



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 039 T2** 2007.06.21

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 021 406 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 039.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/09613**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 927 958.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/045407**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.05.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **04.12.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **29.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.06.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07D 207/46** (2006.01)

**A61K 31/165** (2006.01)

**A61K 31/10** (2006.01)

**A61K 31/40** (2006.01)

**C07C 239/22** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**658949 31.05.1996 US**

(73) Patentinhaber:

**The University of Connecticut, Storrs, Conn., US**

(74) Vertreter:

**Müller Schupfner, 21244 Buchholz**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**CH, DE, ES, FI, FR, GB, IE, IT, LI, NL, SE**

(72) Erfinder:

**MAKRIYANNIS, Alexandros, Willimantic, CT  
06226, US; LIN, Sonyan, Storrs, CT 06268, US;  
HILL, Adam, William, Ashford, CT 06268, US**

(54) Bezeichnung: **ANANDAMID-AMIDASEINHIBITOREN ALS ANALGETIKA**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Hintergrund

**[0001]**  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, das in Marihuana enthaltende psychoaktive Cannabinoid, bindet an den CB1-Rezeptor im Gehirn und an den CB2-Rezeptor in der Milz. Von Verbindungen, die den CB1-Rezeptor stimulieren, ist gezeigt worden, dass sie Analgesie und Sedation induzieren und die Stimmung heben, Übelkeit und Appetit kontrollieren und den Innenaugendruck senken (Mechoulam, Cannabinoids as Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL (1986), Fride und Mechoulam, Eur. J. Pharmacol. 231:313 (1993), Crawley et al., Pharmacol. Biochem. Behav. 46:967 (1993) und Smith et al., J. Pharm. Exp. Therap. 270:219 (1994)). Von Cannabinoiden ist ebenfalls gezeigt worden, dass sie das Immunsystem supprimieren (Mechoulam, Cannabinoids as Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL (1986)). Folglich sind Verbindungen, die den CB1- oder CB2-Rezeptor direkt oder indirekt stimulieren, bei der Behandlung des Glaukoms, Prävention der Gewebeabstoßung bei Organ-transplantierten Patienten, Kontrolle der Übelkeit bei Patienten, die eine Chemotherapie erhalten, Schmerzkontrolle und Verstärkung des Appetits und Schmerzkontrolle bei Individuen mit einem AIDS-Wasting-Syndrom möglicherweise zweckdienlich.

**[0002]** Arachidonylethanolamid (Anandamid) ist ein natürlich vorkommender Stoff im Gehirn, der als ein CB1- und CB2-Agonist wirkt und eine mit Cannabinoiden vergleichbare pharmakologische Aktivität in Mäusen zeigt (Fride und Mechoulam, (1993), Crawley et al. (1993) und Smith et al. (1994)) Anandamid wird in vivo von der Anandamid-Amidase gespalten. Folglich besitzen Inhibitoren der Anandamid-Amidase eine indirekt stimulierende Wirkung auf die CB1- und CB2-Rezeptoren durch eine Erhöhung von Anandamid-Levels in vivo.

**[0003]** Zusätzlich zur Wirkung auf CB1- und CB2-Rezeptoren beeinflussen Cannabinoide ebenfalls Zellmembranen, wobei sie dadurch unerwünschte Nebenwirkungen, wie Schläfrigkeit, Beeinträchtigung der Monoaminoxidase-Funktion und Beeinträchtigung der nicht Rezeptor-vermittelten Gehirnfunktion, hervorrufen. Ebenfalls begrenzen die suchterzeugenden und psychotropen Eigenschaften von Cannabinoiden ihren therapeutischen Wert. Von Inhibitoren der Anandamid-Amidase wird nicht erwartet, dass sie die unerwünschten Membran-bezogenen Nebenwirkungen besitzen, die von Cannabinoiden hervorgerufen werden. Durch die Bereitstellung eines alternativen Mechanismus für eine Stimulierung des CB1- und CB2-Rezeptors dürften Anandamid-Inhibitoren nicht die suchterzeugenden und psychotropen Eigenschaften der Cannabinoide aufweisen. Allerdings besitzen die gegenwärtigen Inhibitoren der Anandamid-Amidase Nachteile. Zum Beispiel ist Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) für Zellen toxisch. Folglich besteht ein Bedarf an neuen und stärkeren Inhibitoren der Anandamid-Amidase, die eine verminderte Toxizität für Zellen aufweisen und die nicht signifikant mit dem CB1- oder CB2-Rezeptor bei hemmenden Konzentrationen wechselwirken.

## Zusammenfassung der Erfindung

**[0004]** Es ist jetzt festgestellt worden, dass langkettige Fettsäuren und aromatische Säureanaloge von langkettigen Fettsäuren mit Kopfgruppen, die in der Lage sind, an eine nucleophile Gruppe an einer aktiven Stelle des Enzyms irreversibel zu binden, starke Inhibitoren der Anandamid-Amidase sind. Zum Beispiel wurde von Palmitylsulfonylfluorid festgestellt, dass es den Gehalt an nicht abgebautem Anandamid um das 55fache mit 10 nM in intakten Neuroblastomzellen erhöht (Beispiel 1) und deshalb mehr um das 100fache stärker als Phenylmethylsulfonylfluorid bei der Hemmung der Anandamid-Amidase ist. Gleichzeitig besitzen die hier offen gelegten Inhibitoren eine geringe Affinität für den CB1-Rezeptor (Beispiel 3). Zum Beispiel ist die Bindungsaffinität von Phenylmethylsulfonylfluorid für den CB1-Rezeptor etwa 10mal geringer als von Anandamid. Zusätzlich ist festgestellt worden, dass Phenylmethylsulfonylfluorid einige der gleichen pharmakologischen Wirkungen in Ratten wie Verbindungen hervorruft, die den CB1-Rezeptor direkt stimulieren, wie  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol. Zum Beispiel ist hier von Phenylmethylsulfonylfluorid gezeigt worden, dass es eine Analgesie in Ratten hervorruft (Beispiel 4). Basierend auf diesen Ergebnissen werden Verfahren zur Hemmung von Anandamid-Amidase in einem Individuum oder Tier offen gelegt, wobei dadurch die CB1- und CB2-Rezeptoren stimuliert werden. Ebenfalls werden neuartige Verbindungen offen gelegt, welche die Anandamid-Amidase hemmen.

**[0005]** Die vorliegende Anmeldung beschreibt ein Verfahren zur Hemmung der Anandamid-Amidase in einem Individuum oder Tier. Das Verfahren umfasst Verabreichen an das Individuum oder Tier einer therapeutisch wirksamen Menge einer Verbindung, dargestellt mit der Strukturformel I:

R-X-Y

und physiologisch verträglicher Salze davon.

**[0006]** R ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Methylgruppe, einer Arylgruppe, einer substituierten Arylgruppe, einer Heteroarylgruppe mit 5 bis 6 Ringatomen, einer substituierten Heteroarylgruppe, einer heterocyclischen Gruppe und einer substituierten heterocyclischen Gruppe.

**[0007]** X ist eine geradkettige Kohlenwasserstoffgruppe oder eine substituierte geradkettige Kohlenwasserstoffgruppe, die etwa 4 bis etwa 18 Kohlenstoffatome enthält, falls R eine Arylgruppe, eine substituierte Arylgruppe, eine Heteroarylgruppe, eine substituierte Heteroarylgruppe, eine heterocyclische Gruppe oder eine substituierte heterocyclische Gruppe ist.

**[0008]** X ist eine Kohlenwasserstoffgruppe oder eine substituierte Kohlenwasserstoffgruppe, die etwa 10 bis etwa 24 Kohlenstoffatome enthält, falls R eine Methylgruppe ist.

**[0009]** Y ist ein Rest, wie er später auf Seite 7 beschrieben wird, der in der Lage ist, mit einer nucleophilen Gruppe an der aktiven Stelle eines Amidaseenzyms zu binden.

**[0010]** Die hier offen gelegten Verbindungen besitzen einen therapeutischen Nutzen. Zum Beispiel können die Verbindungen der Formel I der vorliegenden Erfindung, wie Cannabinoide, den Schmerz lindern, der von Krebs und von einer Krebstherapie herrührenden Übelkeit verursacht wird. Es wird nicht erwartet, dass sie unerwünschte, Membran-bezogene Nebenwirkungen besitzen, die mit Cannabinoiden verbunden sind. Zusätzlich wird erwartet, dass die Verbindungen der Formel I immunsuppressiv sind und deshalb zur Prävention einer Organabstoßung bei einem Individuum eingesetzt werden können, bei denen ein Organ transplantiert worden ist. Weil die Verbindungen der Formel I der vorliegenden Erfindung den Appetit eines Individuums verstärken, können sie in der Herstellung eines Medikaments zum Gebrauch bei der Behandlung von Patienten mit einem AIDS-Wasting-Syndrom, die oft an einer Unterernährung als Folge des Appetitverlusts leiden, verwendet werden.

**[0011]** Die neuartigen Anandamid-Amidaseinhibitoren, die hier offengelegt sind, haben auch in der Forschung ihren Nutzen. Zum Beispiel können sie zur Aufrechterhaltung des Anandamid-Levels in vitro verwendet werden, um die Wirkung von Anandamid auf Zellen zu untersuchen, und zur Aufrechterhaltung des Anandamid-Levels in vivo verwendet werden, um die Wirkung von Anandamid auf Individuen und Tiere zu untersuchen. Sie können zur Charakterisierung von Zellen verwendet werden, zum Beispiel um zu bestimmen, ob eine Zelle eine cannabimimetische Aktivität oder Amidase-Aktivität besitzt. Zum Beispiel können die Inhibitoren verwendet werden, um zu bestimmen, ob eine Zellpopulation Anandamid-Amidase exprimiert, indem die Zellen mit einem Inhibitor in Kontakt gebracht werden und dann bestimmt wird, ob die Anandamid-Konzentration zunimmt. Die hier offen gelegten Anandamid-Inhibitoren können ebenfalls als eine Hilfe beim Wirkstoffdesign verwendet werden, zum Beispiel als eine Kontrolle in Assays, in denen andere Verbindungen auf ihre Fähigkeit getestet werden, Anandamid-Amidase zu hemmen und die Voraussetzungen für die Strukturaktivität von Anandamid-Inhibitoren zu bestimmen.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

**[0012]** [Fig. 1](#) ist ein Schaubild, das die Wirkung von Palmitylsulfonylfluorid und Phenylmethylsulfonylfluorid auf Anandamid-Levels in Neuroblastomzellen (N18TG2) zeigt.

**[0013]** [Fig. 2A-Fig. 2E](#) sind Schaubilder, die die IC<sub>50</sub>-Werte für die Inhibition der Anandamid-Amidase von (A) Laurylsulfonylfluorid; (B) Myristylsulfonylfluorid; (C) Palmitylsulfonylfluorid; (D) Stearylulfonylfluorid; (E) Arachidylsulfonylfluorid zeigen.

**[0014]** [Fig. 3](#) ist ein Schaubild, das die logarithmischen Dosis-Antwort-Kurven für Palmitylsulfonylfluorid (K; ist 350,4), Arachidonyltrifluormethyl (K; ist 1325) Keton und Arachidonoylethanolamid (K; ist 70,03) in Konkurrenz mit CB1-bindendem [<sup>3</sup>H]CP-55940 zeigt.

**[0015]** [Fig. 4](#) ist ein Schaubild, das die Wirkung von Anandamid, Palmitylsulfonylfluorid und Co-Verabreichung von Anandamid und Palmitylsulfonylfluorid auf die Zeit, die eine leicht benommene Maus für das Wegziehen ihres Schwanzes von einem Strahlungswärmestimulus braucht („Ratten-Flick-Test“), gemessen in Prozent des maximal möglichen Effekts zeigt.

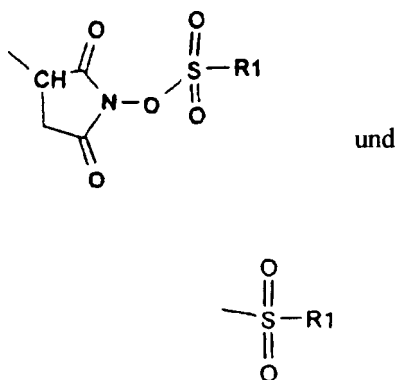
## Genaue Beschreibung der Erfindung

**[0016]** Die Hemmung der Anandamid-Amidase führt zu erhöhten Levels von Anandamid in dem Individuum oder Tier, wobei dadurch eine erhöhte Stimulation von Cannabinoid-Rezeptoren in dem Individuum oder Tier, z.B. des CB1-Rezeptors im Gehirn oder des CB2-Rezeptors in der Milz, verursacht wird. Folglich sind Verbindungen der Formel I gemäß der vorliegenden Erfindung in der Lage, Cannabinoid-Rezeptoren in einem Individuum oder Tier zu stimulieren.

**[0017]** „Y“ in der Strukturformel I ist ein weiter unten beschriebener Rest, der in der Lage ist, irreversibel mit einer nucleophilen Gruppe an der aktiven Stelle eines Amidaseenzyms zu binden. Folglich ist Y in der Lage, eine stabile kovalente Bindung mit der nucleophilen Gruppe an der aktiven Stelle eines Amidaseenzyms zu bilden. Strukturen für Y umfassen deshalb keine Reste, wie Trifluormethylketone, die in der Lage sind, als ein Analogon des Übergangszustands eines Amidaseenzyms zu dienen, und die reversibel an diese Enzyme binden. Wie hier verwendet, ist eine „Amidase“ ein Enzym, das an der Hydrolyse einer Amidbindung beteiligt ist.

**[0018]** Eine nucleophile Gruppe an der aktiven Stelle eines Amidaseenzyms ist eine Heteroatom-enthaltende funktionelle Gruppe an der Seitenkette einer Aminosäure, die an der aktiven Stelle vorgefunden wird und die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin, die Thiolgruppe von Cystein, die Phenolgruppe von Tyrosin und die Aminogruppe von Lysin, Ornithin oder Arginin oder die Imidazolgruppe von Histidin umfasst.

**[0019]** Die Strukturen für Y sind:



**[0020]** R1 ist aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus -F und -O(C1 bis C4 gerad- oder verzweigt-kettige Alkylgruppe).

**[0021]** Wie hier verwendet, umfasst „eine geradkettige Kohlenwasserstoffgruppe“ ein Polyalkylen, d.h.  $-(CH_2)_n-$ . „n“ ist eine positive ganze Zahl von etwa 10 bis etwa 24, wenn R Methyl ist, und von etwa 4 bis etwa 18, wenn R Aryl, substituiertes Aryl, Heteroaryl, substituiertes Heteroaryl, heterocyclisch oder substituiert heterocyclisch ist. Eine geradkettige Kohlenwasserstoffgruppe umfasst ebenfalls zwei oder mehrere Polyalkylen-gruppen, die über eine oder mehrere Ether-, Thioetherether-, cis-Alkenyl-, trans-Alkenyl- oder Alkynyl-Bindung verbunden sind, so dass die Gesamtzahl an Methylen-Kohlenstoffatomen von etwa 10 bis etwa 24 reicht, wenn R Methyl ist, und von etwa 4 bis 18 reicht, wenn R Aryl, substituiertes Aryl, Heteroaryl, substituiertes Heteroaryl, heterocyclisch oder substituiert heterocyclisch ist. Beispiele umfassen  $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2)_m-CH=CH-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2)_m-C\equiv C-(CH_2)_o-$ , worin m und o jeweils eine positive ganze Zahl sind, so dass die Summe von m und o gleich n ist. Spezifische Beispiele umfassen, wo X  $-(CH_2)_4-(cis-CH=CHCH_2)_4-CH_2CH_2-$ ,  $-(CH_2)_4-(cis-CH=CHCH_2)_3-(CH_2)_5-$  ist und wo R-X- ein Docosatetraenyl- oder ein homo- $\gamma$ -Linolenyl-Rest ist.

**[0022]** Bei einem Aspekt der vorliegenden Erfindung ist R in der Verbindung, die für eine Hemmung der Anandamid-Amidase verabreicht werden soll, Methyl und Y ist ein Sulfonylfluorid oder ein C1 bis C4 gerad- oder verzweigt-kettiger Sulfonylester. Vorzugsweise ist Y ein Sulfonylfluorid. Spezifische Beispiele für Sulfonylfluoride und Sulfonylester umfassen, wo R-X- Arachidyl,  $\Delta^8$ ,  $\Delta^{11}$ ,  $\Delta^{14}$ -Eicosatrienyl, Docosatetraenyl, homo- $\gamma$ -Linolenyl ist und  $-CH_3-(CH_2)_n-$ , wo n 10 (Lauryl), 11, 12 (Myristyl), 13, 14 (Palmityl), 15 oder 16 (Stearyl) ist.

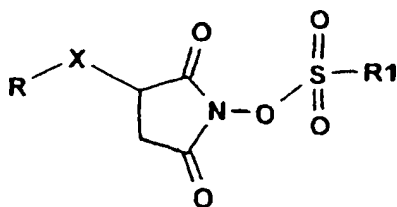
**[0023]** Wie hier verwendet, ist eine „Aryl“-Gruppe ein carbocyclisches aromatisches Ringsystem, wie Phenyl, 1-Naphthyl oder 2-Naphthyl. Eine „Heteroaryl“-Gruppe ist ein aromatisches Ringsystem, das ein oder mehrere Heteroatome enthält, wie Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel. Beispiele für Heteroarylgruppen umfassen 2-Furanyl, 3-Furanyl, 2-Thienyl, 3-Thienyl, 2-Pyridinyl, 3-Pyridinyl, 4-Pyridinyl, 2-Pyrimidinyl, 4-Pyrimidinyl,

5-Pyrimidinyl, 3-Pyrazolyl, 4-Pyrazolyl, 5-Pyrazolyl, 2-Pyrazinyl, 2-Imidazolyl, 4-Imidazolyl, 1-Pyrrolyl, 2-Pyrrolyl, 2-Oxazolyl, 4-Oxazolyl, 5-Oxazolyl, 2-Thiazolyl, 4-Thiazolyl, 5-Thiazolyl. „Heteroaryl“-Gruppen umfassen ebenfalls fusionierte polycyclische Systeme, in denen eine oder mehrere monocyclische Aryl- oder monocyclische Heteroarylgruppe an einer weiteren Heteroarylgruppe fusioniert sind. Beispiele umfassen 2-Benzothienyl, 3-Benzothienyl, 2-Benzofuranyl, 3-Benzofuranyl, 2-Indolyl, 2-Chinolinyl und 3-Chinolinyl.

**[0024]** Wie hier verwendet ist eine „heterocyclische“ Gruppe ein nicht aromatisches Ringsystem, das ein oder mehrere Heteroatome, wie Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel, enthält. Beispiele umfassen 2-Tetrahydrofuran-yl, 3-Tetrahydrofuran-yl, 2-Tetrahydrothiophenyl, 3-Tetrahydrothiophenyl, 2-Morpholino, 3-Morpholino, 4-Morpholino, 2-Thiomorpholino, 3-Thiomorpholino, 4-Thiomorpholino, 1-Pyrrolidinyl, 2-Pyrrolidinyl, 3-Pyrrolidinyl, 1-Piperazinyl, 2-Piperazinyl, 1-Piperidinyl, 2-Piperidinyl, 3-Piperidinyl, 4-Piperidinyl und 4-Thiazolidinyl.

**[0025]** Geeignete Substituenten an der geradkettigen Kohlenwasserstoffgruppe umfassen Methyl, Ethyl, Hydroxy, Hydroxymethyl, Thiol, Methoxy, Ethoxy und Hydroxy. Geeignete Substituenten an einer Aryl-, Heteroaryl- oder heterocyclischen Gruppe umfassen Gruppen, wie niederes Alkyl, Aryl, Heteroaryl, (niederes Alkyl)-O-, (Aryl oder substituiertes Aryl)-O, Halogen, -CO-O(niederes Alkyl), -CHO, -CO-(niederes Alkyl), -CO-NH(niederes Alkyl), -CO-N(niederes Alkyl)<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CN und (niederes Alkyl)-S-. Eine niedere Alkylgruppe ist eine C1 bis etwa C5 gerad- oder verzweigte Alkylgruppe.

**[0026]** Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls neuartige Verbindungen, die für eine Hemmung der Anandamid-Amidase verwendet werden können. In einer Anwendungsform besitzt die Verbindung eine Struktur, die mit der Strukturformel (II):



dargestellt wird, und physiologisch verträgliche Salze davon. R<sub>1</sub> ist -F oder (C1 bis C4-Alkyl)O-. R und X sind wie für die Strukturformel (I) oben definiert.

**[0027]** Eine „therapeutisch wirksame Menge“ einer Verbindung, wie hier verwendet, ist die Menge einer Verbindung, die, wenn an ein Individuum oder Tier verabreicht, zu einem hinreichend hohen Level an Anandamid in dem Individuum oder Tier führt, um eine feststellbare Erhöhung oder Verminderung bei einer Zellaktivität hervorzurufen, die von Cannabinoid-Rezeptoren beeinflusst oder kontrolliert wird. Zum Beispiel kann Anandamid eine Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion stimulieren, die zu der Hemmung der Forskolin-stimulierten Adenylatcyclase führt (Vogel et al., J. Neurochem. 61:352 (1993)). Anandamid verursacht ebenfalls eine partielle Hemmung von N-Typ Calciumströmen über einen Pertussistoxin-empfindlichen G-Protein-Weg, unabhängig vom cAMP-Metabolismus (Mackie et al., Mol. Pharmacol. 47:711 (1993)).

**[0028]** Eine „therapeutisch wirksame Menge“ eines Anandamid-Inhibitors kann ebenfalls eine Menge sein, die zu einem hinreichend hohen Level an Anandamid in dem Individuum oder Tier führt, um eine physiologische Wirkung hervorzurufen, die das Ergebnis einer Stimulierung von Cannabinoid-Rezeptoren ist. Physiologische Wirkungen, die aus einer Cannabinoid-Rezeptorstimulierung resultieren, umfassen Analgesie, verminderte Übelkeit, die von einer Chemotherapie verursacht ist, Sedation und verstärkten Appetit. Weitere physiologische Funktionen umfassen Verminderung des Augeninnendrucks bei Glaukom-Patienten und Suppression des Immunsystems. Üblicherweise liegt eine „therapeutisch wirksame Menge“ der Verbindung im Bereich von etwa 10 mg/Tag bis etwa 1000 mg/Tag.

**[0029]** Wie hier verwendet, bezeichnet „Individuum“ einen Menschen. Ein „Tier“ bezeichnet Veterinärtiere, wie Hunde, Katzen, Pferde und ähnliche sowie Nutztiere, wie Kühe, Schweine, Meerschweinchen und ähnliche.

**[0030]** Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können mit verschiedenen bekannten Verfahren verabreicht werden, einschließlich oral, rektal oder über parenterale Wege (z.B. intramuskulär, intravenös, subkutan, nasal oder topisch). Die Form, in der die Verbindungen verabreicht werden, hängt vom Verabreichungsweg ab. Derartige Formen umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, Kapsel- und Tablettenformulierungen (für eine orale und rektale Verabreichung), flüssige Formulierung (für eine orale, intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Verabreichung) und langsam freisetzende Mikroträger (für eine rektale, intramuskuläre oder intravenöse Verabreichung).

se Verabreichung). Die Formulierung kann ebenfalls einen physiologisch verträglichen Träger und gegebenenfalls Adjuvanzen, Geschmacksstoffe, Farbstoffe und Konservierungsstoffe enthalten. Geeignete physiologisch verträgliche Träger können Saline, steriles Wasser, Ringer Lösung und isotonische Natriumchlorid-Lösungen umfassen. Der spezifischen Dosisgehalt an Wirkstoff hängt von einer Reihe an Faktoren ab, einschließlich zum Beispiel biologischer Aktivität der bestimmten Zubereitung, Alter, Körpergewicht, Geschlecht und allgemeiner Gesundheitszustand des zu behandelnden Individuums.

**[0031]** Allgemeine Verfahren zur Herstellung der Sulfonylfluoride, der N-[Alkylsulfonyl]oxy-succinimide der vorliegenden Erfindung und der N-O-Diacylhydroxylamine als Referenz sind in Beispiel 5, Beispiel 6 beziehungsweise Beispiel 7 bereitgestellt.

**[0032]** Die Erfindung wird nun durch die folgenden Beispiele näher und spezifisch beschrieben.

## BEISPIELE

Beispiel 1 – Erhöhte [<sup>3</sup>H]Anandamid-Levels in Neuroblastomzellen in der Gegenwart von Palmitylsulfonylfluorid

**[0033]** Die Bestimmung der Anandamid-Amidase in intakten Neuroblastomzellen wurde, wie bereits beschrieben (Deutsch, D.G. und S.A. Chin, Biochem. Pharmacol. 46:791-796 (1993)), durchgeführt. Die Versuche wurden mit  $4 \times 10^6$  Neuroblastomzellen (N18TG2)/6 cm Schale durchgeführt. Versuchszellen wurden in 2 ml Medium, bestehend aus Hams F-12/Dulbeccos modifiziertem Eagles Medium (Life Technologies, Inc.) mit Penicillin, Streptomycin und Gentamycin plus 10% bovinem Kälberserum (HyClone, Logan, UT) plus der angegebenen Inhibitor-Konzentration, 20 Minuten inkubiert. Alle Zellen wurden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> angezogen. [<sup>3</sup>H]Anandamid (0,2 µCi von 221 Ci/mmol [<sup>3</sup>H]Anandamid) wurde zugegeben und die Inkubation wurde 1 Stunde fortgesetzt. Kontrollzellen erhielten keinen Inhibitor. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen mit Zellkulturmedium einmal gewaschen und nach einer kurzen Inkubation mit 2 ml 0,05% Trypsin in 0,53 mM EDTA-Lösung bei 37°C aus den Schalen entnommen. Die Mengen an [<sup>3</sup>H]Anandamid, [<sup>3</sup>H]Phospholipiden und [<sup>3</sup>H]Arachidonat in den Zellen und Medium wurden mittels Flüssigszintillationszählung des von den geeigneten Bereichen der Platten abgeschabten Silikagels bestimmt, nachdem die Reaktion mit Chloroform/Methanol (1:1) gestoppt wurde, die Probe aus der organischen Phase extrahiert und mittels DC-Analyse auf Kanalschicht-Silikagel-Platten mit einem Lösemittelsystem, bestehend aus der organischen Phase eines Ethylacetat:Hexan:Essigsäure:Wasser (100:50:20:100)-Gemisches, analysiert wurde.

**[0034]** Die [<sup>3</sup>H]Anandamid-Levels, die in den Neuroblastomzellen festgestellt wurden, die mit Palmitylsulfonylfluorid, mit Phenylmethylsulfonylfluorid inkubiert wurden, und in den Kontrollzellen sind in [Fig. 1](#) gezeigt. Nanomolare Mengen an Palmitylsulfonylfluorid waren hinreichend, so dass mehr über 50% der Radioaktivität eher in Anandamid als in den Spaltprodukten wie Arachidonat gefunden wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass Palmitylsulfonylfluorid bei der Inhibition der Anandamid-Amidase hochwirksam ist. Konzentrationen von mehr als 10 µM Phenylmethylsulfonylfluorid waren erforderlich, um vergleichbare Levels der Anandamid-Amidaseinhibition zu erreichen. Ein fast vollständiger Abbau von [<sup>3</sup>H]Anandamid wurde in den Kontrollzellen beobachtet.

Beispiel 2 – Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte für Sulfonylfluorid-Inhibitoren der Anandamid-Amidase

**[0035]** Die Bestimmung der Anandamid-Amidase in vitro wurde, wie bereits beschrieben (Deutsch, D.G. und S.A. Chin, Biochem. Pharmacol. 46:791-796 (1993)), durchgeführt. Die angegebene Menge einer jeden Verbindung wurde in einem Puffer, bestehend aus 300 µg Rattengehirnhomogenat-Rohprotein, 500 µg/ml fettsäurefreiem bovinem Serumalbumin, in Phosphat-gepufferter Saline in einem Endvolumen von 1,0 ml 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Rattengehirn-Rohhomogenat wurde durch Dekapitieren weiblicher adulter Sprague-Dawley-Ratten und Präparieren des erwünschten Gewebes und Homogenisieren in fünf Volumina eiskaltem TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6) erhalten. Substrat (27,7 µM Anandamid + 0,2 µCi von 221 Ci/mmol [<sup>3</sup>H]Anandamid ([Arachidonyl-5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H]ethanolamid)) (vom National Institute on Drug Abuse erhalten) wurde dann zugegeben und die Proben 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Chloroform/Methanol (1:1) gestoppt und die Enzymaktivität wurde mittels DC, wie in Beispiel 1 beschrieben, analysiert.

**[0036]** Die Ergebnisse für Laurylsulfonylfluorid, Myristylsulfonylfluorid, Palmitylsulfonylfluorid, Stearylsulfonylfluorid und Arachidylsulfonylfluorid sind in [Fig. 2](#) gezeigt. Alle Verbindungen waren wirksame Inhibitoren der Anandamid-Amidase. Alle Verbindungen bis auf Arachidylsulfonylfluorid besaßen einen IC<sub>50</sub> kleiner als 10 nM. Arachidylsulfonylfluorid war ein wirksamer Inhibitor der Anandamid-Amidase mit Konzentrationen kleiner als 100 nM.

## Beispiel 3 – Palmitylsulfonylfluorid bindet an den CB1-Rezeptor weniger wirksam als Anandamid

**[0037]** Für die Bestimmung der CB1-Ligandenbindung wurden Gehirnmembranen von gefrorenen Rattengehirnen nach dem von Devane et al. (Devane, W.A., et al., Mol. Pharmacol. 34:605-613 (1988)) veröffentlichten Verfahren präpariert. Die quantitative Bestimmung des Bindens von Fettsäure-Analoga an CB1 wurde durch Inkubation der Analoga mit der angegebenen Konzentration mit 30 µg Membranprotein in einem Puffer, der 500 pm bicyclisches Cannabinoid-Analogon [<sup>3</sup>H]CP-55940, 20 mM Tris-Cl, pH 7,4, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Tris-ED-TA und 0,135 mg/ml fettsäurearmes bovines Serumalbumin in einem Endvolumen von 200 µl enthielt, in Regisil-behandelten Glasröhrchen durchgeführt. Als spezifisches Binden wurde das Binden definiert, das mit 100 nM Desacetyllevonantradol gezeigt werden konnte. Nach 60 Minuten bei 30°C wurde die Inkubation durch Zugabe von 250 µl 50 mg/ml bovinem Serumalbumin und unmittelbare Filtration über GF/B-Filter und Waschen mit eiskaltem Puffer (20 mM Tris-Cl, pH 7,4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) beendet. Die Filter wurden mit 0,1% Natriumdodecylsulfat vor Zugabe der Szintillationsflüssigkeit und Zählen in einem Flüssigszintillationszähler behandelt.

**[0038]** Die logarithmische Dosis-Antwort-Kurve für Palmitylsulfonylfluorid, Arachidonoyltrifluormethylketon und Arachidonylethanolamid in Konkurrenz mit [<sup>3</sup>H]CP-55940 um die Bindung an CB1 ist in [Fig. 3](#) gezeigt. Diese Figur zeigt, dass Palmitylsulfonylfluorid an den CB1-Rezeptor mit weniger als 10% der Wirksamkeit von Arachidonylethanolamid bindet.

## Beispiel 4 – Palmitylsulfonylfluorid induziert Analgesie in Ratten

**[0039]** Die Wirkstoffmischung wurde durch Mischen mit zwei Gewichtsteilen Tween 80 und Dispergieren in 0,9% w/v wässriger NaCl-Lösung (Saline), wie zuvor für Δ<sup>9</sup>-THC beschrieben (Pertwee et al., Br. J. Pharmacol. 105:980 (1992)), präpariert.

**[0040]** Wirkstoffmischungen wurden den männlichen MF1-Mäusen, die 23-29 Gramm wogen, intravenös injiziert. Die Analgesie wurde mit Hilfe eines „Ratten-Flick-Tests“ bestimmt, in dem die Zeit festgehalten wurde, die eine leicht benommene Maus für das Wegziehen ihres Schwanzes von einem Strahlungswärmestimulus benötigte. Das Verfahren basiert auf dem von D'Amour und Smith (D'Amour, F.E., Smith, D.L., J. Pharmacol. Exp. Ther. 72:74-79 (1941)) beschriebenen Test. Mäuse wurden dem Tail-Flick-Test bei –30 Minuten (Kontroll-Latenzzeit) und bei 12 Minuten (Test-Latenzzeit) unterzogen. Die maximal mögliche Tail-Flick-Latenzzeit betrug 10 s, da Mäuse, die nicht innerhalb dieser Zeit reagierten, von der Apparatur entfernt wurden, um eine Gewebeschädigung zu vermeiden. Eine Analgesie wurde als Prozentsatz der maximal möglichen Wirkung berechnet, indem das Verhältnis (Test-Latenzzeit – Kontroll-Latenzzeit)/(10 s Kontroll-Latenzzeit) prozentual ausgedrückt wurde (Compton, D.R., et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 260:201-209 (1992)). Die Raumtemperatur wurde zwischen 20 und 22°C gehalten. Die Werte sind als Mittelwerte und die Fehlergrenzen als Standardfehler angegeben. Der Test von Dunnett ist zur Berechnung der Signifikanz der Differenz zwischen der durchschnittlichen Wirkung jeder Wirkstoffbehandlung und der durchschnittlichen Wirkung des Trägers, Tween 80, verwendet worden.

**[0041]** Die Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) gezeigt. Palmitylsulfonylfluorid und mit Palmitylsulfonylfluorid co-verabreichtes Anandamid waren etwa dreimal wirksamer für ein Hervorrufen einer Analgesie bei Mäusen als Anandamid allein und etwa 13mal wirksamer als der Träger.

## Beispiel 5 – Alkylsulfonylfluoride

**[0042]** Alkylmagnesiumbromid in trockenem Ether wurde zu einer gerührten Lösung von Sulfurylhydrochlorid (zweifacher Überschuss) in Hexan bei 0°C gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde bei 0°C gerührt und dann wurde das Eisbad entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur weiter gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum abgedampft und das Produkt wurde mit Säulenchromatographie auf Silikagel gereinigt, um das entsprechende Alkylsulfonylchlorid als einen weißen Feststoff zu liefern.

**[0043]** Alkylsulfonylchlorid wurde in Aceton gelöst und ein 10facher Überschuss an Ammoniumfluorid wurde zugegeben, während bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Stunden unter Rückfluss gehalten. Dann wurde es abfiltriert, um unlösliches Salz zu entfernen, das Lösemittel wurde abgedampft und das Produkt wurde im Vakuum getrocknet. Wasser wurde für eine Hydrolyse jeglichen nicht umgesetzten Alkylsulfonylchlorids zugegeben und das wässrige Gemisch wurde mit Ether extrahiert. Die Etherextrakte wurden vereint, getrocknet und filtriert und das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mit Säulenchromatographie auf Silikagel gereinigt, um das entsprechende Alkylsulfonylchlorid zu liefern.



## Beispiel 6 – Alkyl-N-[alkyl-sulfonyl]oxy]-succinimide

**[0044]** Die Stobbe-Kondensation von Aldehyden mit Diethylsuccinat liefert die entsprechenden Alkenylsuccinsäure-monoethylester, die katalytisch hydriert und anschließend hydrolysiert werden, um die entsprechenden Alkylsuccinsäuren zu ergeben. Die Säuren werden mit einem Überschuss an Essigsäureanhydrid gemischt und 1 Stunde unter Rückfluss gehalten. Der Essigsäureanhydrid-Überschuss wird im Vakuum entfernt. Vakuumdestillation liefert die reinen Alkylsuccinanhydride.

**[0045]** Die reinen Produkte werden in trockenem Toluol gelöst und unter Rückfluss gebracht. Eine äquimolare Menge an (Benzyloxy)amin in Toluol wird zugegeben und die Gemische werden dann 30 Minuten unter Rückfluss gehalten. Die heißen Lösungen werden durch wasserfreies Natriumsulfat gefiltert und das Lösemittel wird auf einem Rotationsverdampfer entfernt. Die Rückstände werden in Ethylacetat gelöst und zweimal mit 10% Natriumbicarbonat gewaschen und dann mittels Säulenchromatographie auf Silikagel gereinigt.

**[0046]** Die resultierenden 3-Alkenyl-N-(benzyloxy)succinimide werden mit 10% Pd-C3 Stunden hydrogenolysiert. Die Reaktionsgemische werden durch einen Celite-Bausch gefiltert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Die gebildeten 3-Alkyl-N-hydroxysuccinimide werden dann in trockenem Toluol gelöst und mit trockenem Pyridin und verschiedenen Alkylsulfonylchloriden behandelt. Die Reaktionen werden über Nacht bei Raumtemperatur unter Stickstoff gerührt und dann durch Zugabe von 2 N HCl gestoppt. Die Produkte werden mit Ethylacetat extrahiert (zweimal), über wasserfreiem  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und mit Säulenchromatographie gereinigt.

## Referenz-Beispiel 7 – N-O-Diacylhydroxylamine

**[0047]** Methylester verschiedener Carbonsäuren werden mit einem Überschuss an Hydroxylamin in Methanol behandelt. Äquimolare Mengen an KOH und verschiedener Säurechloride, in THF gelöst, werden zu wässrigen Lösungen der Hydroxamsäuren bei 0-5°C gegeben, um die entsprechenden N,O-Diacylhydroxylamine zu liefern.

## Entsprechungen

**[0048]** Der Fachmann erkennt oder ist in der Lage, mit Hilfe von nur routinemäßigen Experimenten viele Entsprechungen zu den hier spezifisch beschriebenen spezifischen Anwendungsformen der Erfindung zu erkennen.

## Patentansprüche

1. Verwendung einer Verbindung zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung als ein Analgetikum, zur Verminderung von Übelkeit, als ein Sedativum, zur Appetitförderung, zur Verminderung intraokularen Drucks oder zur Suppression des Immunsystems in einem Individuum oder Tier, wobei die Verbindung mit der folgenden Strukturformel dargestellt ist:

R-X-Y

und physiologisch verträgliche Salze davon, worin:

R aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einer Methylgruppe, einer substituierten oder nichtsubstituierten Arylgruppe, einer substituierten oder nichtsubstituierten Heteroarylgruppe mit 5 bis 6 Ringatomen oder einem kondensierten polycyclischen System, das eine derartige Heteroarylgruppe enthält, und einer substituierten oder nichtsubstituierten heterocyclischen Gruppe, worin die Substituenten an der Arylgruppe, der Heteroarylgruppe oder der heterocyclischen Gruppe aus niederem Alkyl, Aryl, Heteroaryl, (niederem Alkyl)-O-, (Aryl oder substituiertes Aryl)-O-, Halogen, -CO-O(niederem Alkyl), -CHO, -CO-(niederem Alkyl), -CO-NH(niederem Alkyl), -CO-N(niederem Alkyl)<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CN und (niederem Alkyl)-S- ausgewählt sind;

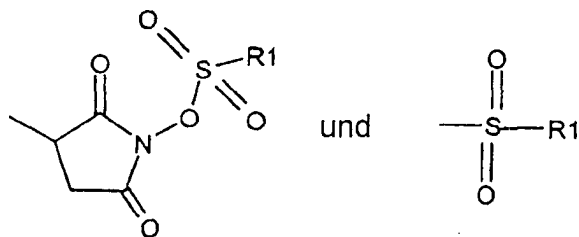
X eine substituierte oder nichtsubstituierte geradkettige Hydrocarbylgruppe ist, die

a) eine Polyalkylengruppe ist, die 10 bis 24 Methylen-Kohlenstoffatome enthält, wenn R eine Methylgruppe ist, oder 4 bis 18 Methylen-Kohlenstoffatome enthält, wenn R eine Arylgruppe, eine substituierte Arylgruppe, eine Heteroarylgruppe, eine substituierte Heteroarylgruppe, eine heterocyclische Gruppe oder eine substituierte heterocyclische Gruppe ist; oder

b) zwei oder mehrere Polyalkylengruppen umfasst, die über einen oder mehrere Ether, Thioether-Ether, cis-Alkenyl-, trans-Alkenyl- oder Alkynyl-Verknüpfung verbunden sind, so dass die Gesamtzahl an Methylen-Kohlenstoffatomen 10 bis 24 beträgt, wenn R eine Methylgruppe ist, oder 4 bis 18 beträgt, wenn R eine Arylgruppe, eine substituierte Arylgruppe, eine Heteroarylgruppe, eine substituierte Heteroarylgruppe, eine heterocycli-



sche Gruppe oder eine substituierte heterocyclische Gruppe ist; und  
 worin die Substituenten an der Hydrocarbylgruppe aus Methyl, Ethyl, Hydroxy, Hydroxymethyl, Thiol, Methoxy und Ethoxy ausgewählt sind; und  
 Y ein Rest ist, der in der Lage ist, an eine nukleophile Gruppe an der aktiven Stelle eines Amidase-Enzyms irreversibel zu binden, und aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus:



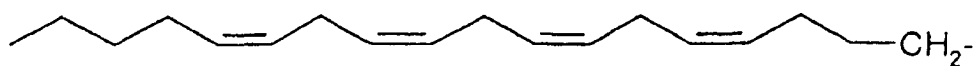
worin:

R1 aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus -F und -O(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub> gerad- oder verzweigt-kettige Alkylgruppe).

2. Die Verwendung nach Anspruch 1, worin Y -SO<sub>2</sub>O(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub> gerad- oder verzweigt-kettige Alkylgruppe) ist.

3. Die Verwendung nach Anspruch 1, worin Y -SO<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> ist.

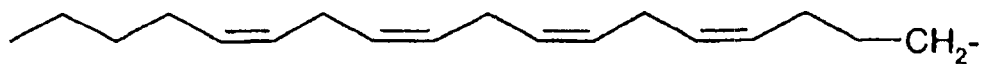
4. Die Verwendung nach Anspruch 3, worin R-X- ist:



5. Die Verwendung nach Anspruch 1, worin R-X- CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- ist, worin n eine ganze Zahl von 10 bis 24 ist.

6. Die Verwendung nach Anspruch 1, worin Y -SO<sub>2</sub>F ist.

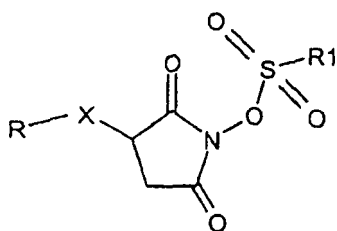
7. Die Verwendung nach Anspruch 6, worin R-X- ist:



8. Die Verwendung nach Anspruch 6, worin R-X- CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- ist, worin n eine ganze Zahl von 10 bis 24 ist.

9. Die Verwendung nach Anspruch 8, worin n gleich 14 ist.

10. Eine Verbindung, die durch die folgende Strukturformel dargestellt ist:



und physiologisch verträgliche Salze davon, worin R1, R und X wie in Anspruch 1 definiert sind.

11. Die Verbindung nach Anspruch 10, worin R-X- CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- ist, worin n eine ganze Zahl von 10 bis 24 ist.

12. Die Verbindung nach Anspruch 11, worin R1 -F ist.

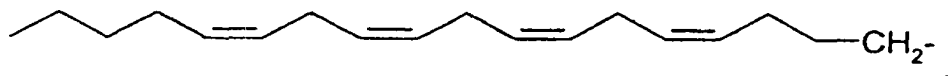
13. Die Verbindung nach Anspruch 10, worin:

R aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einer Arylgruppe, einer substituierten Arylgruppe, einer Heteroarylgruppe, einer substituierten Heteroarylgruppe, einer heterocyclischen Gruppe und einer substituierten heterocyclischen Gruppe; und

$X-(CH_2)_m-$  ist, worin m eine ganze Zahl von 4 bis 18 ist.

14. Die Verbindung nach Anspruch 13, worin R1 -F ist.

15. Die Verbindung nach Anspruch 10, worin R-X- durch die folgende Strukturformel dargestellt ist:



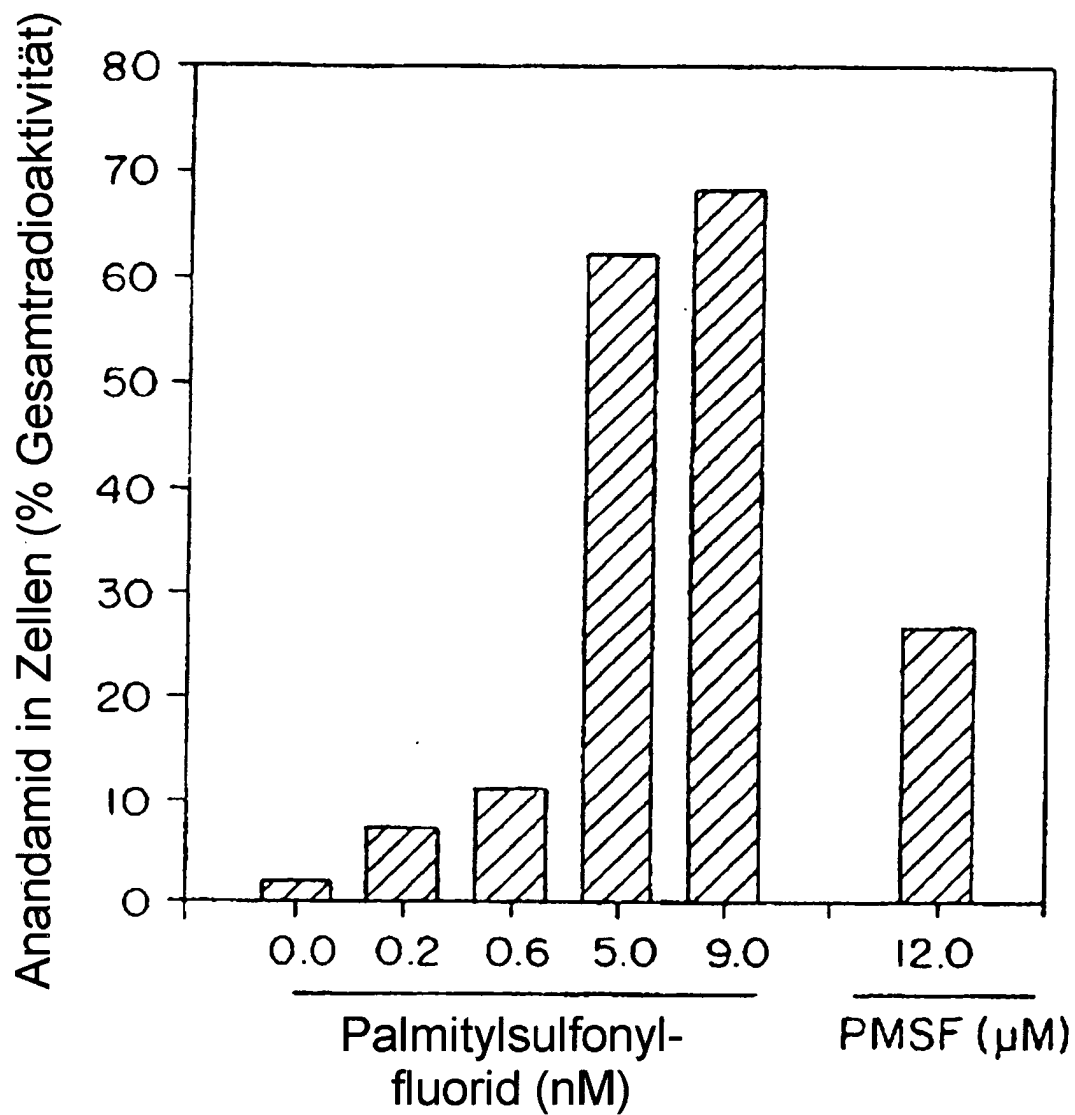
16. Eine Verbindung zur therapeutischen Anwendung, wobei die Verbindung

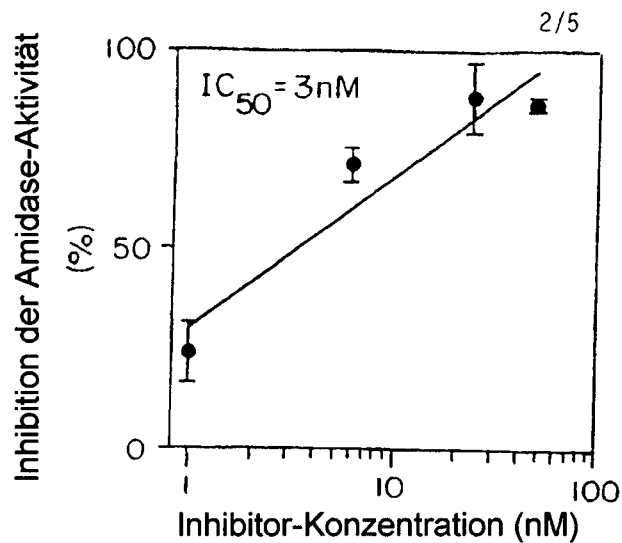
(a) gemäß einem der Ansprüche 10 bis 15 ist; oder

(b) wie in einem der Ansprüche 1 bis 9 definiert ist.

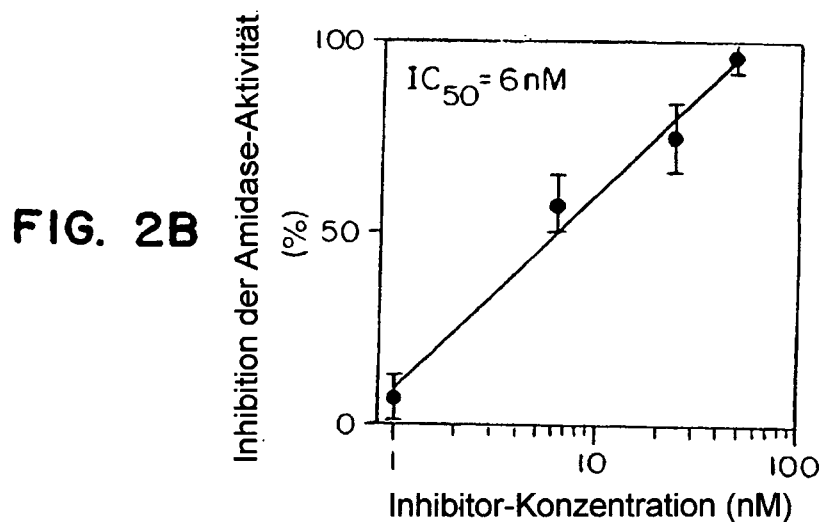
17. Eine Verbindung nach Anspruch 16, worin die Therapie eine Analgesie, Verminderung von Übelkeit, Sedierung, Appetitförderung, Verminderung intraokularen Drucks oder Suppression des Immunsystems umfasst.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

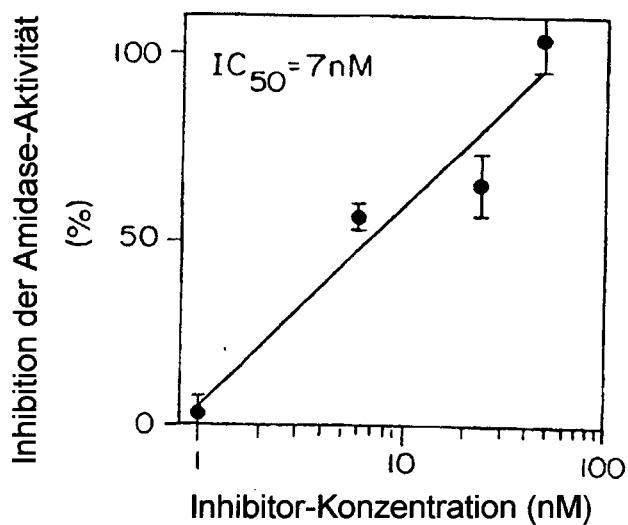
**FIG. 1**



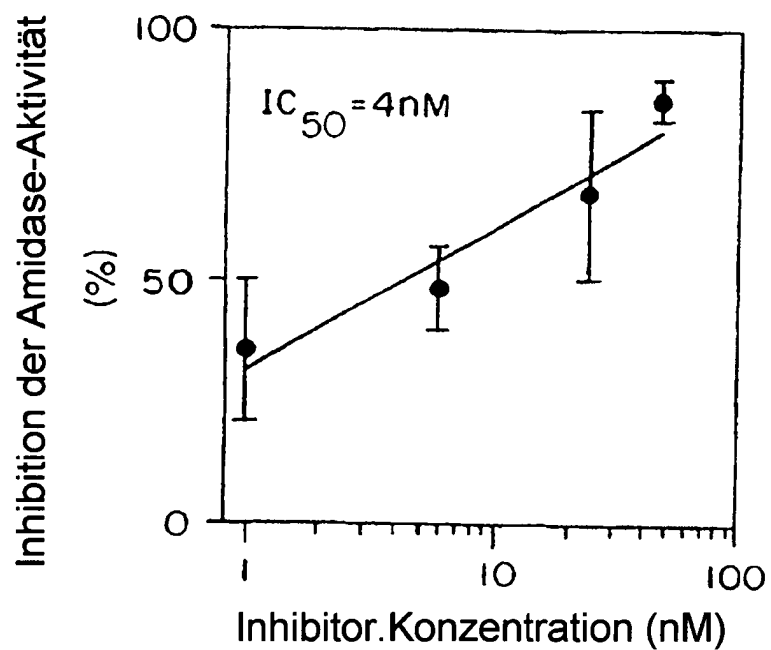
**FIG. 2A**



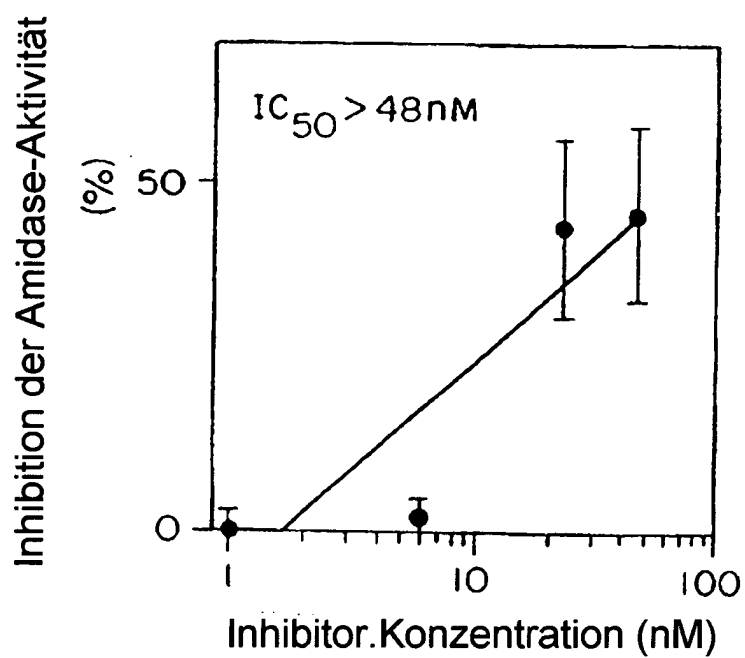
**FIG. 2B**



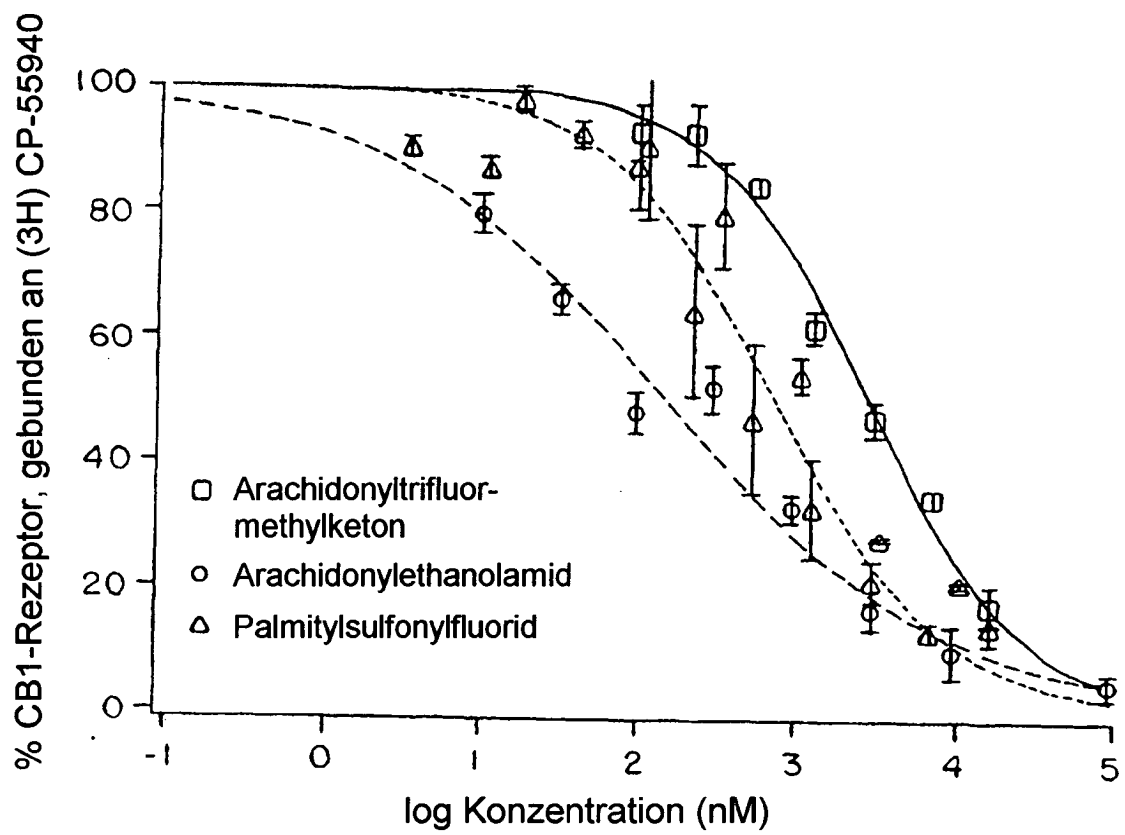
**FIG. 2C**

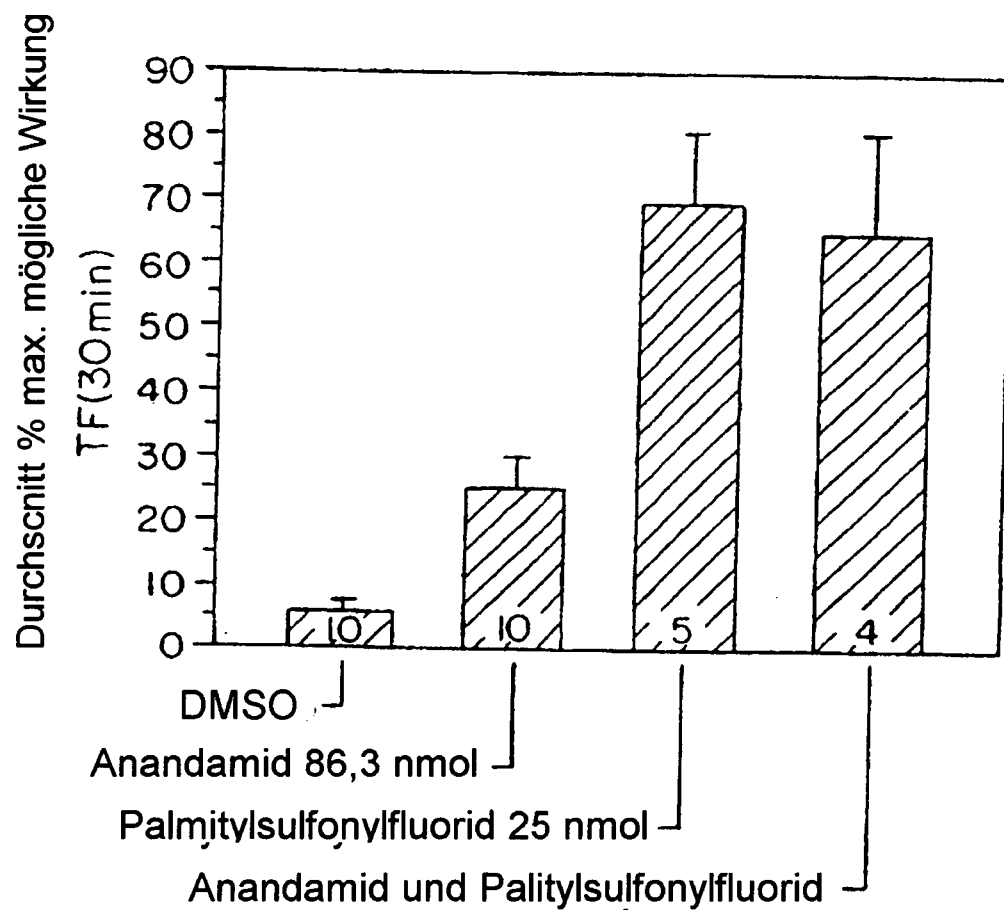


**FIG. 2D**



**FIG. 2E**

**FIG. 3**



**FIG. 4**