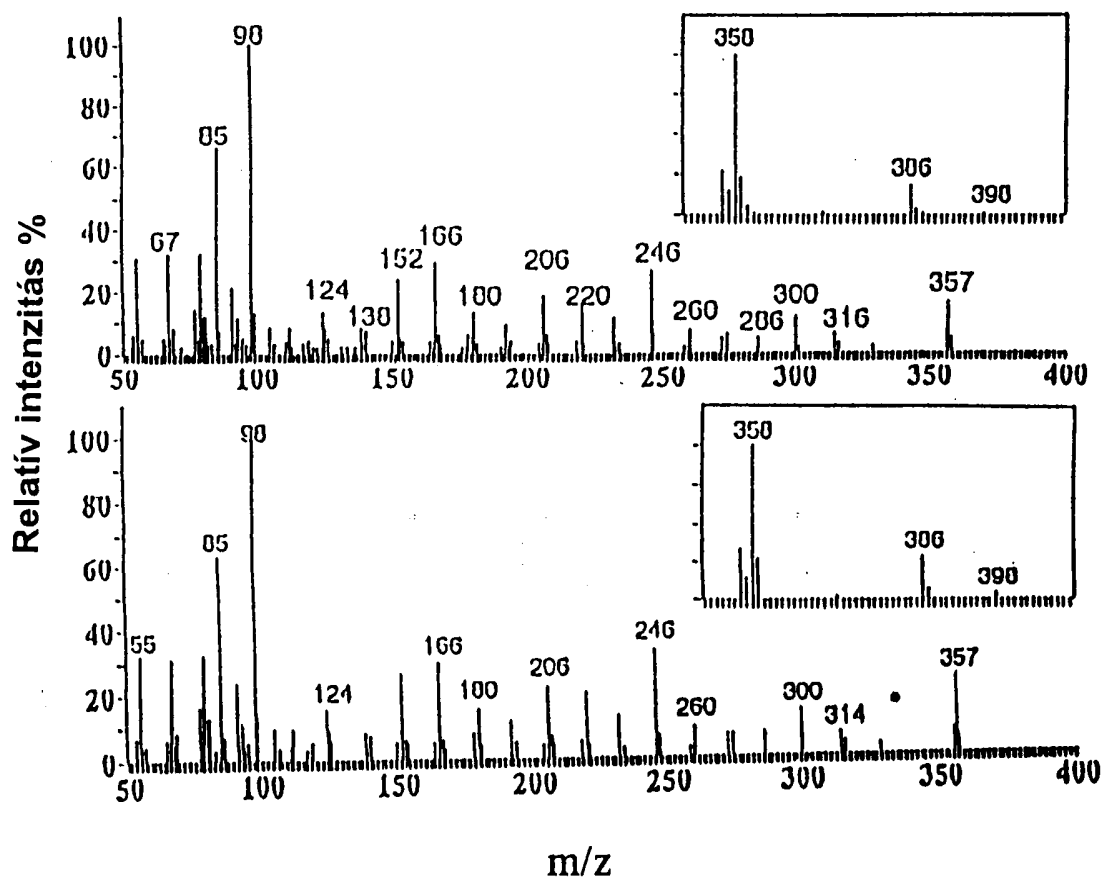
Palmitil-etanolamid



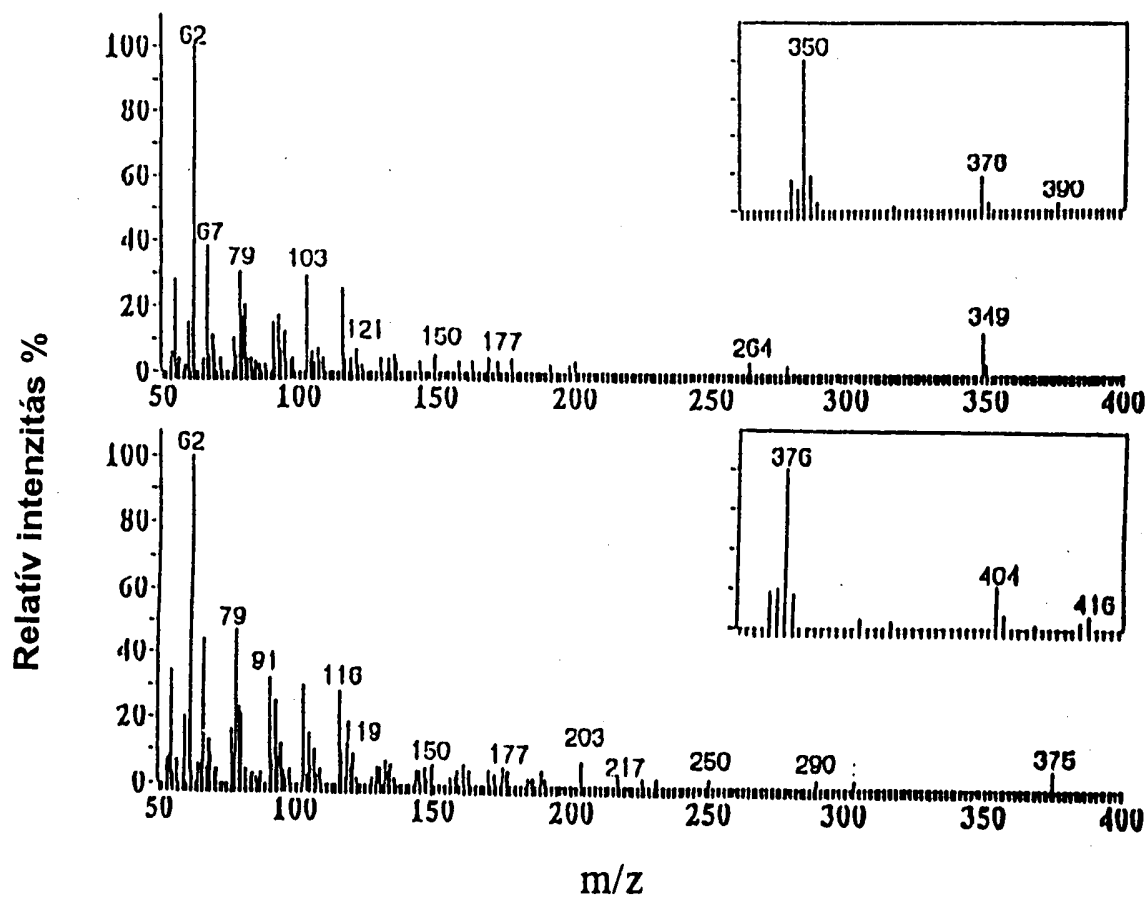
4. ábra



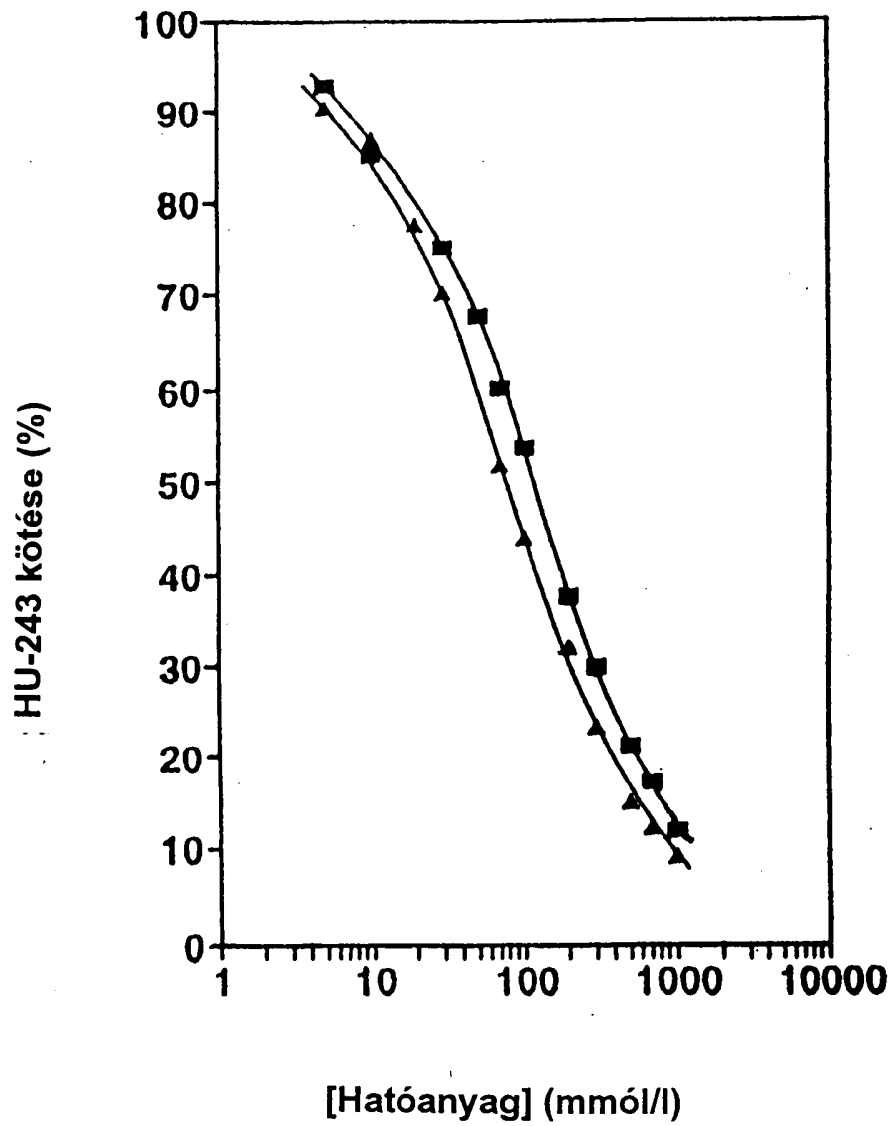
5. ábra m/z



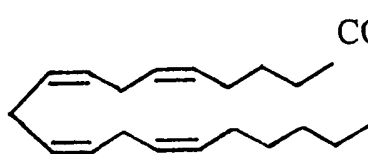
6. ábra



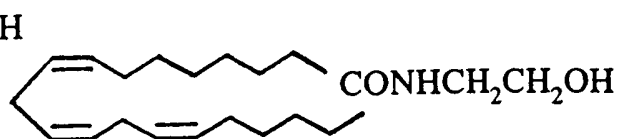
7. ábra



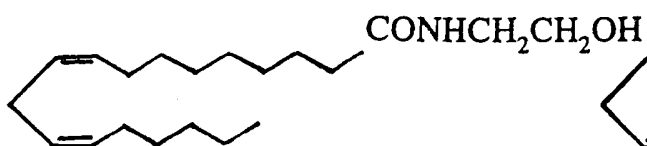
8. ábra



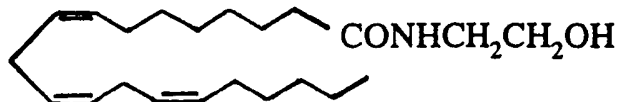
anandamid
(1)



linolenil-etanolamid
(4)



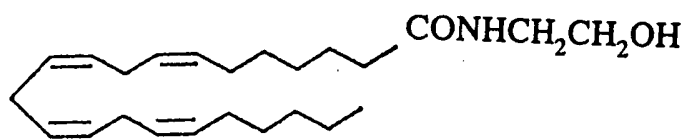
linolenil-etanolamid
(3)



homo- -linolenil-etanolamid
(5)



palmitil-etanolamid
(2)



dokozatetraenil-etanolamid
(6)

9. ábra