

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2014-985

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **31.12.2014**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **09.03.2016**
(Věstník č. 10/2016)

C07D 209/08 (2006.01)
C07D 209/12 (2006.01)
C07D 209/14 (2006.01)
C07D 295/08 (2006.01)
C07D 413/06 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01)

- (71) Přihlašovatel:
Vysoká škola chemicko- technologická v Praze,
Praha 6, CZ
- (72) Původce:
Ing. Martin Kuchař, Ph.D., Kladno - Kročehlavy,
CZ
Ing. Anna Šuláková, Kopřivnice, CZ
Ing. Lucie Fojtíková, Hať, CZ
prof. Dr. RNDr. Oldřich Lapčík, Praha 6, CZ
- (74) Zástupce:
PATENT SKY s. r. o., Ing. Petra Kolářová, Dušní
8/11, 110 00 Praha 1

- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Derivát syntetického kanabinoidu, způsob
jeho přípravy a použití**

- (57) Anotace:
Technické řešení se týká nově připravených derivátů syntetických kanabinoidů, součástí jejichž struktury je krátký spojovací můstek nesoucí karboxylovou funkční skupinu, a chemických postupů vedoucích k přípravě takovýchto sloučenin. Tyto deriváty syntetických kanabinoidů lze s výhodou využít pro konjugaci s fluorescentní značkou, která by následně umožnila vizualizaci interakcí takto značených ligandů s kanabinoidními receptory, či pro přípravu imunogenů konjugací s nosným proteinem. Polyklonální králičí protilátky získané z imunizovaných laboratorních zvířat lze uplatnit při vývoji rychlých, uživatelsky příjemných imunochemických testů formátu LFIA (Lateral-Flow Immunochromatographic Assay).

h34

^

05.10.15

PV204-385

Derivát syntetického kanabinoidu, způsob jeho přípravy a použití

Oblast techniky

Vynález se týká nově připravených derivátů syntetických kanabinoidů, součástí jejichž struktury je krátký spojovací můstek nesoucí karboxylovou funkční skupinu, a chemických postupů vedoucích k přípravě takovýchto sloučenin. Tyto deriváty syntetických kanabinoidů lze s výhodou využít pro konjugaci s fluorescentní značkou, která by následně umožnila vizualizaci interakcí takto značených ligandů s kanabinoidními receptory, či pro přípravu imunogenů konjugací s nosným proteinem. Polyklonální králičí protilátky získané z imunizovaných laboratorních zvířat lze uplatnit při vývoji rychlých, uživatelsky příjemných imunochemických testů formátu LFIA (Lateral-Flow Immunochromatographic Assay).

Dosavadní stav techniky

Na drogové scéně se v posledních letech kromě tradičních drog (kokain, opiáty, amfetaminy, kanabinoidy) objevují také nové syntetické drogy (NSD). Důvodem je snaha výrobců a distributorů obejít stávající legislativní normy, v nichž jsou omamné a psychotropní látky vymezeny obvykle taxativně. Na ilegální trh se tak dostávají analoga známých látek s psychotropním potenciálem, která dosud nejsou uvedena na seznamu ilegálních látek, nebo jejichž prekursori nejsou monitorovanými substancemi. Hlavní nebezpečí spojené s užíváním těchto nových syntetických drog (NSD) tkví v nedostatku informací o jejich farmakokinetickém a toxikologickém chování, neboť tyto látky neprošly žádnými klinickými testy.

Početně nejbohatší a ze strukturního hlediska značně rozmanitou skupinou NSD jsou syntetické kanabinoidy. Tyto látky se váží na kanabinoidní receptory, což jsou s G-proteinem spřažené transmembránové receptory. Podtyp receptoru CB1 se nachází především v centrální nervové soustavě, podtyp CB2 je exprimován zejména v buňkách imunitního systému. Endokanabinoidní systém dodnes nebyl zcela pochopen. Je však známo, že endogenní kanabinoidy, jejichž nejznámějším zástupcem je anandamid, ovlivňují citění bolesti, náladu, paměť, ale i chuť k jídlu. Ke kanabinoidním receptorům se váže též celá řada exogenních sloučenin, k nejvýznamnějším patří aktivní složky konopí Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC) a kanabidiol (CBD), které jsou parciálními agonisty obou zmíněných podtypů receptorů. Syntetické kanabinoidy jsou plní agonisté kanabinoidních receptorů s mnohem

dramatičtějšími psychickými účinky. Zaznamenána byla celá řada intoxikací, které měly v některých případech i fatální důsledky. Popsány jsou i případy indukované psychózy. (Banister SD, Wilkinson SM, Longworth M, Stuart J, Apetz N, English K, Brooker L, Goebel C, Hibbs DE, Glass M, Connor M, McGregor IS, Kassiou M. The Synthesis and Pharmacological Evaluation of Adamantane-Derived Indoles: Cannabimimetic Drugs of Abuse. Chem. Neurosci. 2013;4:1081–92.)

Tradiční drogy lze detekovat pomocí komerčních imunochemických testů založených na selektivní reakci protilátky a antigenu, kterým je v tomto případě hledaná omamná či psychotropní látka. K detekci NSD však tyto testy použít nelze. (Páleníček T, Kuchař M. Je možná detekce a identifikace nových syntetických drog (NSD) pomocí orientačních testů? Adiktologie 2011;11:208–14.) Odhalit intoxikaci osob novými syntetickými drogami je možné pomocí metod klinické biochemie, a to zejména analýzou pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem (LC-MS), což je poměrně náročné jak na přístroje, tak na odbornost obsluhy. Sestavení přístrojově nenáročných, jednoduchých, uživatelsky příjemných imunochemických testů na principu LFIA (Lateral Flow Immunochromatographic Assay) by umožňovalo daleko rychlejší a levnější orientační detekci látek v biologickém materiálu ve zdravotnictví nebo při dopravních kontrolách řidičů.

Přestože existuje mnoho evaluovaných imunochemických testů pro stanovení tradičních kanabinoidů, možnosti imunoanalýzy syntetických kanabinoidů jsou omezené. V literatuře jsou popsány příklady metod pro ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) stanovení JWH-018 a JWH-250 v krvi, krevním séru a moči (Arntson A, Ofsa B, Lancaster D, Simon JR, McMullin M, Logan B. Validation of a Novel Immunoassay for the Detection of Synthetic Cannabinoids and Metabolites in Urine Specimens. J. Anal. Toxicol. 2013; 37:284-90.), JWH-200 ve slinách (Rodrigues WC, Catbagan P, Rana S, Wang G, Moore C. Detection of Synthetic Cannabinoids in Oral Fluid Using ELISA and LC-MS-MS. J. Anal. Toxicol. 2013; 37:526-33.) a HEIA (Homogenous Enzyme ImmunoAssay) stanovení JWH-018 *N*-pentanové kyseliny, což je významný metabolit JWH-018, v moči (Barnes AJ, Young S, Spinelli E, Martin TM, Klette KL, Huestis MA. Evaluation of a homogenous enzyme immunoassay for the detection of synthetic cannabinoids in urine. Forensic Sci Int. 2014;241:27-34.).

Jako nosičové proteiny se používají hovězí sérový albumin (BSA), hovězí thyroglobulin (BTG), popř. další proteiny vhodných vlastností. Konjugáty se připravují reakcí aktivované formy haptenu (reaktivní anhydridy či estery) s ϵ -aminoskupinami lysinových zbytků proteinu za vytvoření amidových vazeb. Konjugací se dosáhne statisticky náhodného obsazení lysylů přítomných v proteinu.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou nové deriváty syntetických kanabinoidů. Tyto deriváty nesou krátký spojovací můstek s karboxylovou skupinou. Spojovací můstek je využitelný pro připojení fluorescentní značky, která následně umožní vizualizaci interakcí kanabinoidů s kanabinoidními receptory, či je karboxylová skupina spojovacího můstku využitelná pro přípravu imunogenů konjugací s nosným proteinem. Z laboratorních zvířat imunizovaných těmito imunogeny lze získat polyklonální králičí protilátky a uplatnit je při vývoji imunoanalytických metod stanovení syntetických kanabinoidů.

Spojovací můstek je připojen přes kyslík v poloze 4 benzenového jádra 1-alkyl-3-benzoylindolů nebo v poloze 4 naftalenu u 1-alkyl-3-naftoylindolů či přímo na dusíku 1-alkyl-1*H*-indol-3-karboxamidů.

Sloučeniny obecného vzorce V a VI se připraví tak, že se spojovací můstek zavede přímo na výchozí primární amin jeho *N*-alkylací ethyl-esterem ω -bromalkanové kyseliny. Získaný sekundární amin je acylován chloridem alkyl-1*H*-indol-3-karboxylové kyseliny. Finální produkty jsou získány hydrolyzou příslušných esterů.

Připravené deriváty syntetických kanabinoidů lze s výhodou využít pro konjugaci s fluorescentní značkou, která by následně umožnila vizualizaci interakcí takto značených ligandů s kanabinoidními receptory, či pro přípravu imunogenů konjugací s nosným proteinem. Polyklonální králičí protilátky získané z imunizovaných laboratorních zvířat lze uplatnit při vývoji rychlých, uživatelsky příjemných imunochemických testů formátu LFIA (Lateral-Flow Immunochromatographic Assay).

Pro získání protilátek proti těmto syntetickým kanabinoidům, tedy nízkomolekulárním látkám (haptenum), bylo nutné připojit je k nosnému proteinu. Pro tyto účely byl jako vhodný nosný protein vybrán hovězí sérový albumin (BSA). Při tvorbě konjugátů byla využita metoda aktivovaného esteru, při níž je hapten reakcí s *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidem (DCC) a *N*-hydroxysukcinimidem (NHS) nejprve převeden na nestabilní derivát *O*-acylisomočoviny, a poté na aktivovaný ester. Vlastní konjugační reakce, při níž dochází k tvorbě amidové vazby mezi karboxylovou skupinou haptenu a primární aminoskupinou aminokyseliny lysinu v BSA, pak probíhala v reverzním micelárním prostředí anionaktivního tenzidu.

Způsob přípravy derivátů syntetických kanabinoidů

Zatímco 4-benzyloxybenzoová kyselina byla připravena standardním, v literatuře popsaným způsobem, pro přípravu 4-benzyloxynaftalen-1*karboxylové kyseliny je představena inovativní syntetická cesta. V molekule 1-benzyloxy-4-bromnaftalenu je brom nejprve nahrazen nitrilovou funkční skupinou při Rosenmundově – von Braunově reakci. Redukce získaného nitrilu diisobutylaluminium hydridem a zpětná oxidace aldehydu oxidem stříbrným, připravovaným in situ z dusičnanu stříbrného a hydroxidu sodného, umožní zavést do molekuly karboxylovou funkční skupinu s vyšším výtěžkem, než publikovaný postup založený na lithiaci a následné reakci organokovového species s oxidem uhličitým, přestože je reakční sekvence delší.

Sloučeniny obecného vzorce V a VI se připraví tak, že se spojovací můstek zavede přímo na výchozí primární amin jeho *N*-alkylací ethyl-esterem ω -bromalkanové kyseliny. Získaný sekundární amin je acylován chloridem alkyl-1*H*-indol-3-karboxylové kyseliny. Finální produkty jsou získány hydrolýzou příslušných esterů. Vzhledem k dostupnosti výchozích surovin a nízkému počtu reakčních kroků je tato syntetická cesta výhodná, přestože výtěžky acylační reakce, pravděpodobně z důvodu sterické náročnosti substituentů na dusíku, nejsou vysoké.

Metodou enzymové imunoanalýzy byly testovány interakce polyklonálních králíčích protilátek připravených proti příslušným syntetickým kanabinoidům. S protilátkami vykazujícími nejlepší charakteristiky byly pro imunochemické stanovení optimalizovány a charakterizovány varianty ELISA v nepřímém kompetitivním uspořádání. Byl určen významný analytický parametr tzv. 50% intercept, (I_{50} , viz tabulka). I_{50} představuje koncentraci analytu, potřebnou k vyvážení 50 % protilátek přítomných v reakčním roztoku, která je nezbytná pro kvalitativní stanovení syntetického kanabinoidu v neznámém vzorku.

Při imunoanalýze v nepřímém kompetitivním uspořádání soutěží antigen zakotvený na pevném nosiči (imobilizační konjugát) se stanovovaným antigenem ve vzorku o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky. Čím více antigenu obsahuje analyzovaný vzorek, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen. Nenavázané složky se odstraní a přidá se enzymem značená sekundární protilátka proti navázané protilátce. Detekce je uskutečněna enzymovou reakcí, kdy vzniká barevný produkt, jehož intenzita zbarvení je měřena spektrofotometricky.

Přehled obrázků na výkresech

Obr.1: Schéma syntézy haptenu V

Obr.2: Schéma syntézy haptenu VI

Obr.3: Schéma provedené konjugace hapten s BSA

Obr.4: MALDI spektrum prokazující strukturu připraveného konjugátu haptenu V s BSA, detekující, že 49 molekul haptenu V se průměrně navázalo na nosný protein – BSA

Obr.5: MALDI spektrum prokazující strukturu připraveného konjugátu haptenu VI s BSA, detekující, že 43 molekul haptenu VI se průměrně navázalo na nosný protein – BSA

Obr.6: Schématický průběh nepřímé kompetitivní ELISA; **A** imobilizace konjugátu na stěny jamek mikrotitrační destičky; **B** aplikace kompetujících složek; **C** aplikace sekundární protilátky značené enzymem (peroxidasou); **D** aplikace substrátu pro peroxidasu; **E** enzymová reakce peroxidasy se substrátem; **F** zastavení enzymové reakce kyselinou sírovou; ● imobilizační konjugát; ⊙ cílový analyt ve vzorku; Y primární protilátka; X sekundární protilátka značená enzymem; ○ substrát pro peroxidasu.

Obr.7: Přehled použitých konjugátů a protilátek při vývoji metod ELISA; BSA: hovězí sérový albumin z ang. bovine serum albumin; specifická protilátka: protilátka proti imunogenu příslušného kanabinoidu s BSA

Obr.8: Chemická struktura haptenu V

Obr.9: Chemická struktura haptenu VI

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Syntéza haptenu V

1-pentyl-1*H*-indol-3-karboxylová kyselina (1273 mg, 5,50 mmol) byla rozpuštěna v suchém dichlormethanu (40 mL), k roztoku bylo přidáno několik kapek *N,N*-dimethylformamidu a stříkačkou byl postupně přikapáván oxalylchlorid (944 μ L, 11,00 mmol). Po přidání veškerého oxalylchloridu byla reakční směs ještě 1 hodinu míchána při laboratorní teplotě. Byl přidán toluen (10 mL), přebytečný oxalylchlorid a rozpouštědla byly odpařeny. Surový produkt

1-pentyl-1*H*-indol-3-karbonylchlorid byl bez dalšího čištění použit v následné reakci.

Ethyl-4-(naftalen-1-ylamino)butanoát (348 mg, 1,35 mmol) byl rozpuštěn v suchém dichlormethanu (25 mL), k roztoku byl přidán triethylamin (394 μ L, 2,82 mmol). Po 60 minutách byl stříkačkou přikapán roztok 1-pentyl-1*H*-indol-3-karbonylchloridu (283 mg, 1,13 mmol) v suchém dichlormethanu (5 mL), reakční směs byla 20 hodin míchána při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek extrahován mezi ethyl-acetát a vodu. Organická fáze byla postupně promyta třemi podíly 1 mol/l kyseliny chlorovodíkové, třemi podíly nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného, poté byla vysušena pomocí síranu hořečnatého. Ethyl-acetát byl odpařen a produkt přečištěn sloupcovou chromatografií (hexan-ethyl-acetát, gradient 20/1 $\rightarrow$ 5/1). Byl izolován produkt ethyl-4-[*N*-(naftalen-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanoát (324 mg, 0,69 mmol) ve výtěžku 61 %.

Ethyl-4-[*N*-(naftalen-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanoát (142 mg, 0,30 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (20 mL), k roztoku byl stříkačkou přikapán 1 M roztok hydroxidu sodného (18 mg, 0,45 mmol) ve vodě. Reakce probíhala 90 minut při teplotě 60 °C. Ethanol byl odpařen, vodná fáze byla zředěna 1 mol/l roztokem kyseliny chlorovodíkové a protřepána se dvěma podíly dichlormethanu. Organické extrakty byly spojeny a vysušeny pomocí síranu hořečnatého. Dichlormethan byl odpařen a produkt přečištěn sloupcovou chromatografií (dichlormethan-methanol, gradient 99/1 $\rightarrow$ 10/1). Byl izolován produkt 4-[*N*-(naftalen-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanová kyselina (107 mg, 0,24 mmol) ve výtěžku 80 %.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.61 - 0.75 (m, 5 H), 1.03 (q, J=7.20 Hz, 2 H), 1.30 (t, J=7.50 Hz, 2 H), 1.96 - 2.14 (m, 2 H), 2.55 (t, J=6.60 Hz, 2 H), 3.58 (t, J=6.60 Hz, 3 H), 4.58 (quint, J=6.60 Hz, 1 H), 5.61 (s, 1 H), 7.11 - 7.23 (m, 4 H, ArH), 7.38 (d, J=6.90 Hz, 1 H, ArH), 7.46 - 7.53 (m, 3 H, ArH), 7.91 - 7.95 (m, 3 H, ArH), 7.47 (d, J=7.50 Hz, 1 H, ArH). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.86, 22.06, 23.90, 28.37, 28.78, 32.21, 46.32, 49.26, 108.17, 109.32, 121.62, 122.63, 122.88, 122.91, 125.90, 126.97, 127.43, 127.80, 128.69, 128.84, 128.89, 130.78, 131.65, 134.92, 135.22, 139.76, 167.09, 178.47. IČ (CHCl₃): 3130, 3067, 3050, 2955, 2927, 2872, 2855, 2700, 2628, 1704. 1626. 1589. 1572. 1523, 1509, 1484, 1466, 1449, 1415, 1395, 1377, 1359, 1311, 1292, 1281, 1249, 1226, 1199, 1164, 1125, 1115, 1073, 1015, 953, 927, 896, 857, 803, 789, 777, 744, 680, 658, 569, 421. HRMS-ESI: monoisotopická hmota: 442.22564 Da, nalezeno (m/z) 443.23304 (vypočteno 443.23292) odpovídá iontu [M+H]⁺ připravené látky.

Příklad 2

Syntéza haptenu VI

Ethyl-4-(adamantan-1-ylamino)butanoát hydrochlorid (275 mg, 0,91 mmol) byl rozpuštěn v suchém dichlormethanu (25 mL), k roztoku byl přidán triethylamin (407 µL, 2,92 mmol). Po 2 hodinách byl stříkačkou přikapán roztok 1-pentyl-1*H*-indol-3-karbonylchloridu (250 mg, 1,00 mmol) v suchém dichlormethanu (5 mL), reakční směs byla 20 hodin míchána při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek extrahován mezi ethyl-acetát a vodu. Organická fáze byla postupně promyta třemi podíly 1 mol/l kyseliny chlorovodíkové, třemi podíly nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného, poté byla vysušena pomocí síranu hořečnatého. Ethyl-acetát byl odpařen a produkt přečištěn sloupcovou chromatografií (hexan-aceton, gradient 99/1→4/5). Byl izolován produkt ethyl-4-[*N*-(adamantan-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanoát (201 mg, 0,42 mmol) ve výtěžku 46 %.

Ethyl-4-[*N*-(adamantan-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanoát (180 mg, 0,38 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (20 mL), k roztoku byl stříkačkou přikapán 1 M roztok hydroxidu sodného (34 mg, 0.85 mmol) ve vodě. Reakce probíhala 90 minut při teplotě 60 °C. Ethanol byl odpařen, vodná fáze byla zředěna 1 mol/l roztokem kyseliny chlorovodíkové a protřepána se dvěma podíly dichlormethanu. Organické extrakty byly spojeny a vysušeny pomocí síranu hořečnatého. Dichlormethan byl odpařen a produkt přečištěn sloupcovou chromatografií (dichlormethan-methanol, gradient 99/1→10/1). Byl izolován produkt 4-[*N*-

–(adamantan-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanová kyselina (45 mg, 0,10 mmol) ve výtěžku 27 %.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.80 (t, J=6.90 Hz, 3 H, CH₃), 1.19 - 1.27 (m, 4 H, 2xCH₂), 1.61 - 1.78 (m, 10 H, 3xCH₂), 2.01 (t, J=7.50 Hz, 2 H, CH₂COOH), 2.08 (s, 3 H, CH-CH₂-CH), 2.28 (s, 6 H, CH₂-CH-CH₂), 3.54 (t, J=7.35 Hz, 2 H, NCH₂), 4.00 (t, J=7.20 Hz, 2 H, NCH₂), 7.06 - 7.25 (m, 3 H, ArH), 7.37 (s, 1 H, ArH), 7.48 (d, J=7,50 Hz, 1 H, ArH). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 14.02, 22.38, 27.98, 29.17, 29.81, 30.39, 31.16, 36.73, 40.91, 46.06, 49.72, 58.42, 110.04, 114.48, 120.24, 120.71, 122.18, 125.54, 130.55, 135.75, 169.62, 177.69. IČ (CHCl₃): 3118, 3055, 2956, 2927, 2901, 2850, 2701, 2589, 2499, 1724, 1709, 1613, 1561, 1539, 1466, 1452, 1415, 1392, 1356, 1341, 1322, 1307, 1273, 1213, 1183, 1142, 1119, 1074, 1053, 1014, 979, 893, 854, 780, 741, 702, 573, 524, 436. HRMS-ESI: monoisotopická hmota: 450.28824 Da, nalezeno (m/z) 451.29553 (vypočteno 451.29552) odpovídá iontu [M+H]⁺ a 473.27723 (vypočteno 473.473,27746) odpovídá iontu [M+Na]⁺ připravené látky.

Příklad 3

Provedení nepřímé nekompetitivní ELISY

Imobilizace konjugátu na stěny jamek mikrotitrační destičky

Zásobní roztok imobilizačního konjugátu (I-BSA – VI-BSA) byl vhodně naředěn v 0,05 mol/l karbonát-bikarbonátovém pufru, pH 9,6 a pipetován do jamek mikrotitrační destičky v množství 100 µl na jamku. Imobilizace probíhala přes noc při laboratorní teplotě. Nenavázaný imobilizační konjugát byl následující den odstraněn pomocí automatické promývačky 4↑x 300 µl 0,01 mol/l PBS-Tw (0,01 mol/l PBS, pH 7,4 obohacený 0,05% Tweenem).

Aplikace kompetujících složek

Po promytí nenavázaného konjugátu byly do jamek mikrotitrační destičky pipetovány kompetující složky v pořadí 50 µl roztoku antigenu (kalibračního standardu nebo vzorku) ředěného v PBS a 50 µl roztoku polyklonální králičí protilátky ředěné v příslušném pufru (různé pufrы pro různé systémy). Inkubace probíhala za mírného třepání při laboratorní teplotě, po dobu 1 hodiny. Nezreagované imunoreaktanty byly odstraněny opakovaným promytím jamek 0,01 mol/l PBS-Tw (4↑x 300 µl, promývačka).

Aplikace sekundární protilátky

Ke kvantifikaci navázaných králičích protilátek na imobilizační konjugát bylo využito tzv. sekundární protilátky GAR-Po (z angl. Goat Anti-Rabbit - koží protilátky proti králičím protilátkám značené peroxidasou). Sekundární protilátka byla ředěna 1:10 000 v příslušném pufru (v závislosti na systému) a pipetována v množství 100 μ l na jamku. Inkubace probíhala za mírného třepání při laboratorní teplotě, po dobu 1 hodiny. Nenavázaná protilátka byla poté odstraněna opakovaným promytím jamek 0,01 mol/l PBS-Tw ($4 \times 300 \mu$ l, promývačka).

Aplikace substrátu pro peroxidasu

Do každé jamky bylo následně přidáno 100 μ l čerstvě připraveného roztoku substrátu pro peroxidasu. Enzymová reakce probíhala za mírného třepání při laboratorní teplotě deset minut.

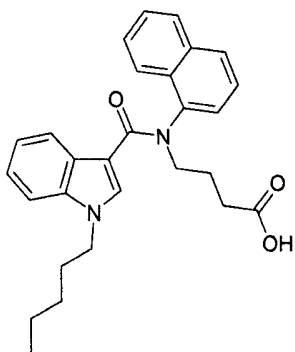
K zastavení enzymové reakce byl použit přídatek 2 mol/l kyseliny sírové v množství 50 μ l na jamku. Absorbance reakční směsi byla měřena v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm.

Průmyslová využitelnost

Aplikace v imunoanalytických metodách stanovení syntetických kanabinoidů ve formátech nepřímé ELISA, LFIA, FIA a dalších, které využívají kompetice mezi haptenem – některým z připravených derivátů syntetických kanabinoidů, a analytem – psychoaktivní látkou přítomnou ve vzorku, o vazebná místa protilátky.

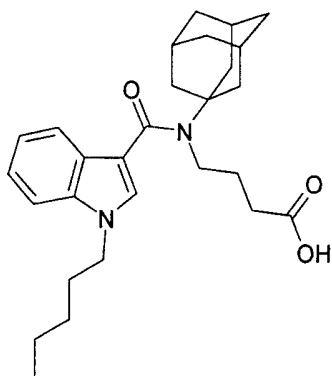
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Derivát syntetického kanabinoidu o názvu 4-[N-(R₂-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanová kyselina, přičemž R₂ je naftalen nebo adamantan.
2. Derivát syntetického kanabinoidu podle nároku 5 o názvu 4-[N-(naftalen-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanová kyselina a struktura:



1

3. Derivát syntetického kanabinoidu podle nároku 5 o názvu 4-[N-(adamantan-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanová kyselina a struktura:



4. Způsob přípravy derivátu syntetického kanabinoidu podle nároku 1 až 3 vyznačující se tím, že výchozí adamantyl/naftylamin se podrobí *N*-alkylaci, kdy se přidá ethyl-ester ω-bromalkanové kyseliny, ke vzniklému sekundárnímu aminu se přidá chlorid 1-alkylindol-3-karboxylové kyseliny a provede se acylace, vzniklý ester nesený na spojovacím můstku se v zásaditém prostředí hydrolyzuje na karboxylovou skupinu.
5. Použití derivátu syntetického kanabinoidu podle nároku 1 až 4 jako prostředku pro vizualizaci interakcí s kanabinoidními receptory.

pro výrobu

jako prostředku

pro výstavbu

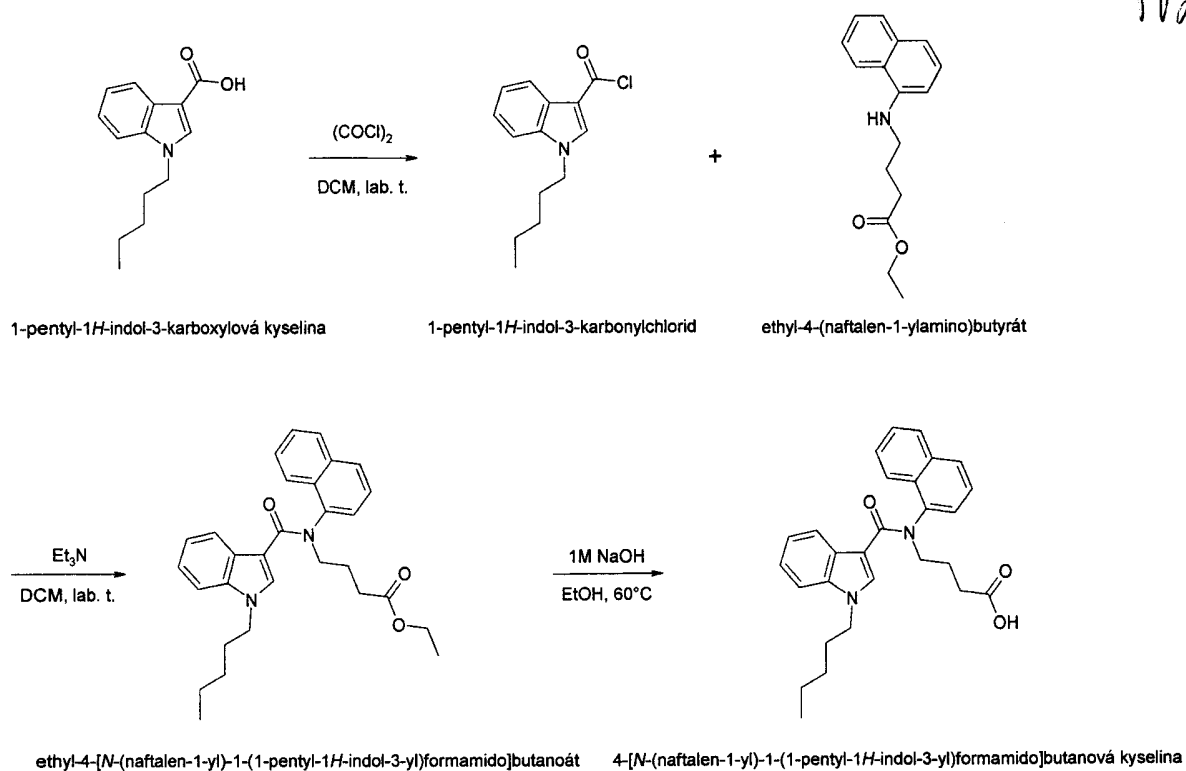
6. Použití derivátu syntetického kanabinoidu podle nároku 1 až 4 jako prostředku pro přípravu imunogenů konjugací s nosným proteinem, pro získání protilátky pro analýzu drog interagujících s kanabinoidními receptory.

hsc

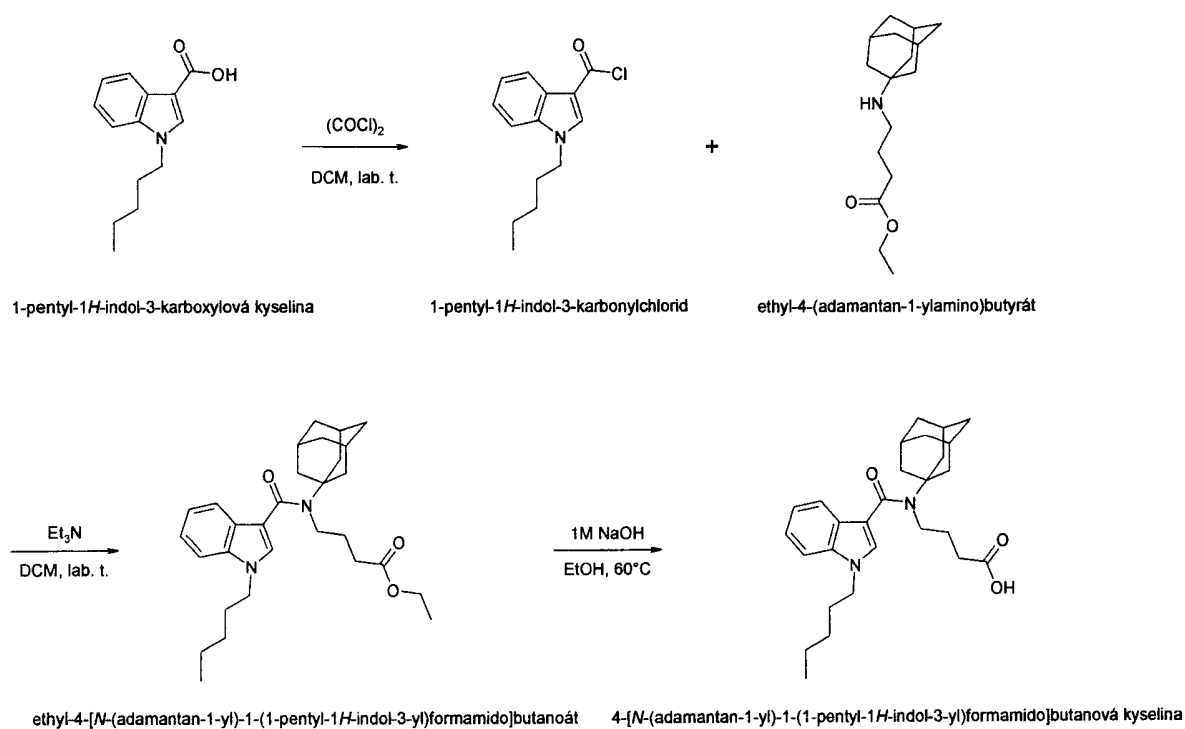
1/4

05.10.15

PV2014-985



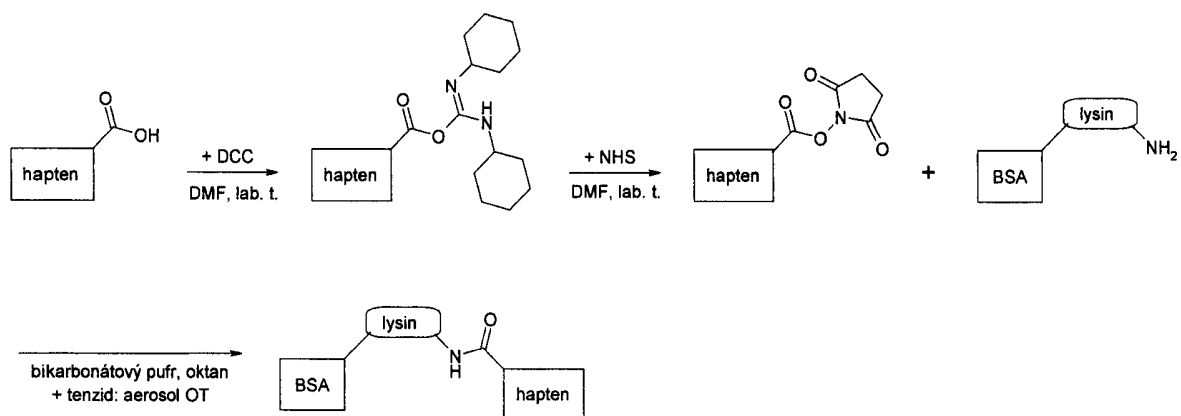
Obr. 1



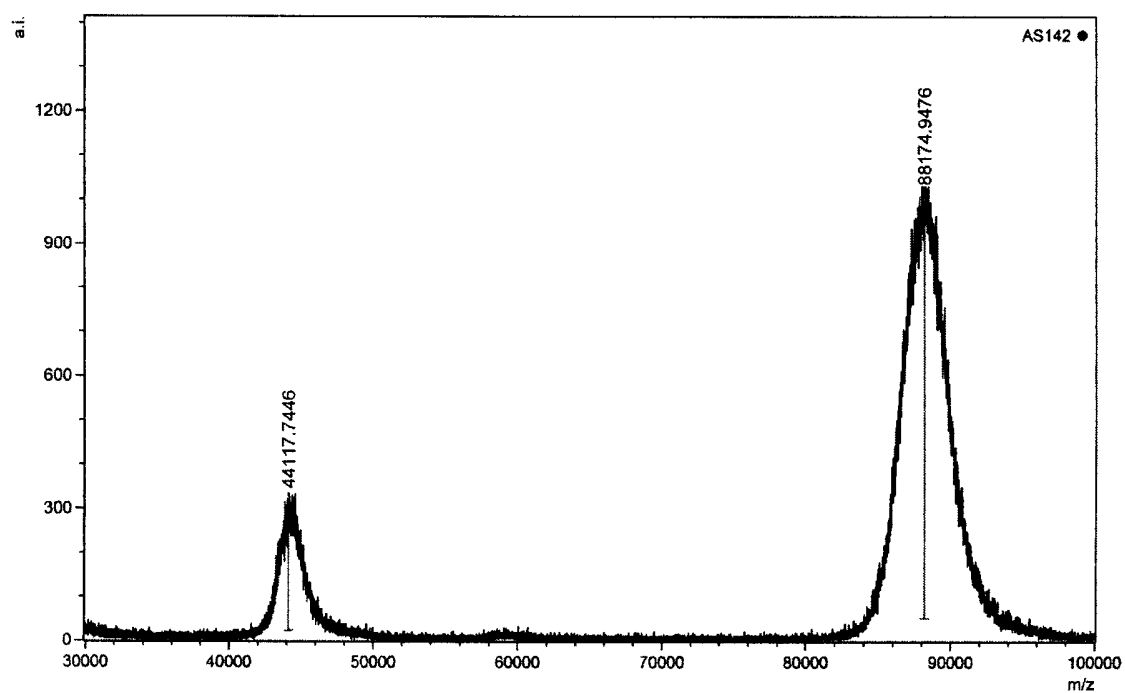
Obr. 2

2/4

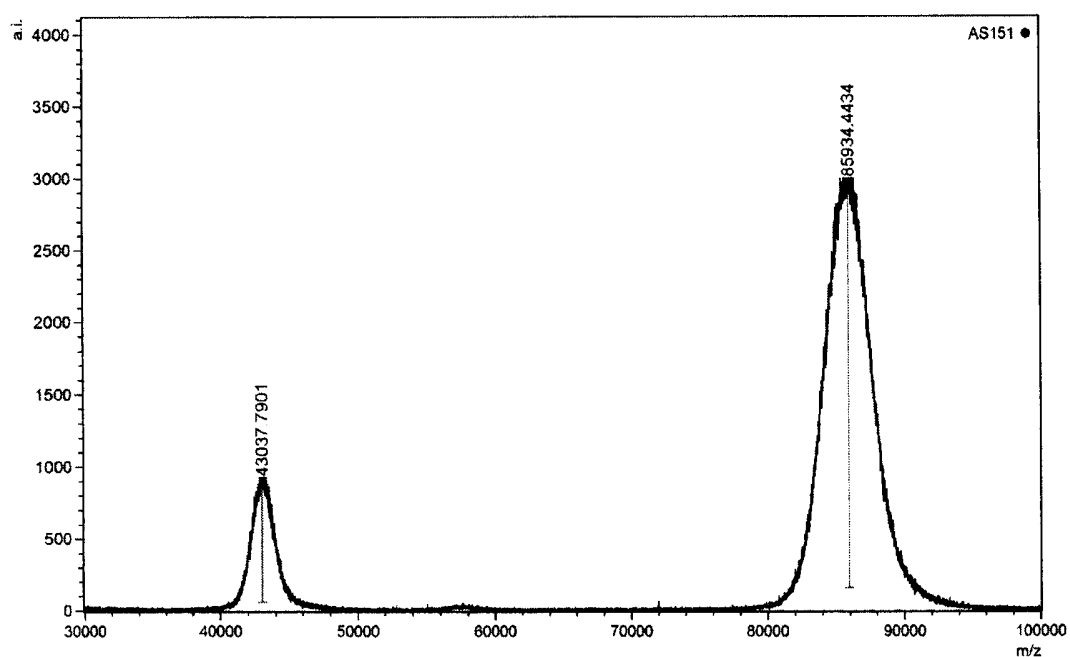
05.10.15



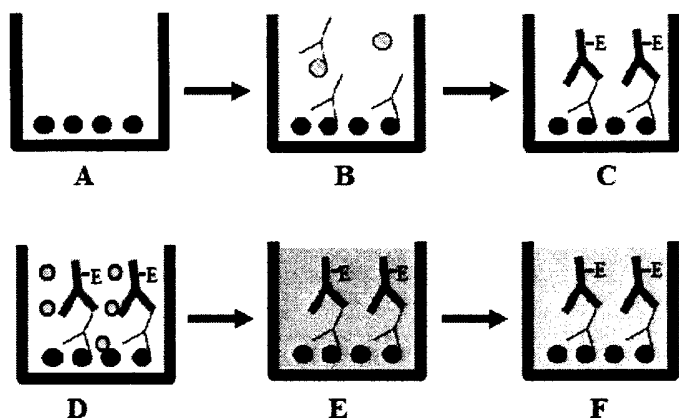
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



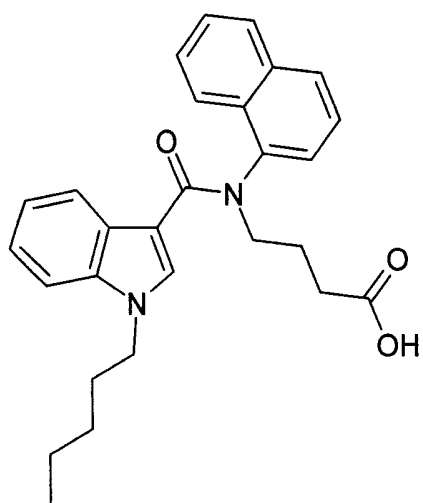
Obr. 6

konjugát kanabinoidu s BSA (označení)	koncentrace imunoreagencií ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)		I_{50} ($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)
	imobilizační konjugát	specifická protilátka	
I-BSA	0,3125	20	12,5
II-BSA	0,0125	1,25	0,4
IV-BSA	0,025	2,5	1,3

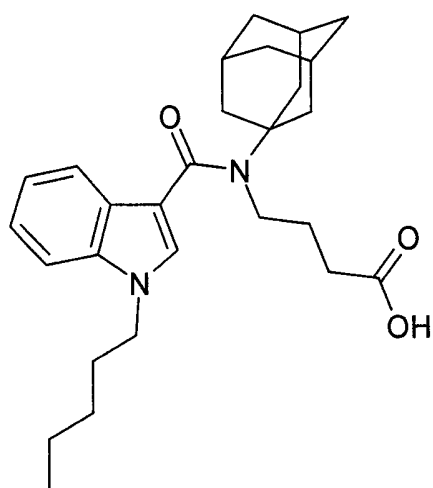
Obr. 7

4/4

05.10.13



Obr. 8



Obr. 9