(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-526745
(P2004-526745A)
(43)公表日　平成16年9月2日(2004.9.2)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
A61K 31/164	A61K	31/164	4B018
A23L 1/307	A23L	1/307	4C086
A61K 31/08	A61K	31/08	4C206
A61K 31/231	A61K	31/231	
A61K 31/341	A61K	31/341	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 127 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2002-578899(P2002-578899)
(86)(22)出願日	平成14年3月27日(2002.3.27)
(85)翻訳文提出日	平成15年9月26日(2003.9.26)
(86)国際出願番号	PCT/US2002/009773
(87)国際公開番号	WO2002/080860
(87)国際公開日	平成14年10月17日(2002.10.17)
(31)優先権主張番号	60/279,542
(32)優先日	平成13年3月27日(2001.3.27)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/336,289
(32)優先日	平成13年10月31日(2001.10.31)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人　398051143
ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　カリフォルニア
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４６０７－５２００，オークランド，１２ティーエイチ　フロア，フランクリン　ストリート　１１１１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

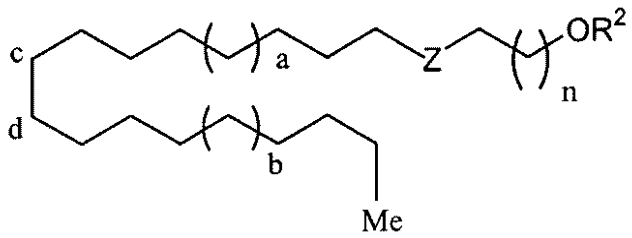
最終頁に続く

(54)【発明の名称】体脂肪を減らし脂肪酸の代謝を変調する方法、化合物および組成物

(57)【要約】
哺乳動物において、体重を減らし（図５）、体脂肪の代謝を変調させ、そして食物摂取量を減らす方法、薬学的組成物および化合物が提供される。本発明の化合物には、脂肪酸エタノールアミド化合物、そのホモログおよびアナログが挙げられ、それらの原型は、内生脂肪酸エタノールアミドであるオレオイルエタノールアミドである。１つの実施形態において、本発明は、哺乳動物の食物摂取を少なくする方法を含み、この方法は、該哺乳動物に、脂肪酸アルカノールアミドを投与する工程を包含し、ここで、この投与は、該哺乳動物において食物摂取を少なくするのに有効な量である。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
哺乳動物の食物摂取を少なくする方法であって、該哺乳動物に、脂肪酸アルカノールアミドを投与する工程を包含し、ここで、該投与は、該哺乳動物において食物摂取を少なくするのに有効な量である、方法。
【請求項２】
前記脂肪酸アルカノールアミドが、オレオイルエタノールアミドである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記脂肪酸アルカノールアミドが、アミド結合を介してエタノールアミン部分に共有結合された脂肪酸部分を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記脂肪酸部分が、モノ不飽和またはポリ不飽和されている、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記投与が、皮膚パッチを経由する、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記脂肪酸部分が、オレイン酸である、請求項４に記載の方法。
【請求項７】
前記脂肪酸部分が、１２個～２０個の炭素原子を有する、請求項３に記載の方法。
【請求項８】
前記脂肪酸が、エライジン酸、パルミトレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、α－リノレン酸およびγ－リノレン酸からなる群から選択される、請求項３に記載の方法。
【請求項９】
前記エタノールアミン部分の水酸基が、低級（C_1～C_3）アルキル基で置換されて、対応するエーテルを形成する、請求項３に記載の方法。
【請求項１０】
前記エタノールアミン部分の水酸基が、低級（C_2～C_6）アルキルカルボン酸のカルボキシレート基に結合されて、対応するエステルを形成する、請求項３に記載の方法。
【請求項１１】
前記脂肪酸エタノールアミドが、該脂肪酸エタノールアミドの窒素原子に共有結合した低級アルキル（C_1～C_3）基をさらに含有する、請求項３に記載の方法。
【請求項１２】
前記哺乳動物が、ヒトである、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記脂肪酸アルカノールアミドが、パルミトイルエタノールアミドである、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記脂肪酸アルカノールアミドが、カンナビノイドＣＢ２レセプタまたはカンナビノイドＣＢ１レセプタを活性化しない、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
前記脂肪酸アルカノールアミドが、経口経路、直腸経路、局所経路または非経口経路により、薬学的に受容可能なキャリアと共に投与される、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
哺乳動物の体脂肪または体重を減らすか制御する方法であって、該方法は、該哺乳動物に、体脂肪または体重を減らすのに有効な量で、次式の化合物またはその薬学的に受容可能な塩を投与する工程を包含する：

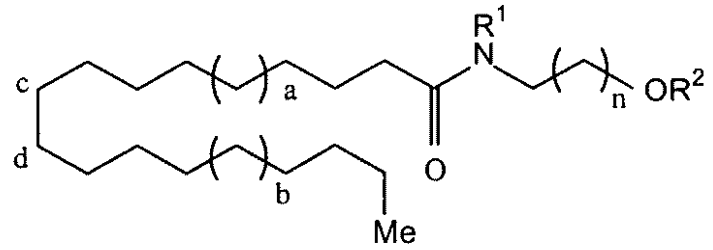
【化１】



ここで、ｎは、０～５であり、ａおよびｂの合計は、０～４であり得る；Ｚは、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{0}）－；－（Ｒ^{0}）ＮＣ（Ｏ）－；－ＯＣ（Ｏ）－；－（Ｏ）ＣＯ－；Ｏ；ＮＲ^{0}；およびＳからなる群から選択されるメンバーである；ここで、Ｒ^{0}およびＲ^{2}は、独立して、非置換または置換アルキル、水素、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルおよび低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシルからなる群から選択され、ここで、その脂肪酸部分およびアルカノール部分の４個までの水素は、メチルまたは二重結合で置換され、炭素ｃとｄとの間の結合は、不飽和または飽和であり得る、
方法。

【請求項１７】
前記化合物が、次式の化合物またはその薬学的に受容可能な塩である、請求項１６に記載の方法であって：

【化２】



ここで、ｎは、０～４であり、ａおよびｂの合計は、１～３であり、そしてＲ^{1}およびＲ^{2}は、独立して、水素、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルおよび低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシルからなる群から選択されるメンバーであり、ここで、その脂肪酸部分およびアルカノールアミン部分の４個までの水素は、メチルまたは二重結合で置換され、炭素ｃとｄとの間の結合は、不飽和または飽和であり得る、
方法。

【請求項１８】
Ｒ^{1}およびＲ^{2}が、独立して、水素、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルおよび低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$）アシルからなる群から選択される、請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】
ａ＝１であり、そしてｂ＝１である、請求項１７に記載の方法。

【請求項２０】
ｎ＝１である、請求項１７に記載の方法。

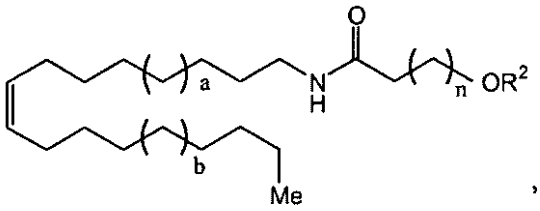
【請求項２１】
Ｒ^{1}およびＲ^{2}が、それぞれ、Ｈである、請求項１７に記載の方法。

【請求項２２】
前記炭素ｃとｄとの間の結合が、二重結合である、請求項１７に記載の方法。

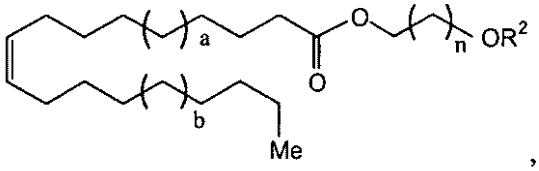
【請求項２３】
前記化合物が、オレオイルエタノールアミドである、請求項１７に記載の方法。

【請求項２４】

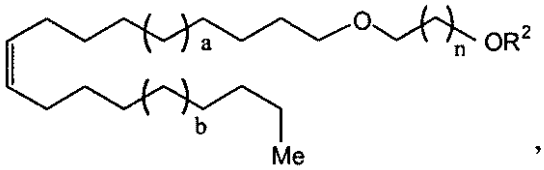
前記化合物が、パルミトイルエタノールアミドである、請求項１７に記載の方法。
【請求項２５】
前記投与が、非経口、経口、経皮、直腸または鼻内である、請求項１７に記載の方法。
【請求項２６】
前記哺乳動物が、ヒトである、請求項１７に記載の方法。
【請求項２７】
前記化合物が、次式の化合物のうちの１種である、請求項１６に記載の方法であって：
【化３】



,

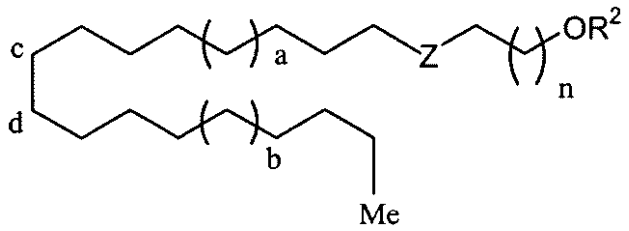


,および



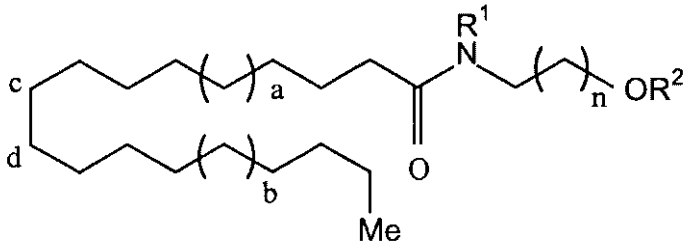
,

ここで、ｎは、１～５であり、ａおよびｂの合計は、０～４である；Ｒ^{2}は、水素、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルおよび低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシルからなる群から選択される；その脂肪酸部分およびアルカノールアミン部分の４個までの水素原子はまた、メチルまたは二重結合で置換され得る、
方法。
【請求項２８】
薬学的に受容可能な賦形剤および次式の化合物またはその薬学的に受容可能な塩を含有する、薬学的組成物であって：
【化４】



ここで、ｎは、０～５であり、ａおよびｂの合計は、０～４であり得る；Ｚは、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{0}）－；－（Ｒ^{0}）ＮＣ（Ｏ）－；－ＯＣ（Ｏ）－；－（Ｏ）ＣＯ－；Ｏ；ＮＲ^{0}；およびＳからなる群から選択されるメンバーである；ここで、Ｒ^{0}およびＲ^{2}は、独立して、非置換または置換アルキル、水素、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルおよび低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$

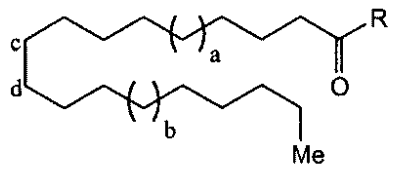
）アシルからなる群から選択され、ここで、その脂肪酸部分およびアルカノール部分の４個までの水素は、メチルまたは二重結合で置換され、炭素ｃとｄとの間の結合は、不飽和または飽和であり得る、
組成物。
【請求項２９】
前記化合物が、次式の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩である、請求項２８に記載の薬学的組成物であって：
【化５】



ここで、ｎは、１～３であり、ａおよびｂの合計は、１～３であり、そしてＲ^{1}およびＲ^{2}は、独立して、水素、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルおよび低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシルからなる群から選択されるメンバーであり、ここで、その脂肪酸部分およびアルカノール部分の４個までの水素は、メチルまたは二重結合で置換され、炭素ｃとｄとの間の結合は、不飽和または飽和であり得る、
組成物。
【請求項３０】
前記組成物が、単位投薬量フォーマットであり、そして該単位用量が、体重を減らすか制御する該化合物の有効量を含有する、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３１】
前記量が、約１０ｍｇ～約１０００ｍｇである、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３２】
前記量が、約１ｍｇ～１００ｍｇである、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３３】
前記量が、約１００ｍｇ～５００ｍｇである、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３４】
前記化合物が、パルミトイルエタノールアミドである、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３５】
前記組成物が、局所組成物、経口組成物または非経口組成物である、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３６】
Ｒ^{1}およびＲ^{2}が、独立して、水素、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルおよび低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$）アシルからなる群から選択される、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３７】
ａ＝１であり、ｂ＝１であり、そしてｎ＝１である、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３８】
前記化合物が、オレオイルエタノールアミドである、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３９】
Ｒ^{1}およびＲ^{2}が、それぞれ、Ｈである、請求項２９に記載の組成物。
【請求項４０】
前記炭素ｃと炭素ｄとの間の結合が、二重結合である、請求項３０に記載の組成物。
【請求項４１】
前記化合物が、パルミトイルエタノールアミドである、請求項３０に記載の組成物。
【請求項４２】

薬学的に受容可能な賦形剤および次式の化合物またはその薬学的に受容可能な塩を含有する、薬学的組成物であって：

【化６】



ここで、ａおよびｂの合計は、０～４であり、上式の脂肪酸部分の４個までの水素原子はまた、メチルまたは二重結合であり得；そして炭素ｃとｄとの間の分子結合は、不飽和または飽和であり得、そしてＲは、直鎖および分枝鎖のアルキルアミン、環状アルキルアミン、フラン、テトラヒドロフラン、ピロール、ピロリジンおよびピリジンからなる群から選択される基を表わす；ここで、該化合物は、哺乳動物に投与したとき、食物摂取を減らすのに有効な量で、存在している、

薬学的組成物。

【請求項４３】

哺乳動物に投与すると体重を減らす有効量で、薬学的に受容可能な賦形剤および脂肪酸アルカノールアミドを含有する、薬学的組成物。

【請求項４４】

前記脂肪酸部分が、オレイン酸である、請求項４６に記載の組成物。

【請求項４５】

前記脂肪酸部分が、１２個～２０個の炭素原子を有する、請求項４６に記載の組成物。

【請求項４６】

前記脂肪酸が、エライジン酸、パルミトレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、α－リノレン酸およびγ－リノレン酸からなる群から選択される、請求項４６に記載の組成物。

【請求項４７】

前記アルカノールアミドのアルカノールアミンが、エタノールアミンである、請求項４６に記載の組成物。

【請求項４８】

前記組成物が、腸溶性経口処方物である、請求項４６に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（関連出願の相互参照）

本願は、２００１年１０月３１日に出願された米国特許出願第６０／３３６，２８９号および２００１年3月２７日に出願された米国特許出願第６０／２７９，５４２号から優先権を主張している。これらの出願の内容は、本明細書中で参考として援用されている。

【０００２】

（連邦政府が後援した研究および開発の下で行われた発明の権利に関する記載）

本発明は、国立衛生研究所が授与した認可第ＤＡ　１２６５３の下に、政府の支援で行われた。政府は、本発明について、一定の権利を有する。

【０００３】

（発明の分野）

本発明は、体脂肪を減らし摂取量を減らし脂質代謝を変調する薬理学的に活性な試薬として、脂肪酸エタノールアミド、それらのホモログ、それらのアナログおよびそれらの使用に関する。

【背景技術】

【０００４】
（発明の背景）
肥満は、世界的な健康上の難題であり、米国および他の先進国では、憂慮すべきレベルに達している。米国では、約９千７百万人が、太りすぎである。これらのうち、４千万人が、肥満である。肥満および太りすぎは、多くの疾患のリスクを高める。高血圧；２型糖尿病；異脂肪血症；冠状動脈性心臓病；脳卒中；胆嚢疾患；骨関節炎；睡眠時無呼吸および他の呼吸器の問題；および子宮内膜癌、乳癌、前立腺癌および大腸癌は、重い体重に関連している。体重の重い人はまた、全ての癌による死亡率が高い。国立衛生研究所によれば、毎年、米国における約２８０，０００人の成人の死亡は、一部には、肥満に起因し得る。
【０００５】
肥満の人および太りすぎの人の場合、体重を減らすことが望ましい。体重を減らすと、特に、糖尿病および循環器病（ＣＶＤ）に関して、これらの有害な結果の多くを防止するのに役立ち得る。減量すると、また、太りすぎによる高血圧の人も高血圧でない人も、血圧、血清トリグリセリドレベルが低下し得、また、コレステロールの有益な高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）形状が増加し得る。減量すると、また、一般に、全血清コレステロールレベルおよび低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）－コレステロールレベルが、ある程度低下する。減量すると、また、太りすぎの人および肥満の人において、血中グルコースレベルが低下し得る。
【０００６】
減量が望ましいものの、達成するのは困難である。太りすぎおよび肥満を管理する治療および減量を管理する治療は多い。しかしながら、再び肥満になることが多い。およそ４０％の女性および２４％の男性は、現在、積極的に減量に努めている。その治療には、低カロリー食および低脂肪食；運動；食物摂取量を減らすことに向けた行動療法、薬物療法；および上記の組合せが挙げられる。
【０００７】
薬物による減量は、比較的に少ない。シブトラミン、デキフェンフルラミン、オルリスタット、フェニルプロパノラミン、フェンテルミンまたはフェンフルラミンは、長期間使用するとき、肥満の成人における減量を促進できる。しかしながら、一般に、薬物療法による減量剤を長期間使用することによる安全性は、未知である。例えば、最近では、患者に心臓弁膜症が観察された問題のために、フェンフルラミンおよびデキフェンフルラミンは、市場から回収された。痩せ薬に関する事実および肥満および太りすぎの高い罹患率のために、減量を促進し維持する新しい薬剤療法および組成物が必要とされている。
【０００８】
脂肪酸エタノールアミン（ＦＡＥ）は、動物および植物の脂質の有用な成分であり、無刺激細胞中のそれらの濃度は、一般に、低い（Ｂａｃｈｕｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２４０：１０１９～１０２４（１９６５）；Ｓｃｈｍｉｄら、Ｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓ．Ｌｉｐｉｄｓ，８０：１３３～１４２（１９９６）；Ｃｈａｐｍａｎ，Ｋ．Ｄ．，Ｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓ．Ｌｉｐｉｄｓ，１０８：２２１～２２９（２０００））。しかしながら、ＦＡＥ生合成は、以下を含めた広範囲の生理学的刺激および病理学的刺激に応答して、急速に高められ得る：タバコ細胞中の真菌病原体への暴露（Ｃｈａｐｍａｎら、Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏ．，１１６：１１６３～１１６８（１９９８））、ラットの脳神経細胞における神経伝達物質レセプタの活性化（Ｄｉ Ｍａｒｚｏら、Ｎａｔｕｒｅ，３７２：６８６～６９１（１９９４）；Ｇｉｕｆｆｒｉｄａら、Ｎａｔ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，２：３５８～３６３（１９９９））およびマウス上皮細胞における代謝ストレッサーへの暴露（Ｂｅｒｄｙｓｈｅｖら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．３４６：３６９～３７４（２０００））。哺乳動物の組織における刺激依存性のＦＡＥ発生の基礎になっている機構は、以下の２つの協奏した生化学反応が関与していると考えられている：膜リン脂質であるＮ－アシルホスファチジルエタノールアミン（ＮＡＰＥ）であって、これは、未知のホスホリパーゼＤで触媒化される；およびＮＡＰＥ合成であって、これは、カルシウムイオンおよび環状Ａ

ＭＰ制御Ｎ－アシルトランスフェラーゼ（ＮＡＴ）活性で触媒される（Ｄｉ　Ｍａｒｚｏら、Ｎａｔｕｒｅ，３７２：６８６～６９１（１９９４）；Ｃａｄａｓら、Ｊ．ＮｅｕｒｏＳｃｉ．，６：３９３４～３９４２（１９９６）；Ｃａｄａｓら、Ｈ．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，１７：１２２６～１２４２（１９９７））。

【０００９】

植物および動物の両方の細胞が刺激に依存した様式でＦＡＥを放出するという事実は、これらの化合物が細胞間連絡において重要な役割を果たし得ることを示唆している。この考えを支持するさらに別の事柄は、ポリ不飽和ＦＡＥであるアナンダミド（アラキノイルエタノールアミド）がカンナビノイドレセプタ（Ｄｅｖａｎｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５８：１９４６～１９４９（１９９２））用の内生配位子であるという発見に基づいており、このレセプタは、神経細胞および免疫細胞（これは、大麻成分であるΔ^9－テトラヒドロカンナビノール（Δ^9－ＴＨＣ）を認識する）で発現されるＧタンパク質結合レセプタである（再検討のために、参考文献（Ｐｅｒｔｗｅｅ，Ｒ．Ｇ．，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｒｕｇｓ，９：１５５３～１５７１（２０００）を参照）。

【００１０】

２つの観察により、カンナビノイド神経伝達に他のＦＡＥも関与することは、ありそうにない。ＦＡＥ系統は、大部分は、飽和種およびモノ不飽和種（例えば、パルミチルエタノールアミドおよびオレオイルエタノールアミド（これらは、カンナビノイドレセプタとはあまり相互作用しない））から構成される（Ｄｅｖａｎｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５８：１９４６～１９４９（１９９２）；Ｇｒｉｆｆｉｎｓら、Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．，２９２：８８６～８９４．（２０００））。第二に、ＦＡＥｓの薬理学的特性を、パルミチルエタノールアミドと同様に、ある程度詳細に研究したとき、このような特性は、Δ^9－ＴＨＣのものとは異なり、公知のカンナビノイドレセプタ亜型の活性化とは無関係であることが発見された（Ｃａｌｉｇｎａｎｏら、Ｎａｔｕｒｅ，３９４：２７７～２８１（１９９８））。それゆえ、ＦＡＥｓの生物学的な重要性は、理解しにくいままである。

【００１１】

オレオイルエタノールアミド（ＯＥＡ）は、内生カンナビノイドアナンタミドの天然アナログである。アナンタミドと同様に、ＯＥＡは、刺激依存様式で細胞内で産生され、酵素加水分解により急速になくなり、細胞情報伝達で一定の役割を果たすことを示唆している。しかしながら、アナンタミドと異なり、ＯＥＡは、カンナビノイドレセプタを活性化せず、その生物学的機能は、従来、事実上未知であった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１２】

肥満および太りすぎを治療するだけでなく体重減少を維持する別の方法および薬剤が必要とされている。本発明は、オレオイルエタノールアミド（ＯＥＡ）および他の脂肪酸エタノールアミド化合物（例えば、パルミチルエタノールアミド、エライジルエタノールアミド）が、食欲、食物摂取量、体重および体脂肪を減らして脂肪代謝を変えることができるという本発明者の発見に関連した新規方法および薬学的組成物を提供することにより、この必要性を満たす。

【課題を解決するための手段】

【００１３】

（発明の要旨）

本発明は、体脂肪を減らし、哺乳動物における肥満および太りすぎおよびそれらの健康状態に関連した疾患を治療する化合物、組成物および方法を提供する。１局面では、本発明は、体脂肪、体重を減らすか体脂肪または体重の増加を阻止するのに十分な量で、脂肪酸アルカノールアミド化合物、ホモログまたはアナログを含有する薬学的組成物を投与することにより、肥満または太りすぎを治療するか防止し食物摂取量を減らす方法を提供する。他の局面では、本発明は、脂肪酸エタノールアミド化合物、ホモログ、アナログ；それ

らの薬学的組成物およびこのような使用方法に関する。

【００１４】

他の実施形態では、この脂肪酸アルカノールアミドまたはエタノールアミド化合物、ホモログまたはアナログの脂肪酸部分は、飽和または不飽和であり得、もし不飽和なら、モノ不飽和またはポリ不飽和であり得る。

【００１５】

ある実施形態では、この脂肪酸アルカノールアミドまたはエタノールアミド化合物、ホモログまたはアナログの脂肪酸部分は、オレイン酸、パルミチン酸、エライジン酸、パルミトレイン酸、リノール酸、α－リノレン酸およびγ－リノレン酸からなる群から選択される脂肪酸である。ある実施形態では、これらの脂肪酸部分は、１２個～２０個の炭素原子を有する。

【００１６】

他の実施形態は、この脂肪酸アミド化合物、ホモログまたはアナログのヒドロキシアルキルアミド部分を変えることにより、提供される。これらの実施形態は、アルカノールアミドまたはエタノールアミドの水酸基に置換または非置換低級（C_1～C_3）アルキル基を導入して対応する低級アルキルエーテルを形成することを包含する。他の実施形態では、このアルカノールアミドまたはエタノールアミド部分の水酸基は、C_2～C_6置換または非置換アルキルカルボン酸のカルボキシレート基に結合されて、その脂肪酸エタノールアミドの対応するエステルを形成する。このような実施形態は、有機カルボン酸（例えば、酢酸、プロピオン酸およびブタン酸）とのエステル連鎖中にて、脂肪酸アルカノールアミドおよび脂肪酸エタノールアミドを含有する。１実施形態では、この脂肪酸アルカノールアミドは、オレオイルアルカノールアミドである。別の実施形態では、この脂肪酸アルカノールアミドは、オレオイルエタノールアミドである。

【００１７】

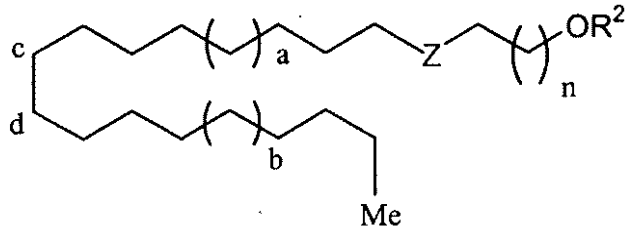
さらに他の実施形態では、この脂肪酸エタノールアミド化合物、ホモログまたはアナログは、さらに、その脂肪酸エタノールアミドの窒素原子に共有結合された置換または非置換低級アルキル（C_1～C_3）基を含有する。

【００１８】

他の局面では、本発明は、薬学的に受容可能な賦形剤および次式の化合物またはその薬学的に受容可能な塩を含有する薬学的組成物を提供する：

【００１９】

【化７】



(I).

この式において、ｎは、０～５であり、ａおよびｂの合計は、０～４であり得る；Ｚは、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（R^0）－；－（R^0）ＮＣ（Ｏ）－；－ＯＣ（Ｏ）－；－（Ｏ）ＣＯ－；Ｏ；NR^0；およびＳからなる群から選択されるメンバーである；ここで、R^0およびR^2は、独立して、非置換または置換アルキル、水素、置換または非置換C_1～C_6アルキル、置換または非置換低級（C_1～C_6）アシル、ホモアルキルおよびアリールからなる群から選択される。その脂肪酸部分およびエタノールアミン部分のいずれかまたは両方の４個までの水素は、メチルまたは二重結合で置換され得る。それに加えて、炭素ｃとｄとの間の分子結合は、不飽和または飽和であり得る。ある実施形態では、上式の脂肪酸エタノールアミドは、天然に生じる化合物である。

【００２０】

本発明の他の局面では、これらの方法および化合物は、脂肪酸エタノールアミドおよび脂肪酸アルカノールアミド化合物、ホモログおよびアナログを使用して、試験動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ハムスター、モルモット）に投与したとき、その化合物、ホモログおよびアナログが減量を引き起こすようにされる。

【００２１】

さらに他の実施形態では、本発明は、体脂肪、体重および食欲を減らすためにアリールチアゾリジンジオン化合物およびヘテロアリールおよびアリールオキシ酢酸型化合物を使用する方法に関する。

【００２２】

本発明のさらに他の局面は、哺乳動物（例えば、ヒト、ネコまたはイヌ）において、体重を減らすか食欲を減らすか食物摂取量を減らすか食細りを引き起こすために対象化合物および組成物を使用して投与する方法を検討する。これらの対象組成物は、種々の経路（経口を含めて）により、投与され得る。

【００２３】

（発明の詳細な説明）

本発明は、ＯＥＡおよび他の脂肪酸アルカノールアミド化合物が、食物摂取量、体重および体脂肪を減らし、脂肪酸酸化を変調するという驚くべき発見に関する。驚くべきことに、オレオイルエタノールアミド（ＯＥＡ）（哺乳動物において、従来未知の生体機能を有する天然脂質）は、試験動物に投与したとき、強力な体脂肪低減および体重抑制化合物であることが発見された。米国特許出願第６０／２７９，５４２号（これは、２００１年３月２７日に出願され、本願と同じ出願人に譲渡され、その内容は、本明細書中で参考として援用されている）は、哺乳動物における体脂肪および食欲を減らすことができる薬剤として、ＯＥＡおよびＯＥＡ様化合物を開示している。

【００２４】

原型ＯＥＡが発見されると、他の脂肪酸アルカノールアミド化合物およびホモログもまた、活性であることが分かった。

【００２５】

ＯＥＡは、肥満を治療し減量を誘発し食欲または食物摂取量を減らすために、他の脂肪酸アルカノールアミド様の脂肪低減化合物の開発におけるモデルとして、役立ち得る。本発明は、以下で開示するように、このような他の化合物を提供する。

【００２６】

ＯＥＡを投与すると、食欲、食物摂取量および体重を減らすように作用するという発見は、体重および食欲抑制剤としての他の脂肪酸エタノールアミド、ホモログおよびアナログを同定するのに使用できる。本発明は、このような薬剤を提供する。

【００２７】

（定義）

本明細書中で使用する略語は、化学分野および生物分野でのそれらの通常の意味を有する。

【００２８】

置換基は、それらの通常の化学式で明記され、左から右に書いた場合、同様に、その構造を右から左に書いたことによる化学的に同じ置換基を包含する（例えば、－ＣＨ$_2$Ｏ－は、また、－ＯＣＨ$_2$－も意味する）。

【００２９】

「組成物」との用語は、薬学的組成物と同様に、キャリアを構成する活性試薬および不活性試薬を含有する生成物だけでなく、直接的または間接的に、これらの成分の任意の２種またはそれ以上の組合せ、錯化または凝集から、またはこれらの成分の１種またはそれ以上のの他の種類の反応または相互作用から生じる任意の生成物を包含すると解釈される。従って、本発明の薬学的組成物は、本発明の化合物および薬学的に受容可能なキャリアを混合することにより製造される任意の組成物を包含する。「薬学的組成物」との用語は、動物またはヒトを含めた被験体で医薬品用途に適切な組成物を意味する。薬学的組成物は

、一般に、有効量の活性剤および薬学的に受容可能なキャリアを含有する。

【００３０】

本発明の化合物は、１種またはそれ以上の非対称中心を含有し得、それにより、ラセミ化合物およびラセミ混合物、単一の鏡像異性体、ジアステレオマー混合物および個々のジアステレオマーとして、起こり得る。本発明は、本発明の化合物のこのような異性体形状の全てを包含することを意味する。

【００３１】

本明細書で記述した化合物の一部は、オレフィン性二重結合を含有し、特に明記しない限り、ＥおよびＺの両方の幾何異性体を含むことを意味する。

【００３２】

本明細書中で記述した化合物の一部は、異なる水素結合点と共に存在し得、これは、互変異性体と呼ばれている。このような例は、ケトンおよびそのエノール形状（これは、ケト－エノール互変異性体として知られている）であり得る。個々の互変異性体だけでなく、それらの混合物は、本発明の式に包含される。

【００３３】

本発明の化合物は、鏡像異性体の対のジアステレオ異性体を含む。ジアステレオマーは、例えば、適切な溶媒（例えば、メタノールまたは酢酸エチルまたはそれらの混合物）から分別再結晶することにより、得ることができる。そのように得られた鏡像異性体の対は、例えば、分割剤として光学活性酸を使用することにり、通常の手段により、個々の立体異性体に分離され得る。

【００３４】

あるいは、本発明の化合物の任意の鏡像異性体は、公知の立体配置の光学的に純粋な出発物質を使用して、立体特異的合成により、得ることができる。

【００３５】

本明細書中で使用する「ヘテロ原子」との用語は、酸素（Ｏ）、窒素（Ｎ）、イオウ（Ｓ）およびケイ素（Ｓｉ）を含むことを意味する。

【００３６】

本明細書中で使用する「アルカノール」とは、飽和または不飽和で置換または非置換の分枝または非分枝アルキル基であって、ヒドロキシル置換基、またはヒドロキシル部分から誘導可能な置換基（例えば、エーテル、エステル）を有するものを意味する。このアルカノールはまた、好ましくは、窒素－、イオウ－または酸素を有する置換基で置換され、これは、「脂肪酸」とアルカノールとの間で、結合Ｚ（式Ｉ）に含まれる。

【００３７】

本明細書中で使用される「脂肪酸」とは、飽和または不飽和で置換または非置換の分枝または非分枝アルキル基であって、カルボキシル置換基を有するものを意味する。好ましい脂肪酸には、C_4～C_{22}酸がある。脂肪酸はまた、そのカルボキシル置換基を－CH_2－部分で置き換えた種を包含する。

【００３８】

「アルキル」との用語は、単独で、または他の置換基の一部として、特に明記しない限り、直鎖または分枝鎖または環状の炭化水素遊離基、またはそれらの組合せを意味し、これは、完全に飽和であるか、モノ不飽和またはポリ不飽和であり得、二価または多価ラジカル（これは、指定した数の炭素原子を有する（すなわち、C_1～C_{10}は、１個～１０個の炭素を意味する））。飽和炭化水素遊離基の例には、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル、それらのホモログおよび異性体（例えば、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、ｎ－オクチルなど）のような基が挙げられるが、これらに限定されない。不飽和アルキル基は、１個またはそれ以上の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例には、ビニル、２－プロペニル、クロチル、２－イソペンテニル、２－（ブタジエニル）、２，４－ペンタジエニル、３－（１，４－ペンタジエニル）、エチニル、１－および３－プロピニル、３－ブチ

ニルおよびそれらより高級なホモログおよび異性体が挙げられるが、これらに限定されない。「アルキル」との用語は、他に断らない限り、また、以下で詳細に定義するアルキル誘導体（例えば、「ヘテロアリール」）を含むことを意味する。炭化水素基に限定されないアルキル基は、「ホモアルキル」と称される。

【００３９】

「アルキレン」との用語は、単独で、または他の置換基の一部として、－$CH_2CH_2CH_2CH_2$－で例示されるように（それに限定されないが）、アルカンから誘導した二価遊離基を意味し、さらに、「ヘテロアルキレン」として以下で記述の基を含む。典型的には、アルキル（またはアルキレン）基は、１個～２４個の炭素原子を有し、本発明では、１０個またはそれより少ない炭素原子を有するものが好ましい。「低級アルキル」または「低級アルキレン」とは、それより短い鎖のアルキル基またはアルキレン基であり、これは、一般に、８個またはそれより少ない炭素原子を有する。

【００４０】

「アルコキシ」、「アルキルアミノ」および「アルキルチオ」（またはチオアルコキシ）との用語は、それらの通常の意味で使用され、それぞれ、酸素原子、アミノ基またはイオウ原子を介して、その分子の残部に結合したアルキル基を意味する。

【００４１】

「ヘテロアルキル」との用語は、単独で、または他の用語と組み合わせて、特に明記しない限り、安定な直鎖または分枝鎖または環状の炭化水素基またはその組合せであって、規定数の炭素原子と、Ｏ、Ｎ、ＳｉおよびＳからなる群から選択される少なくとも１個のヘテロ原子とからなるものを意味し、ここでこの窒素原子およびイオウ原子は、必要に応じて、酸化され得、その窒素ヘテロ原子は、必要に応じて、四級化され得る。ヘテロ原子であるＯ、Ｎ、ＳおよびＳｉは、このヘテロアリール基の任意の内部位置、またはそのアルキル基が分子の残部に結合した位置で、配置され得る。例には、－CH_2－CH_2－Ｏ－CH_3、－CH_2－CH_2－ＮＨ－CH_3、－CH_2－CH_2－Ｎ（CH_3）－CH_3、－CH_2－Ｓ－CH_2－CH_3、－CH_2－CH_2、－Ｓ（Ｏ）－CH_3、－CH_2－CH_2－Ｓ（Ｏ）$_2$$CH_3$、－ＣＨ＝ＣＨ－Ｏ－$CH_3$、－Ｓｉ（$CH_3$）$_3$、－$CH_2$－ＣＨ＝Ｎ－Ｏ$CH_3$および－ＣＨ＝ＣＨ－Ｎ（$CH_3$）－$CH_3$が挙げられる。２個までのヘテロ原子は、連続的であり得る（例えば、－CH_2－ＮＨ－ＯCH_3および－CH_2－Ｏ－Ｓｉ（CH_3）$_3$）。同様に、「ヘテロアルキレン」との用語は、単独で、または他の置換基の一部として、－CH_2－CH_2－Ｓ－CH_2－CH_2－および－CH_2－Ｓ－CH_2－CH_2－ＮＨ－CH_2－で例示されるように（それらに限定されないが）、ヘテロアルキルから誘導した二価の基を意味する。ヘテロアルキレン基については、ヘテロ原子はまた、その鎖末端のいずれかまたは両方を占めることができる（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）。さらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基については、その連結基の配向は、この連結基の式が書かれている方向では示されない。例えば、式－Ｃ（Ｏ）$_2$Ｒ’－は、－Ｃ（Ｏ）$_2$Ｒ’－および－Ｒ’Ｃ（Ｏ）$_2$－の両方を意味する。

【００４２】

「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」との用語は、単独で、または他の用語と組み合わせて、特に明記しない限り、「アルキル」および「ヘテロアルキル」の環状型を表わす。さらに、ヘテロシクロアルキルについては、ヘテロ原子は、その複素環が分子の残部に結合した位置を占めることができる。シクロアルキルの例には、シクロペンチル、シクロヘキシル、１－シクロヘキセニル、３－シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロシクロアルキルの例には、１－（１，２，５，６－テトラヒドロピリジル）、１－ピペリジニル、２－ピペリジニル、３－ピペリジニル、４－モルホリニル、３－モルホリニル、テトラヒドロフラン－２－イル、テトラヒドロフラン－３－イル、テトラヒドロチエン－２－イル、テトラヒドロチエン－３－イル、１－ピペラジニル、２－ピペラジニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４３】
「ハロ」または「ハロゲン」との用語は、単独で、または他の置換基の一部として、特に明記しない限り、フッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子を意味する。さらに、「ハロアルキル」のような用語は、モノハロアルキルおよびポリハロアルキルを含むことを意味する。例えば、「ハロ（C_1～C_4）アルキル」との用語は、トリフルオロメチル、２，２，２－トリフルオロエチル、４－クロロブチル、３－ブロモプロピルなどを含むが、これらに限定されない。
【００４４】
「アリール」との用語は、特に明記しない限り、ポリ不飽和の芳香族炭化水素置換基を意味し、これは、単一環または複数環（好ましくは、１個～３個の環）であり得、これらは、共に縮合されるか、または共有結合される。「ヘテロアリール」との用語は、Ｎ、ＯおよびＳから選択される１個～４個のヘテロ原子を含有するアリール基（または環）を意味し、ここで、その窒素原子およびイオウ原子は、必要に応じて、酸化され、これらの窒素原子は、必要に応じて、四級化される。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子を介して、その分子の残部に結合できる。アリール基およびヘテロアリール基の非限定的な例には、フェニル、１－ナフチル、２－ナフチル、４－ビフェニル、１－ピロリル、２－ピロリル、３－ピロリル、３－ピラゾリル、２－イミダゾリル、４－イミダゾリル、ピラジニル、２－オキサゾリル、４－オキサゾリル、２－フェニル－４－オキサゾリル、５－オキサゾリル、３－イソキサゾリル、４－イソキサゾリル、５－イソキサゾリル、２－チアゾリル、４－チアゾリル、５－チアゾリル、２－フリル、３－フリル、２－チエニル、３－チエニル、２－ピリジル、３－ピリジル、４－ピリジル、２－ピリミジル、４－ピリミジル、５－ベンゾチアゾリル、プリニル、２－ベンズイミダゾリル、５－インドリル、１－イソキノリル、５－イソキノリル、２－キノキサリル、５－キノキサリル、３－キノリルおよび６－キノリルが挙げられる。上記アリールおよびヘテロアリール環系の各々に対する置換基は、下記の受容可能な置換基の群から選択される。
【００４５】
簡略化のために、「アリール」との用語は、上で定義したようなアリール環およびヘテロアリール環の両方を含む。それゆえ、「アリールアルキル」との用語は、アリール基がアルキル基に結合した基（例えば、ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなど）を含むことを意味し、これには、炭素原子（例えば、メチレン基）を、例えば、酸素原子で置換したアルキル基（例えば、フェニルメチル、２－ピリジルオキシメチル、３－（１－ナフチルオキシ）プロピルなど）が挙げられる。
【００４６】
上記用語の各々（例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」および「ヘテロアリール」）は、指定した基の置換形状および非置換形状の両方を含むことを意味する。各型の基に好ましい置換基は、以下で提供する。
【００４７】
アルキルおよびヘテロアルキル基（これには、しばしば、アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニルおよびヘテロシクロアルケニルと呼ばれる基が含まれる）の置換基は、０個～（２ｍ’＋１）個の範囲の数（ここで、ｍ’は、このような基内の全炭素原子数である）数で、以下から選択される（これらに限定されない）種々の基の１種またはそれ以上であり得る：－ＯＲ’、＝Ｏ、＝ＮＲ’、＝Ｎ－ＯＲ’、－ＮＲ’Ｒ”、－ＳＲ’、－ハロゲン、－ＳｉＲ’Ｒ”Ｒ”’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’、－CO_2Ｒ’、－ＣＯＮＲ’Ｒ”、－ＯＣ（Ｏ）ＮＲ’Ｒ”、－ＮＲ”Ｃ（Ｏ）Ｒ’、－ＮＲ’－Ｃ（Ｏ）ＮＲ”Ｒ”’、－ＮＲ”Ｃ（Ｏ）$_2$Ｒ’、－ＮＲ－Ｃ（ＮＲ’Ｒ”Ｒ”’）＝ＮＲ”’、－ＮＲ－Ｃ（ＮＲ’Ｒ”）＝ＮＲ”’、－Ｓ（Ｏ）Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＮＲ’Ｒ”、－ＮＲＳO_2Ｒ’、－ＣＮおよび－NO_2。Ｒ’Ｒ”Ｒ”’およびＲ””は、好ましくは、独立して、水素、置換または非置換ヘテロアルキル基、置換または非置換アリール（例えば、１個～３個のハロゲンで置換されたアリール）基、置換または

非置換アルキル基、アルコキシ基またはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を意味する。本発明の化合物は、１個より多いＲ基を含有し、例えば、これらのＲ基の各々は、これらの基の１個より多くが存在しているとき、独立して、各Ｒ’Ｒ”Ｒ”’およびＲ””基であるように、選択される。Ｒ’およびＲ”は、同じ窒素原子に結合されるとき、その窒素原子と組み合わされて、５員、６員または７員の環を形成できる。例えば、－ＮＲ’Ｒ”は、１－ピロリジニルおよび４－モルホリニルを含む（これらに限定されない）ことを意味する。置換基の上記論述から、当業者は、「アルキル」との用語が水素基以外の基に結合した炭素原子を含有する基（例えば、ハロアルキル（例えば、－CF_3およびCH_2CF_3）およびアシル（例えば、－Ｃ（Ｏ）CH_3、－Ｃ（Ｏ）CF_3、－Ｃ（Ｏ）CH_2OCH_3）を含むことを意味する。

【００４８】

そのアルキル基について記述した置換基と類似して、アリール基およびヘテロアリール基の置換基は、変わり、例えば、０個からこの芳香環系上の開放（ｏｐｅｎ）原子価の全数まで数で、以下から選択される：ハロゲン、－ＯＲ’、＝Ｏ、＝ＮＲ’、＝Ｎ－ＯＲ’、－ＮＲ’Ｒ”、－ＳＲ’、－ハロゲン、－ＳｉＲ’Ｒ”Ｒ”’、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ’、－Ｃ（Ｏ）Ｒ’、－CO_2Ｒ’、－ＣＯＮＲ’Ｒ”、－ＯＣ（Ｏ）ＮＲ’Ｒ”、－ＮＲ”Ｃ（Ｏ）Ｒ’、－ＮＲ’－Ｃ（Ｏ）ＮＲ”Ｒ”’、－ＮＲ”Ｃ（Ｏ）$_2$Ｒ’、－ＮＲ－Ｃ（ＮＲ’Ｒ”Ｒ”’）＝ＮＲ””、－ＮＲ－Ｃ（ＮＲ’Ｒ”）＝ＮＲ”’、Ｓ（Ｏ）Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ’、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＮＲ’Ｒ”、－$NRSO_2$Ｒ’、－ＣＮおよび－NO_2、－Ｒ’、－N_3、－ＣＨ（Ｐｈ）$_2$、フルオロ（C_1～C_4）アルコキシおよびフルオロ（C_1～C_4）アルキル；ここで、Ｒ’Ｒ”Ｒ”’およびＲ””は、好ましくは、独立して、水素、（C_1～C_8）アルキルおよびヘテロアルキル、非置換アリールおよびヘテロアリール、（非置換アリール）－（C_1～C_4）アルキルおよび（非置換アリール）オキシ－（C_1～C_4）アルキルから選択される。本発明の化合物は、１個より多いＲ基を含有し、例えば、これらのＲ基の各々は、これらの基の１個より多くが存在しているとき、独立して、各Ｒ’Ｒ”Ｒ”’およびＲ””基であるように、選択される。

【００４９】

「体脂肪低下」との用語は、体脂肪の一部の減少を意味する。

【００５０】

肥満度指数（ＢＭＩ）を計算する式は、［体重（ポンド）÷身長（インチ）÷身長（インチ）］×７０３である。成人のＢＭＩの分岐点は、以下の指針を使って、年齢または性別に関係なく、定数である：太りすぎの成人は、２５．０～２９．９のＢＭＩを有する。肥満の成人は、３０．０以上のＢＭＩを有する。標準体重以下の成人は、１８．５未満のＢＭＩを有する。成人の正常な体重範囲は、１８．５と２５の間のＢＭＩとして規定される。１６歳未満の子供のＢＭＩ分岐点は、百分位数に従って規定される：太りすぎは、年齢について、８５位より高い百分位数のＢＭＩとして規定され、また、肥満は、年齢について、９５位より高いＢＭＩとして規定される。標準体重以下は、年齢について、５位未満のＢＭＩとして規定される。子供の正常な体重範囲は、５位より高く８５位より低いＢＭＩとして規定される。

【００５１】

「脂肪酸酸化」との用語は、脂肪酸（例えば、オレエート）がケトン体に変換することに関係している。

【００５２】

「肝細胞」との用語は、肝臓組織から本来誘導された細胞を意味する。肝細胞は、肝臓組織または確立した細胞系から新たに単離され得る。

【００５３】

「変調する」との用語は、増加または減少を含めた何らかの変化を誘発することを意味する。（例えば、脂肪酸酸化の変調剤は、脂肪酸酸化の速度を増加または減少する）。

【００５４】

「筋細胞」との用語は、筋組織の主な細胞から誘導された細胞を意味する。筋細胞は、筋

組織または確立した細胞系から新たに単離され得る。

【００５５】

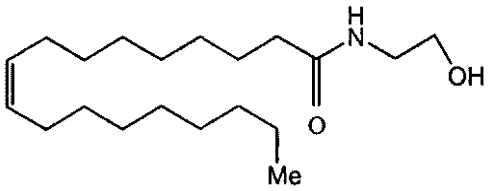
「肥満」とは、肥満度指数により測定した理想的な体重より２０％以上重い体重を意味する。

【００５６】

オレオイルエタノールアミド（ＯＥＡ）は、以下の構造の天然脂質を意味する：

【００５７】

【化８】



本明細書中の式では、「Ｍｅ」は、メチル基を表わす。

【００５８】

「減量」との用語は、全体重の一部を失うことを意味する。

【００５９】

「薬学的に受容可能なキャリア」との用語は、標準的な薬学的キャリア、緩衝液および賦形剤のいずれかを包含し、これには、リン酸緩衝生理食塩水、水および乳濁液（例えば、水中油型または油中水型の乳濁液）、および様々な種類の湿潤剤および／またはアジュバントを包含する。適切な薬学的キャリアおよびそれらの処方は、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，１９版、１９９５）で記述されている。好ましい薬学的キャリアは、その活性剤の意図した投与様式に依存している。典型的な投与様式は、以下で記述する。

【００６０】

「有効量」との用語は、所望の結果を生じるのに十分な投薬量を意味する。所望の結果とは、この投薬量の受容者における主観的または客観的な改善を含み得る。主観的な結果とは、食欲すなわち食物に対する欲求が低下することであり得る。客観的な改善とは、体重、体脂肪または食物の低下、摂食量の低下または食物を求める行動の低下であり得る。

【００６１】

「予防的治療」とは、疾患の徴候を示さないか疾患の初期徴候だけを示す被験体に施される治療であり、ここで、治療は、体重または体脂肪の増加に関連した症状が進行する危険を少なくする目的で、施される。本発明の化合物は、望ましくないまたは不要な体重増加を防止する予防的治療として、投与され得る。

【００６２】

「治療上の処置」とは、症状の徴候を示す被験体に施される治療であり、ここで、治療は、これらの症状の徴候を減らすかなくす目的で、施される。

【００６３】

「体重を制御する」との用語は、時間の経過と共に体重が減るか体重の増加が少なくなることを包含する。

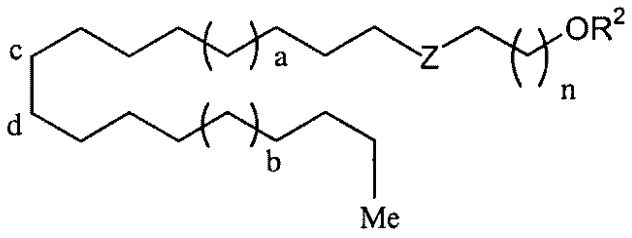
【００６４】

本発明の方法、化合物および組成物は、一般に、哺乳動物における体脂肪および体重を減らすか制御するのに有用である。例えば、本発明の方法、組成物および化合物は、哺乳動物において、食欲を低下させるか食細りを誘発するのを助ける。これらの方法、化合物および組成物はまた、体脂肪および体重の減少を促進することにより、太りすぎまたは肥満に関連した疾患を防止または緩和するのに有用である。

【００６５】

本発明の方法、組成物および化合物は、脂質代謝（特に、脂肪および脂肪酸の異化）の変

調剤を含有する。
【００６６】
（本発明の化合物）
本発明の特定の化合物は、非対称炭素原子（光学中心）または二重結合を有し得る；そのラセミ化合物、ジアステレオマー、幾何異性体および個々の異性体は、全て、本発明の範囲内に包含されると解釈される。
【００６７】
本発明のこのような化合物は、例えば、適切な溶媒（例えば、メタノールまたは酢酸エチルまたはそれらの混合物）により、鏡像異性体のジアステレオマー対に分離され得る。そのように得られた鏡像異性体の対は、例えば、分割剤として光学活性酸を使用することにより、通常の手段により、個々の立体異性体に分離され得る。
【００６８】
あるいは、本発明のこのような化合物の任意の鏡像異性体は、公知の立体配置の光学的に純粋な出発物質を使用して、立体特異的合成により、得ることができる。
【００６９】
本発明の化合物は、それらの原子の１個以上で、不自然な割合の原子同位体を有し得る。例えば、これらの化合物は、トリチウムまたは炭素１４のような同位体で放射標識され得る。本発明の化合物の全ての同位体バリエーションは、放射活性であろうとなかろうと、本発明の範囲内に入る。
【００７０】
本発明の化合物は、それらの薬学的に受容可能な酸付加塩（例えば、無機酸および有機酸を使用することに誘導した塩）の形状で、単離され得る。このような酸には、塩酸、硝酸、硫酸、リン酸、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、コハク酸、マロン酸などが挙げられ得る。それに加えて、酸機能を含む特定の化合物は、その対イオンがナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウムなどから選択できるそれらの無機塩だけでなく、有機塩基の形状であり得る。「薬学的に受容可能な塩」との用語は、薬学的に受容可能な非毒性の塩基または酸（無機塩基または無機酸および有機塩基または有機酸を含めて）から調製される塩を意味する。
【００７１】
本発明はまた、本発明の化合物のプロドラッグを包含し、これらは、投与すると、活性な薬理学的物質になる前に、代謝プロセスにより、化学的な変換を受ける。一般に、このようなプロドラッグは、本発明の化合物の誘導体であり、これらは、インビボで、本発明の機能化合物に容易に変換できる。適切なプロドラッグ誘導体を選択し調製する従来の手順は、例えば、「Ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ Ｐｒｏｄｒｕｇｓ」，Ｈ．Ｂｕｎｄｇａａｒｄ著、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，１９８５で記述されている。本発明はまた、本発明の化合物の活性代謝物を包含する。
【００７２】
（Ａ．脂肪酸アルカノールアミド化合物、ホモログおよびアナログ）
本発明の化合物は、体脂肪を減らす脂肪酸アルカノールアミド化合物を含み、これには、脂肪酸エタノールアミド化合物、およびそれらのホモログおよび脂肪酸アルカノールアミドの特定のアナログが挙げられる。このような化合物は、インビボで試験動物に投与すると、食欲、食物摂取量、および／または体重または体脂肪の低下を引き起こすいずれかの性能によって、識別され規定され得る。
【００７３】
従って、種々のこのような脂肪酸アルカノールアミド、ホモログおよびアナログが考慮される。本発明の化合物には、以下の一般式の化合物が挙げられる：
【００７４】
【化９】



(I).

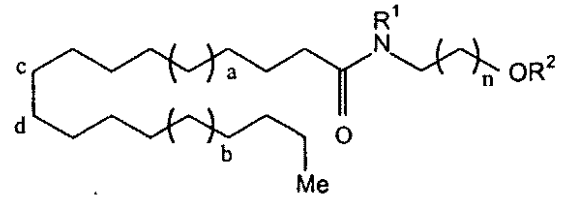
この式において、ｎは、０～５であり、ａおよびｂの合計は、０～４であり得る；Ｚは、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{0}）－；－（Ｒ^{0}）ＮＣ（Ｏ）－；－ＯＣ（Ｏ）－；－（Ｏ）ＣＯ－；Ｏ；ＮＲ^{0}；およびＳからなる群から選択されるメンバーである；ここで、Ｒ^{0}およびＲ^{2}は、独立して、非置換または置換アルキル、水素、置換または非置換Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、置換または非置換低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシル、ホモアルキルおよびアリールからなる群から選択される。その脂肪酸部分およびアルカノールアミン（例えば、エタノールアミン）部分のいずれかまたは両方の４個までの水素は、メチルまたは二重結合で置換され得る。それに加えて、炭素ｃとｄとの間の分子結合は、不飽和または飽和であり得る。ある実施形態では、上式の脂肪酸エタノールアミドは、天然に生じる化合物である。

【００７５】

本発明の化合物はまた、次式の化合物を包含する：

【００７６】

【化１０】



(Ia).

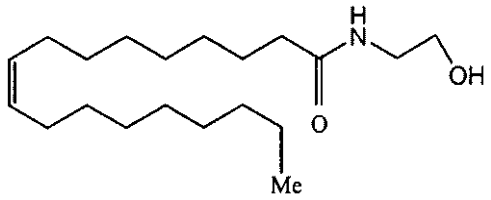
１実施形態では、式Ｉａの化合物は、０～５のｎ；そして０～４のａおよびｂの合計；および以下からなる群から独立して選択されるメンバーＲ^{1}およびＲ^{2}を有する：水素、置換または非置換Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、置換または非置換低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシル、ホモアルキル、および置換または非置換アリール。この実施形態では、上式の化合物の脂肪酸部分およびアルカノールアミン（例えば、エタノールアミン）部分の４個までの水素は、メチルまたは二重結合で置換され得る。それに加えて、炭素ｃとｄとの間の分子結合は、不飽和または飽和であり得る。アシル基を使う実施形態では、そのアシル基は、プロピオン酸、酢酸または酪酸であり得、Ｒ^{2}としてエステル連鎖またはＲ^{1}としてアミド連鎖を介して、結合され得る。

【００７７】

別の実施形態では、上記化合物には、特に、その脂肪酸部分が、オレイン酸、エライジン酸またはパルミチン酸を含有するものが挙げられる。このような化合物には、オレオイルエタノールアミド、エライジルエタノールアミドおよびパルミチルエタノールアミドが挙げられる。

【００７８】

【化１１】



オレイルエタノールアミド (Ia)

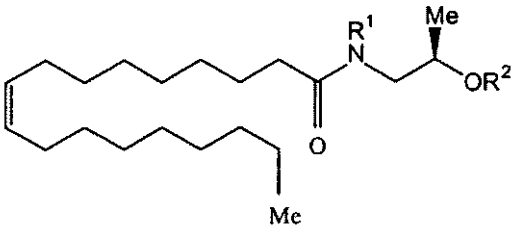
別の実施形態では、式Ｉａの化合物は、１～３のｎ；そして１～３のａおよびｂの合計；および以下からなる群から独立して選択されるメンバーＲ^{1}およびＲ^{2}を有する：水素、置換または非置換Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、および置換または非置換低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシル。この実施形態では、上式の化合物の脂肪酸部分およびアルカノールアミン（エタノールアミン）部分の４個までの水素はまた、メチルまたは二重結合で置換され得る。それに加えて、炭素ｃとｄとの間の分子結合は、不飽和または飽和であり得る。さらに他の実施形態では、炭素ｃとｄとの間の分子結合は、不飽和であり、他の水素原子は、置換されていない。そのさらに他の実施形態では、メンバーＲ^{1}およびＲ^{2}は、独立して、水素、置換または非置換Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、および置換または非置換低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシルからなる群から選択される。

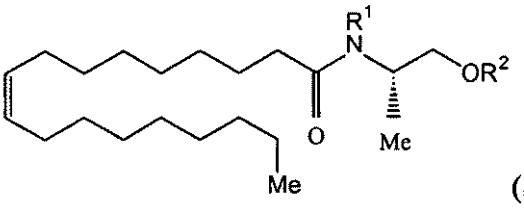
【００７９】

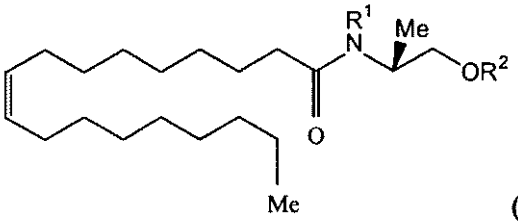
代表的な化合物は、モノメチル置換化合物を提供し、これには、式Ｉａのエタノールアミドが挙げられる。このような化合物には、以下が挙げられる：

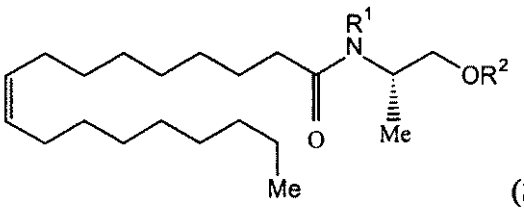
【００８０】

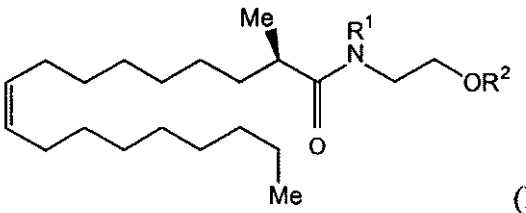
【化１２】

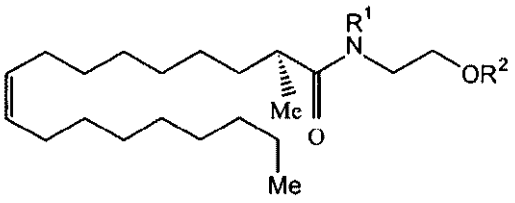

(R)1'-メチル


(S)1'-メチル


(R)2'-メチル


(S)2'-メチル


(R)1-メチル


(S)1-メチル

上式のメチル置換化合物には、特に、R^1およびR^2が共にＨである化合物が挙げられる：（Ｒ）１’－メチルオレオイルエタノールアミド、Ｓ（１’）－メチルオレオイルエタノールアミド、（Ｓ）２’－メチルオレオイルエタノールアミド、（Ｓ）２’－メチルオレオイルエタノールアミド、（Ｒ）１－メチルオレオイルエタノールアミドおよび（Ｓ）１－メチルオレオイルエタノールアミド。

【００８１】

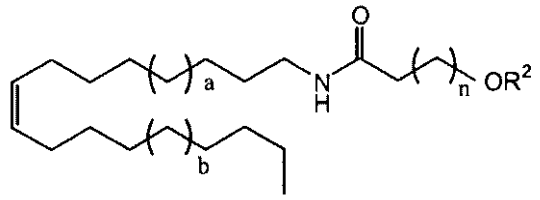
（逆ＯＥＡ様化合物）

本発明の化合物には、また、ＯＥＡの種々のアナログが挙げられる。これらの化合物には

、以下の一般式の逆ＯＥＡ化合物が挙げられる：

【００８２】

【化１３】



(II).

ある実施形態では、本発明は、式ＩＩの化合物を提供する。式ＩＩの代表的な化合物は、１～５のｎ、および０～４のａおよびｂの合計を有する。この実施形態では、メンバーR^2は、水素、置換または非置換C_1～C_6アルキル、置換または非置換低級（C_1～C_6）アシル、ホモアルキルおよびアリールからなる群から選択される。それに加えて、その脂肪酸部分およびアルカノールアミン（例えば、エタノールアミン）部分のいずれかまたは両方の４個までの水素は、また、メチルまたは二重結合で置換され得る。

【００８３】

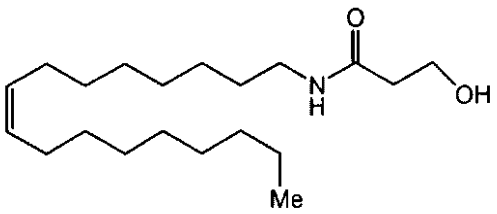
式ＩＩの代表的な化合物には、そのアルカノールアミン部分がエタノールアミンである化合物、R^2がＨである化合物、ａおよびｂがそれぞれ１である化合物、およびｎが１である化合物が挙げられる。

【００８４】

式ＩＩの化合物の１実施形態は、以下である：

【００８５】

【化１４】



逆OEA

別の実施形態では、式ＩＩの化合物は、１～５のｎ、および１～３のａおよびｂの合計を有する。この実施形態では、メンバーR^2は、水素、置換または非置換C_1～C_6アルキル、および置換または非置換低級（C_1～C_6）アシルからなる群から選択される。それに加えて、その脂肪酸部分およびアルカノールアミン（例えば、エタノールアミン）部分のいずれかまたは両方の４個までの水素は、また、メチルまたは二重結合で置換され得る。

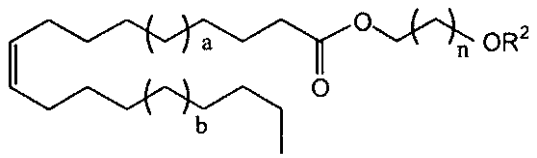
【００８６】

（オレイルアルカノールエステル化合物）

本発明の化合物には、また、以下の一般式のオレイルアルカノールエステルが挙げられる：

【００８７】

【化１５】



(III).

ある実施形態では、式ＩＩＩの化合物は、１～５のｎ、および０～４のａおよびｂの合計を有する。メンバーＲ^{2}は、水素、置換または非置換のＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシル、ホモアルキルおよびアリールからなる群から選択される。上式の化合物の脂肪酸部分およびアルカノール（例えば、エタノール）部分のいずれかまたは両方の４個までの水素は、また、メチルまたは二重結合で置換され得る。

【００８８】

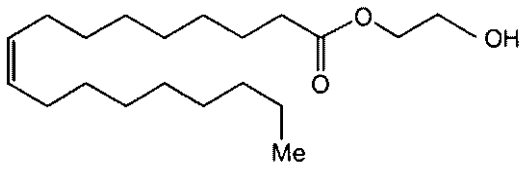
ある実施形態では、式ＩＩＩの化合物は、１～３のｎ、および１～３のａおよびｂの合計を有する。メンバーＲ^{2}は、水素、置換または非置換Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、および置換または非置換低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシルからなる群から選択される。上式の化合物の脂肪酸部分およびアルカノール（例えば、エタノール）部分のいずれかまたは両方の４個までの水素は、また、メチルまたは二重結合で置換され得る。

【００８９】

式ＩＩＩの化合物には、Ｒ^{2}がＨである化合物、ａおよびｂがそれぞれ１である化合物、およびｎが１である化合物が挙げられる。式ＩＩＩの化合物の例には、以下のオレオイルエタノールエステルが挙げられる：

【００９０】

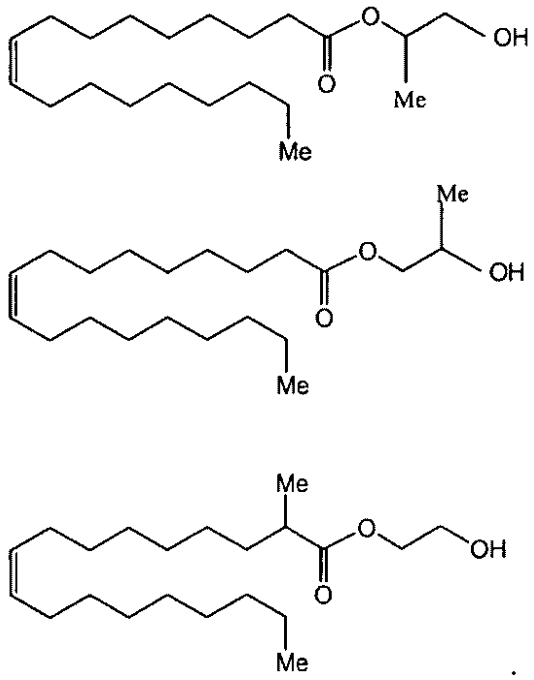
【化１６】



式ＩＩＩの化合物には、また、モノメチル置換したオレオイルエタノールエステル、例えば、それぞれ、（ＲまたはＳ）－２’－メチルオレオイルエタノールエステル；（ＲまたはＳ）－１’－メチルオレオイルエタノールエステル；および（ＲまたはＳ））－１’－メチローレオイルエタノールエステル：

【００９１】

【化１７】



が挙げられる。

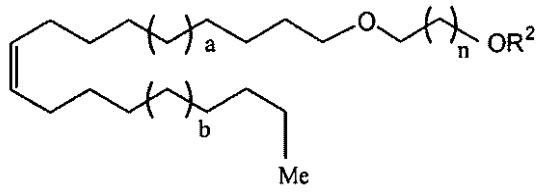
【００９２】

（オレオイルアルカノールエーテル）

本発明の化合物には、また、以下の一般式のオレオイルアルカノールエーテルが挙げられる：

【００９３】

【化１８】



(IV).

ある実施形態では、式ＩＶの化合物は、１～５のｎ、および０～４のａおよびｂの合計を有する。メンバーＲ^{2}は、水素、置換または非置換Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、置換または非置換低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシル、アルキル、および置換および非置換アリールからなる群から選択される。上式の化合物の脂肪酸部分およびアルカノール（例えば、エタノール）部分のいずれかまたは両方の４個までの水素は、また、メチルまたは二重結合で置換され得る。

【００９４】

他の実施形態では、式ＩＶの化合物は、１～３のｎ、および１～３のａおよびｂの合計を有する。メンバーＲ^{2}は、水素、置換または非置換Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、および置換または非置換低級（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$）アシルからなる群から選択される。上式の化合物の脂肪酸部分およびアルカノール（例えば、エタノール）部分のいずれかまたは両方の４個までの水素は、また、メチルまたは二重結合で置換され得る。

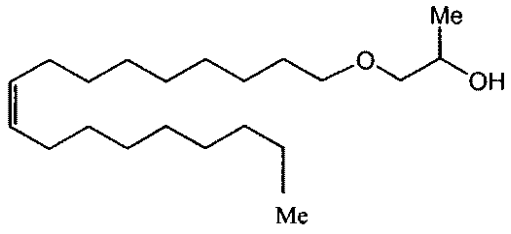
【００９５】

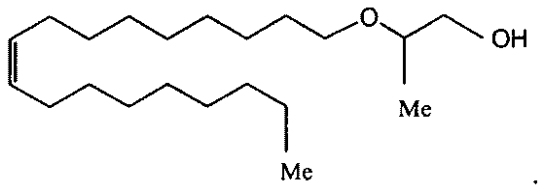
式ＩＶの化合物には、Ｒ^{2}がＨである化合物、ａおよびｂがそれぞれ１である化合物、およびｎが１である化合物が挙げられる。式ＩＶの化合物の例には、以下の（ＲまたはＳ）

１’－オレオイルエタノールエーテルおよび（ＲまたはＳ）２’－オレオイルエタノールエーテルが挙げられる：

【００９６】

【化１９】



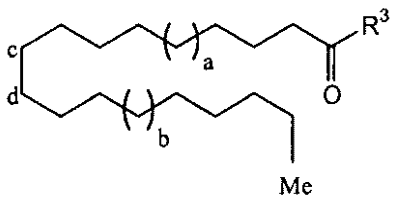


（極性ヘッド変種を有する脂肪酸アルカノールアミドアナログ）

本発明の化合物には、また、ＯＥＡの種々の極性ヘッドアナログが挙げられる。これらの化合物には、以下の一般式の脂肪酸部分を有する化合物が挙げられる：

【００９７】

【化２０】

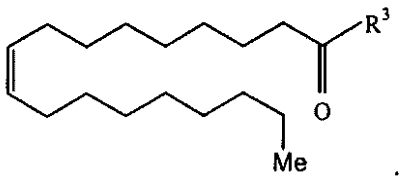


(V).

ある実施形態では、式Ｖの化合物は、０～４のａおよびｂの合計を有する。他の実施形態では、ａおよびｂの合計は、１～３である。これらの実施形態では、上式の化合物の４個までの水素は、また、メチルまたは二重結合で置換され得る。それに加えて、炭素ｃとｄとの間の分子結合は、不飽和または飽和であり得る。特に好ましい実施形態は、オレイン酸脂肪酸部分のものである：

【００９８】

【化２１】

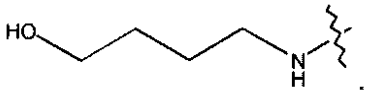


上記構造のＲ^{3}基は、以下のいずれかから選択され得る：

ＨＯ－（ＣＨ$_{2}$）$_{z}$－ＮＨ－であって、ここで、ｚは、１～５であり、そのアルキル部分は、非分枝メチレン鎖である。例えば、

【００９９】

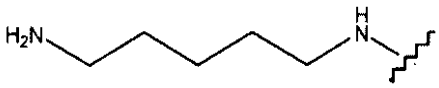
【化２２】



$H_2N-(CH_2)_z-NH-$であって、ここで、ｚは、１～５であり、そのアルキル部分は、非分枝メチレン鎖である。例えば、

【０１００】

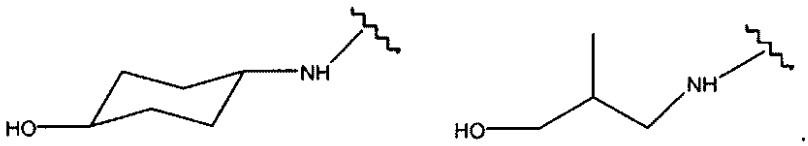
【化２３】



$HO-(CH_2)_x-NH-$であって、ここで、ｘは、１～８であり、そのアルキル部分は、分枝または環状であり得る。例えば、

【０１０１】

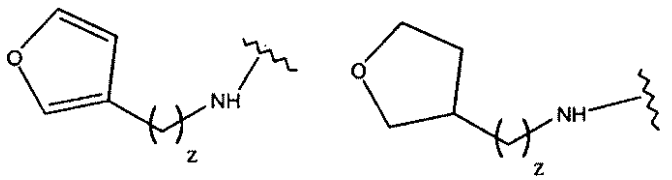
【化２４】

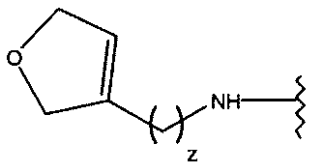


R^3についてのさらに他の極性ヘッド基には、例えば、フラン、ジヒドロフランおよびテトラヒドロフラン官能基を有する化合物が挙げられる：

【０１０２】

【化２５】





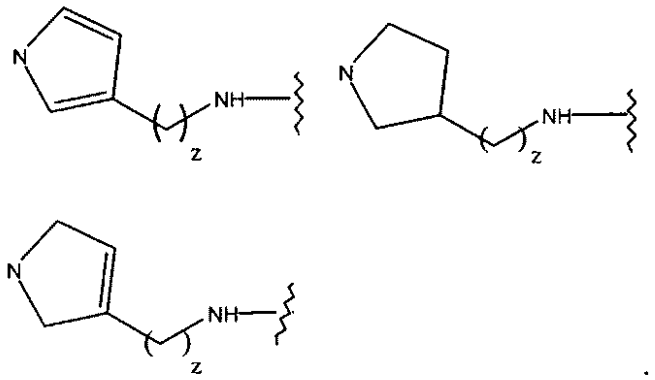
上記構造では、ｚは、１～５であり得る。

【０１０３】

本発明の化合物には、例えば、ピロール環、ピロリジン環およびピロリン環に基づいたR^3極性ヘッド基を有するものが挙げられる：

【０１０４】

【化２６】



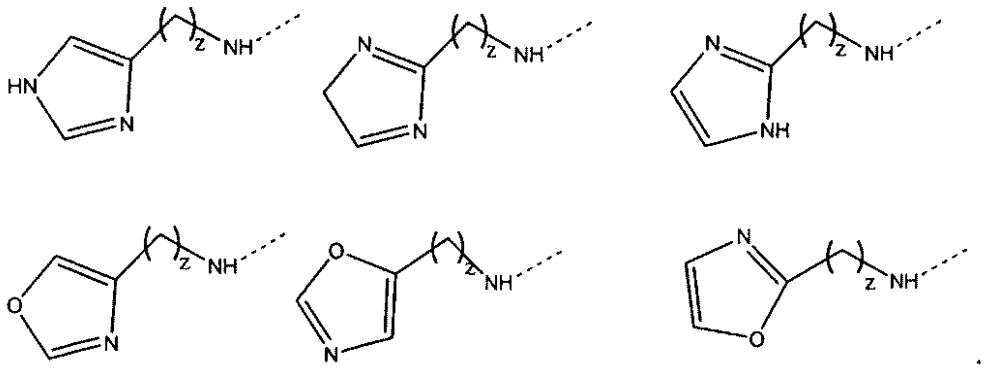
上記構造の化合物では、ｚは、１～５であり得る。

【０１０５】

別の代表的な極性ヘッド基には、種々のイミダゾールおよびオキサゾール、例えば、以下が挙げられる：

【０１０６】

【化２７】



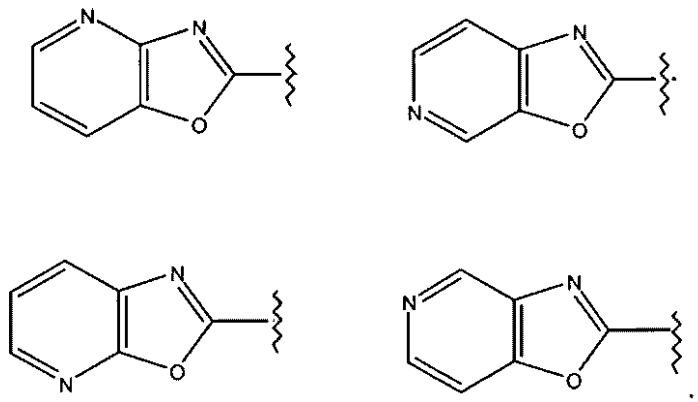
上記構造の化合物では、ｚは、１～５であり得る。

【０１０７】

オキサゾールピリジン極性ヘッド基はまた、代表的なものである：

【０１０８】

【化２８】



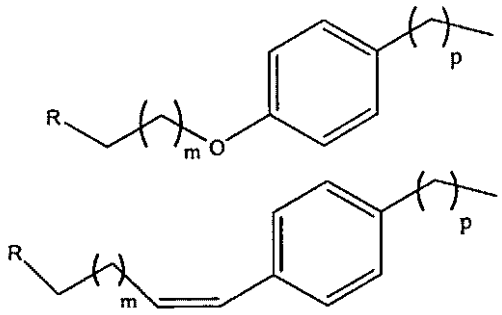
（非極性テール変種を有する脂肪酸アルカノールアミドアナログ）

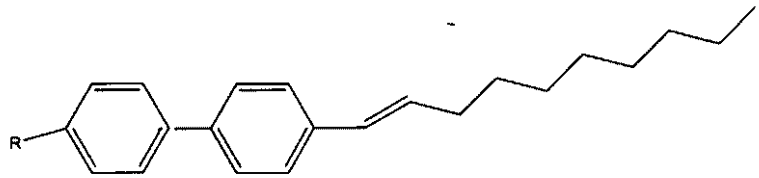
本発明の化合物には、種々の可撓性非極性テールを有する種々のアルカノールアミド化合物およびエタノールアミド化合物が挙げられる。これらの化合物には、次式の化合物が挙

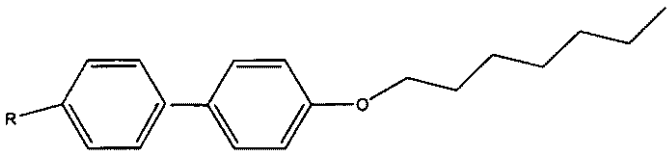
げられ、ここで、Ｒは、エタノールアミン部分、アルカノールアミン部分、またはそれらの安定アナログを表わす。エタノールアミンの場合、そのエタノールアミン部分は、好ましくは、エタノール酸素よりもむしろエチノールアミン窒素を介して、結合される。

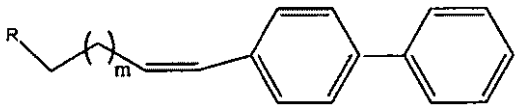
【０１０９】

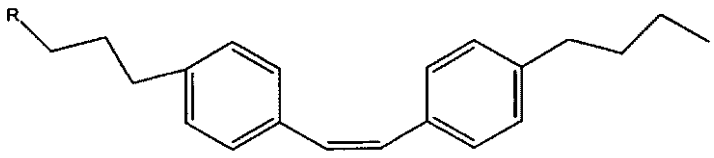
【化２９】











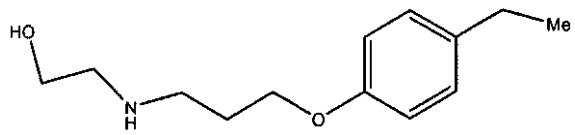
上記の構造において、ｍは、１～９であり、ｐは、独立して、１～５である。

【０１１０】

代表的な化合物には、以下の化合物がある：

【０１１１】

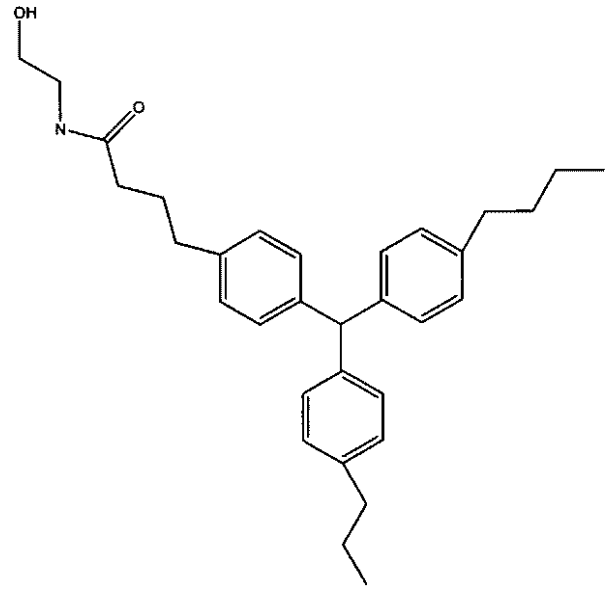
【化３０】



別の代表的な化合物には、以下の構造式の非極性テールを備えたエタノールアミンアナログがある：

【０１１２】

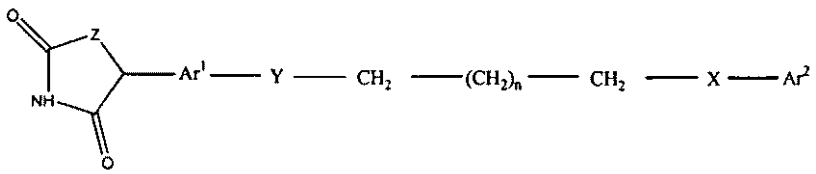
【化３１】



代表的な化合物には、脂肪酸アルカノールアミドのアナログが挙げられる。このようなアナログには、米国特許第６，２００，９９８号（その内容は、本明細書中で参考として援用されている）で教示された化合物が挙げられる。この参考文献は、以下の一般式の化合物を教示している：

【０１１３】

【化３２】



(VI).

上式にて、米国特許第６，２００，９９８号で定義されるように、Ar^1は、（１）アリーレンまたは（２）ヘテロアリーレンであり、ここで、アリーレンおよびヘテロアリーレンは、必要に応じて、R^aから選択される１個～４個の基で置換される；Ar^2は、（１）オルト置換アリールまたは（２）オルト置換ヘテロアリールであり、ここで、該オルト置換基は、Ｒから選択される；そしてアリールおよびヘテロアリールは、必要に応じて、さらに、R^aから独立して選択された１個～４個の基で置換される；ＸおよびＹは、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｎ－R^bまたはCH_2である；Ｚは、ＯまたはＳである；ｎは、０～３である；Ｒは、（１）ハロおよび$C_{3\sim6}$シクロアルキルから選択される１個～４個の基で必要に応じて置換された$C_{3\sim10}$アルキル、（２）$C_{3\sim10}$アルケニル、または（３

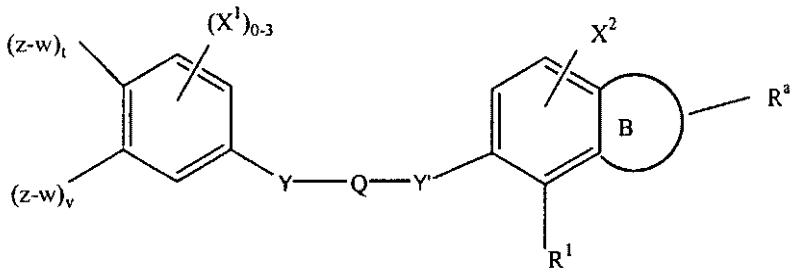
）$C_{3\sim8}$シクロアルキルである；R^aは、（１）$C_{1\sim15}$アルカノイル、（２）$C_{1\sim15}$アルキル、（３）$C_{2\sim15}$アルケニル、（４）$C_{2\sim15}$アルキニル、（５）ハロ、（６）OR^b、（７）アリールまたは（８）ヘテロアリールであって、ここで、該アルキル、アルケニル、アルキニルおよびアルカノイルは、必要に応じて、R^cから選択された１個～５個の基で置換されており、そして該アリールおよびヘテロアリールは、必要に応じて、R^dから選択された１個～５個の基で置換されている；R^bは、（１）水素、（２）$C_{1\sim10}$アルキル、（３）$C_{2\sim10}$アルケニル、（４）$C_{2\sim10}$アルキニル、（５）アリール、（６）ヘテロアリール、（７）アリール$C_{1\sim15}$アルキル、（８）ヘテロアリール$C_{1\sim15}$アルキル、（９）$C_{1\sim15}$アルカノイル、（１０）$C_{3\sim8}$シクロアルキルであって、ここで、該アルキル、アルケニル、アルキニルは、必要に応じて、R^cから独立して選択された１個～４個の置換基で置換されており、そして該シクロアルキル、アリールおよびヘテロアリールは、必要に応じて、R^dから独立して選択された１個～４個の基で置換されている；またはR^cは、（１）ハロ、（２）アリール、（３）ヘテロアリール、（４）CN、（５）NO_2、（６）OR^f；（７）$S(O)_mR^f$（ｍ＝０、１または２であるが、但し、ｍが１または２のとき、R^fは、Ｈではない）；（８）NR^fR^f、（９）NR^fCOR^f、（１０）$NR^fCO_2R^f$、（１１）$NR^fCON(R^f)_2$、（１２）$NR^fSO_2R^f$（但し、R^fは、Ｈではない）、（１３）COR^f、（１４）CO_2R^f、（１５）$CON(R^f)_2$、（１６）$SO_2N(R^f)$、（１７）$OCON(R^f)_2$、または（１８）$C_{3\sim8}$シクロアルキルであり、ここで、該シクロアルキル、アリールおよびヘテロアリールは、必要に応じて、１個～３個のハロ基または$C_{1\sim6}$アルキル基で置換されている；R^dは、（１）R^cから選択された基、（２）$C_{1\sim10}$アルキル、（３）$C_{2\sim10}$アルケニル、（４）$C_{2\sim10}$アルキニル、（５）アリール$C_{1\sim10}$アルキル、または（６）ヘテロアリール$C_{1\sim10}$アルキルであり、ここで、該アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリールは、必要に応じて、R^eから独立して選択された基で置換されている；R^eは、（１）ハロゲン、（２）アミノ、（３）カルボキシ、（４）$C_{1\sim4}$アルキル、（５）$C_{1\sim4}$アルコキシ、（６）ヒドロキシ、（７）アリール、（８）アリール$C_{1\sim4}$アルキル、または（９）アルコキシである；R^fは、（１）水素、（２）$C_{1\sim10}$アルキル、（３）$C_{2\sim10}$アルケニル、（４）$C_{2\sim10}$アルキニル、（５）アリール、（６）ヘテロアリール、（７）アリール$C_{1\sim15}$アルキル、（８）ヘテロアリール$C_{1\sim15}$アルキル、（９）$C_{1\sim15}$アルカノイル、（１０）$C_{3\sim8}$シクロアルキルであって、ここで、該アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アルカノイルおよびシクロアルキルは、必要に応じて、R^eから選択された１個～４個の基で置換されている。

【０１１４】

米国特許第５，８５９，０５１号で教示されたアナログもまた、好ましい。これらのアナログは、以下の一般式を有する：

【０１１５】

【化３３】



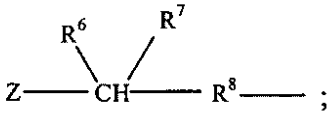
(VII).

式ＶＩＩによる実施形態では、米国特許第５，８５９，０５１号で定義されているように、R^1は、Ｈ、$C_{1\sim6}$アルキル、$C_{5\sim10}$アリールおよび$C_{5\sim10}$ヘテロアリール

からなる群から選択され、該アルキル、アリールおよびヘテロアリールは、必要に応じて、１個～３個のR[a]基で置換されている；R[1]は、以下からなる群から選択される：H、$C_{1～15}$アルキル、$C_{2～15}$アルケニル、$C_{2～15}$アルキニルおよび$C_{3～10}$シクロアルキルであって、該アルキル、アルケニル、アルキニルおよびシクロアルキルは、必要に応じて、１個～３個のR[a]基で置換されている；R[3]は、以下からなる群から選択される：H、NHR[1]、NHアシル、$C_{1～15}$アルキル、$C_{3～10}$シクロアルキル、$C_{2～15}$アルケニル、$C_{1～15}$アルコキシ、CO_2アルキル、OH、$C_{2～15}$アルキニル、$C_{5～10}$アリール、$C_{5～10}$ヘテロアリールであって、該アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリールおよびヘテロアリールは、必要に応じて、１個～３個のR[a]基で置換されている；（Z－－W－）は、Z－CR[6]R[7]、Z－CH、＝CH－、または以下である：

【０１１６】

【化３４】



；

R[8]は、CR[6]R[7]、O、NR[6]およびS（O）$_p$からなる群から選択される；R[6]およびR[7]は、独立して、H、$C_{1～6}$アルキルからなる群から選択される；Bは、以下からなる群から選択される：１）０個～２個の二重結合ならびにO、SおよびNからなる群から選択される１個のヘテロ原子を含有する５員または６員複素環であって、ヘテロ原子は、この５員または６員複素環上の任意の位置で置換されており、この複素環は、必要に応じて、１個～３個のR[a]基で置換されているか非置換である；２）０個～２個の二重結合を含有する５員～６員炭素環であって、この炭素環は、必要に応じて、この５員または６員炭素環上の任意の位置で、１個～３個のR[a]で置換されているか非置換である；ならびに３）０個～２個の二重結合ならびにO、NおよびSからなる群から選択される３個のヘテロ原子を含有する５員または６員複素環であって、これらのヘテロ原子は、この５員または６員複素環上の任意の位置で置換されており、この複素環は、必要に応じて、１個～３個のR[a]基で置換されているか非置換である；X[1]およびX[2]は、独立して、以下からなる群から選択される：H、OH、$C_{1～15}$アルキル、$C_{2～15}$アルケニル、$C_{2～15}$アルキニル、ハロ、OR[3]、ORCF$_3$、$C_{5～10}$アリール、$C_{5～10}$アラルキル、$C_{5～10}$ヘテロアリールおよび$C_{1～10}$アシルであり、該アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールおよびヘテロアリールは、必要に応じて、１個～３個のR[a]基で置換されている；R[a]は、以下からなる群から選択されるメンバーを表わす：ハロ、アシル、アリール、ヘテロアリール、CF$_3$、OCF$_3$、－－O－－、CN、NO_2、R[3]、OR[3]；SR[3]、＝N（OR）、S（O）R[3]、SO_2R^3、NR[3]R[3]、NR[3]COR[3]、NR[3]CO_2R^3、NR[3]CON（R[3]）$_2$、NR[3]SO_2R^3、COR[3]、CO_2R^3、CON（R[3]）$_2$、SO_2N（R[3]）$_2$、OCON（R[3]）$_2$であり、該アリールおよびヘテロアリールは、必要に応じて、１個～３個のハロ基または$C_{1～6}$アルキル基で置換されている；Yは、以下からなる群から選択される：S（O）$_p$、－CH_2－、－C（O）－、－C（O）NH－、－NR－、－O－、－SO_2NH－、－NHSO_2；Y[1]は、OおよびCからなる群から選択される；Zは、CO_2R^3、R[3]CO_2R^3、CONHSO$_2$Me、CONHSO$_2$、CONH$_2$および５－（１H－テトラゾール）；tおよびvは、独立して、t＋v＝１となるように、０または１である；Qは、２個～４個の炭素原子を含有する飽和または不飽和直鎖炭化水素鎖であり、そしてpは、０～２であるが、但し、Zは、CO_2R^3であり、そしてBは、Oからなる５員複素環であり、R[3]は、メチルを表わさない。

【０１１７】

本発明の方法および組成物を実行するのに適切なさらなるアナログには、米国特許第５，

８４７，００８号、米国特許第６，０９０，８３６号および米国特許第６，０９０，８３９号（それらの内容は、本開示に矛盾しない範囲まで、本明細書中で参考として援用されている）で教示された化合物が挙げられる。

【０１１８】

さらに、種々の適切なアナログは、米国特許第６，２７４，６０８号で教示されている。アリールおよびヘテロアリール酢酸およびオキシ酢酸アナログは、例えば、米国特許第６，１６０，０００号で教示されている；置換５－アリール－２，４－チアゾリジンジオンアナログは、米国特許第６，２００，９９８号で教示されている；他の可能なアナログ（例えば、ポリ不飽和脂肪酸およびエイコサノイド）は、公知である（例えば、Ｆｏｒｍａｎ，ＢＭ，Ｃｈｅｎ，Ｊ，ａｎｄ　Ｅｖａｎｓ　ＲＭ，ＰＮＡＳ　９４：４３１２～４３１７）。これらの出版物（それらの内容は、それぞれ、本開示に矛盾しない範囲まで、本明細書中で参考として援用されている）の化合物は、本開示に従って、例えば、体脂肪および体重を減らす際、脂肪異化を変調する際、および食欲を減らす際に有用な化合物を提供するために、以下で提供した方法により、スクリーニングできる。

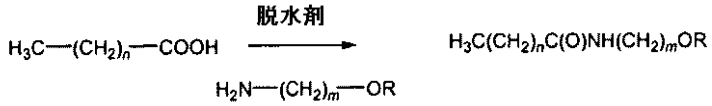
【０１１９】

（脂肪酸アルカノールアミドの合成）

本発明を実行する際に有用な化合物は、当該技術分野で認められた方法を使用して、容易に合成され精製される。代表的な合成図式（図式１）では、カルボン酸およびアミノアルコール（またはそのＯ－保護誘導体）は、適切な溶媒中にて、脱水剤（例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド）の存在下にて、反応される。この脂肪酸アルカノールアミドは、抽出、結晶化、沈殿、クロマトグラフィーなどのような方法により、単離される。もし、その最終生成物が、Ｏ－保護付加物であるなら、それは、典型的には、当該技術分野で認められた方法により脱保護されて、遊離水酸基を有する脂肪酸付加物が得られる。

【０１２０】

【化３５】



図式１

当業者は、上で述べた図式の多くの変種が利用できることを認識する。例えば、この酸の活性化誘導体（例えば、ハロゲン化アシル、活性エステル）が使用できる。同様に、このアミノアルコールは、グリコール（好ましくは、モノＯ－保護された）で代用でき、その結果、その分子の２つの成分間で、エステル連鎖が得られる。

【０１２１】

逆エステルおよび逆アミドもまた、当該技術分野で認識された方法により、容易に合成される。例えば、ヒドロキシカルボン酸は、脱水剤の存在下にて、長鎖アルキル（すなわち、C_4～C_{22}）のアミンまたはヒドロキシ誘導体と反応される。特定の反応経路では、このヒドロキシカルボン酸のヒドロキシ部分を保護するのが望ましい。

【０１２２】

エーテルおよびメルカプタンは、当該技術分野で周知の方法（例えば、ウィリアムソン合成）により、調製される。例えば、長鎖アルキルアルコールまたはチオールは、塩基（例えば、ＮａＨ）および反応性アルコール誘導体（例えば、ハロ、トシル、メシルアルコール）で脱プロトン化されるか、またはその保護した誘導体は、得られるアニオンと反応されて、エステルまたはメルカプタンを形成する。

【０１２３】

上で列挙した方法およびそれらのバリエーションは、例えば、以下で見られ得る：ＲＥＣＥＮＴ　ＤＥＶＥＬＯＰＭＥＮＴＳ　ＩＮ　ＴＨＥ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ＯＦ　ＦＡＴＴＹ　ＡＣＩＤ　ＤＥＲＩＶＡＴＩＶＥＳ，Ｋｎｏｔｈｅ　Ｇ，著、Ａｍｅｒ．Ｏｉｌ

Ｃｈｅｍｉｓｔｓ Ｓｏｃｉｅｔｙ １９９９；ＣＯＭＰＲＥＨＥＮＳＩＶＥ ＮＡＴＵＲＡＬ ＰＲＯＤＵＣＴＳ ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ ＡＮＤ ＯＴＨＥＲ ＳＥＣＯＮＤＡＲＹ ＭＥＴＡＢＯＬＩＴＥＳ ＩＮＣＬＵＤＩＮＧ ＦＡＴＴＹ ＡＣＩＤＳ ＡＮＤ ＴＨＥＩＲ ＤＥＲＩＶＡＴＩＶＥＳ，Ｎａｋａｎｉｓｈｉ Ｋ，著、Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ，１９９９；ＯＲＧＡＮＩＣ ＳＹＮＴＨＥＳＩＳ ＣＯＬＬＥＣＴＥＤ ＶＯＬＵＭＥＳ Ｉ～Ｖ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ；ＣＯＭＰＥＮＤＩＵＭ ＯＦ ＯＲＧＡＮＩＣ ＳＹＮＴＨＥＴＩＣ ＭＥＴＨＯＤＳ，Ｖｏｌｕｍｅｓ １～６，Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ １９８４；ＯＲＧＡＮＩＣ ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬ ＧＲＯＵＰ ＰＲＥＰＡＲＡＴＩＯＮ，Ｖｏｌｕｍｅｓ Ｉ～ＩＩＩ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｌｔｄ．１９８３；Ｇｒｅｅｎｅ Ｔ，ＰＲＯＴＥＣＴＩＮＧ ＧＲＯＵＰＳ ＩＮ ＯＲＧＡＮＩＣ ＳＹＮＴＨＥＳＩＳ，２版、Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ １９９１。

【０１２４】

（使用方法、薬学的組成物、およびそれらの投与）

（使用方法）

本発明の化合物および組成物（例えば、脂肪酸アルカノールアミド、脂肪酸エタノールアミド化合物、アナログおよびホモログ）は、哺乳動物（イヌ、ネコ、特に、ヒトを含めて）において、体脂肪および体重を減らすのに使用される。この減量は、審美目的または治療目的であり得る。これらの化合物はまた、食欲を低下させるか食細りを誘発するのに使用され得る。

【０１２５】

本発明の化合物、組成物および方法は、正常な体重範囲内の個体において、体重の増加または体脂肪の上昇を阻止するのに使用される。これらの化合物は、糖尿病または高脂血症または癌に関連した疾患に対して何らかの薬物処置が必要ではない健康な個体にて、使用され得る。ある実施形態では、治療する個体には、糖または脂質のレベルまたは代謝の乱れに関連した疾患に罹っていない個体、または心血管疾患および脳血管疾患の危険因子がない個体がある。これらの個体は、糖尿病に罹っておらず正常な範囲の血糖値を有し得る。これらの個体はまた、正常な範囲の血液脂質（例えば、コレステロール）またはトリグリセリドのレベルを有し得る。これらの個体は、アテローム性動脈硬化症に罹ってい得ない。これらの個体は、癌または他の腫瘍、インシュリン耐性が関与した障害、Ｓｙｎｄｒｏｍｅ Ｘおよび膵炎のような他の病気に罹ってい得ない。

【０１２６】

他の実施形態では、これらの被験体は、体脂肪および／または体重の低下が必要な、太りすぎまたは肥満の人である。これらの実施形態では、本発明の方法、化合物および組成物は、一旦、その性別および年齢および身長の人の正常な範囲の体重が達成されたなら、減量を促進し体重の増加を阻止するために、投与できる。これらの化合物は、糖尿病、高脂血症または癌に関連した障害の任意の薬物療法が必要ではない健康な個体で、使用され得る。これらの個体はまた、心血管疾患および脳血管疾患の危険因子があり得ない。ある実施形態では、治療する個体は、糖（例えば、グルコース）または脂質の代謝に関連した疾患に罹っていない。これらの個体は、糖尿病に罹っておらず、正常な範囲の血糖レベルを有し得る。これらの個体はまた、正常な範囲の血液脂質（例えば、コレステロール、ＨＤＬ、ＬＤＬ、全コレステロール）またはトリグリセリドのレベルを有し得る。これらの個体は、アテローム性動脈硬化症の治療が必要であり得ない。

【０１２７】

本発明の化合物、方法および組成物はまた、哺乳動物（ネコ、イヌおよびヒトを含めて）において、食欲を抑制するために投与され得る。ある実施形態では、これらの化合物は、何らかの疾患に対する薬物処置が必要ではない健康な個体で使用され得る。ある実施形態では、これらの個体は、疾患（癌、糖尿病または高脂血症を含めて）の予防療法または改善療法が必要ではない。ある実施形態では、これらの個体は、異常な糖または脂質のレベルに関連した疾患に罹っていない。他の実施形態では、治療する個体は、心血管疾患また

は脳血管疾患の危険因子を有し得ない。これらの個体は、糖尿病に罹っておらず正常な範囲の血糖値を有し得る。これらの個体はまた、正常な範囲の血液脂質（例えば、コレステロール）またはトリグリセリドのレベルを有し得る。これらの個体は、アテローム性動脈硬化症に罹ってい得ない。

【０１２８】

本発明の化合物、方法および組成物はまた、哺乳動物（ネコ、イヌおよびヒトを含めて）において、代謝を調節する（例えば、脂肪異化を高める）ために、投与され得る。ある実施形態では、これらの化合物は、健康な個体の食欲を低下させるのに使用され得る。ある実施形態では、治療する個体は、糖または脂質の代謝に関連した疾患（例えば、糖尿病、高コレステロール血症、低ＨＤＬレベルまたは高ＬＤＬレベル）に関連した疾患に罹っていない。これらの個体は、糖尿病に罹っておらず正常な範囲の血糖値を有し得る。これらの個体はまた、正常な範囲の血液脂質（例えば、コレステロール）またはトリグリセリドのレベルを有し得る。これらの個体は、アテローム性動脈硬化症に罹ってい得ない。

【０１２９】

本発明の化合物および組成物を使った治療は、達成する減量の程度または量により予め決定した期間にわたって、またはその個体が正常範囲内のＢＭＩに達したときであり得る。本発明の化合物および組成物を使った治療は、一旦、所定の程度または量の減量が達成されると、またはその個体が正常範囲内のＢＭＩに達したとき、減らされ得る。

【０１３０】

本発明の化合物および組成物は、体脂肪を減らすか食欲を低下させる目的で、単独で、投与され得る。

【０１３１】

（薬学的組成物）

本発明の他の局面は、本発明の化合物および薬学的に受容可能なキャリアを含有する薬学的組成物を提供する。

【０１３２】

本発明の薬学的組成物は、活性成分としての本発明の化合物またはその薬学的に受容可能な塩を含有し、薬学的に受容可能なキャリアおよび必要に応じて、他の治療成分を含有し得る。

【０１３３】

これらの組成物には、経口投与、直腸投与、局所投与、非経口（皮下、筋肉内および静脈内を含めて）、眼内（眼科）投与、肺内（鼻内吸入または口腔吸入）投与または鼻内投与に適切な組成物が挙げられるが、任意の所定の場合に最も適切な経路は、一部には、治療する病気の性質および重症度に依存しており、また、その活性成分の性質に依存している。代表的な投与経路は、経口経路である。これらの組成物は、好都合には、単位投薬形態で提示され得、薬学分野で周知の方法のいずれかにより、調製され得る。

【０１３４】

実用に際して、本発明の化合物は、通常の医薬配合技術に従って、薬学的キャリアと十分に混合して、この活性成分として混ぜ合わせることができる。このキャリアは、投与（例えば、経口または非経口（静脈内を含めて））に望ましい処方物の形態に依存して、種々の形態をとり得る。経口剤形用の組成物を調製する際に、通常の薬学的媒体（例えば、水、グリコール、オイル、アルコール、香料、防腐剤、着色剤など、経口液状処方物の場合、例えば、懸濁液、エリキシル剤および溶液）；またはキャリア（例えば、デンプン、糖、微結晶セルロース、希釈剤、顆粒剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤など、経口固形処方物の場合、例えば、粉末、硬質および軟質カプセルおよび錠剤）のいずれかが使用され得、固形経口調製物は、液状経口調製物よりも好ましい。

【０１３５】

錠剤およびカプセル剤は、投与し易いので、最も有利な経口単位投薬形態に相当しており、この場合、明らかに、固形薬学的キャリアが使用される。もし望ましいなら、錠剤は、標準的な水性技術または非水性で被覆され得る。このような組成物および調製物は、少な

くとも０．１％の活性化合物を含有できる。これらの組成物中での活性化合物の割合は、もちろん、変えられ得、好都合には、その単位の約２重量％と約６０重量％の間であり得る。このような治療上有用な組成物中の活性化合物の量は、治療上有効な投薬量が得られるようにされる。これらの活性化合物はまた、例えば、液滴または噴霧として、鼻内投与できる。

【０１３６】

これらの錠剤、丸薬、カプセル剤などはまた、結合剤（例えば、トラガカントガム、アカシア、コーンスターチまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、リン酸二ナトリウム）；崩壊剤（例えば、コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸ナトリウム）；および甘味料（例えば、スクロース、ラクトースまたはサッカリン）を含有し得る。単位投薬形態は、カプセルのとき、上記種類の物質に加えて、液状キャリア（例えば、脂肪オイル）を含有し得る。

【０１３７】

被覆として、またはその投薬単位の物理的形態を変えるために、種々の他の物質が存在し得る。例えば、錠剤は、セラック、糖またはそれらの両方で被覆され得る。シロップまたはエリキシルは、その活性成分に加えて、甘味料としてのスクロース、防腐剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、染料および香料（例えば、サクランボまたはオレンジの芳香）を含有し得る。ＧＩ路の上部を通過中に分解するのを防止するために、この組成物は、腸溶被覆処方であり得る。

【０１３８】

（投与）

本発明の化合物はまた、非経口的に投与され得る。これらの活性化合物の溶液または懸濁液は、界面活性剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース）と適切に混合した水中にて、調製できる。分散液もまた、オイル中のグルセロール、液状ポリエチレングリコールおよびそれらの混合物にて、調製できる。通常の保存および使用条件下にて、これらの調製物は、微生物の成長を防止する防腐剤を含有する。

【０１３９】

注射可能用途に適切な薬学的形態には、無菌水溶液または分散液、および無菌注射可能溶液または分散液を即座に調製するための無菌粉末が挙げられる。いずれの場合でも、その形態は、無菌でなければならず、かつ、簡単に注射可能な程度まで、流動性でなければならない。それは、製造および保存条件下にて安定でなければならず、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の汚染作用に対して保護されなければならない。このキャリアは、溶媒または分散媒体であり得、これは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液状ポリエチレングリコール）、それらの適切な混合物、および植物油を含有する。

【０１４０】

本発明の化合物は、広い投薬量範囲にわたって有効であり得る。例えば、成人の治療では、約１０～約１０００ｍｇ、約１００～約５００ｍｇまたは約１～約１００ｍｇの投薬量が必要であり得る。０．０５～約１００ｍｇ／日、さらに好ましくは、約０．１～約１００ｍｇ／日の用量が使用され得る。最も好ましい投薬量は、約０．１ｍｇ～約７０ｍｇ／日である。患者用のレジメンを選択する際に、しばしば、約２～約７０ｍｇ／日の投薬量で開始し、その病気が抑制されると、その投薬量は、約０．１～約１０ｍｇ／日程度に少なくする必要がある。例えば、成人の治療では、約０．０５～約１００ｍｇ／日、好ましくは、約０．１～約１００ｍｇ／日が使用され得る。その正確な投薬量は、投与様式、望ましい療法、投与形態、治療する被験体、および治療する被験体の体重、担当医師または獣医師の好みおよび経験に依存している。

【０１４１】

一般に、本発明の化合物は、好ましくは、薬学的に受容可能なキャリアと共に１単位投薬量あたり約０．１～約１００ｍｇの活性成分を含有する単位投薬形態で、調剤できる。通常、経口投与、鼻内投与、肺内投与または経皮投与に適切な投薬量は、薬学的に受容可能

なキャリアまたは希釈剤と混合した化合物を、約０．００１ｍｇ～約１００ｍｇ、好ましくは、約０．０１ｍｇ～約５０ｍｇで含有する。保存および使用のためには、これらの処方物は、好ましくは、微生物の成長を防止する防腐剤を含有する。

【０１４２】

その候補化合物の適切な量の投与は、当該技術分野で公知の任意の手段（例えば、経口または直腸、非経口、腹腔内、静脈内、皮下、経皮、鼻内または筋肉内）により得る。ある実施形態では、投与は、経皮である。適切な量または用量の候補化合物は、当該技術分野で公知のように、経験的に決定され得る。適切な量または治療量とは、時間の経過と共に、動物における体脂肪の減少または体重の減少を引き起こすのに十分な量である。候補化合物は、体脂肪の減少または体重の減少を引き起こすのに必要な程に頻繁に、例えば、１時間ごと、６時間ごと、８時間ごと、１２時間ごとまたは１８時間ごと、毎日または毎週、投与できる。

【０１４３】

経口投与に適切な処方は、以下からなり得る：（ａ）液状溶液（例えば、希釈剤（例えば、水、生理食塩水またはＰＥＧ４００）に懸濁した有効量の包装核酸）；（ｂ）カプセル、におい袋または錠剤（各々は、液体、固体、顆粒またはゼラチンとし、所定量の活性成分を含有する）；（ｃ）適切な液体中の懸濁液；および（ｄ）適切な乳濁液。錠剤形態は、１種以上のラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、コーンスターチ、ポテトスターチ、微結晶セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸および他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、防腐剤、香料、染料、崩壊剤、および薬学的に受容可能なキャリアを含有できる。ロゼンダ形態は、香料（例えば、スクロース）中にて、この活性成分を含有でき、そして、香錠は、不活性基剤（例えば、ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシア乳濁液、ゲルなど）で、その活性成分を含有し、これは、この活性成分に加えて、当該技術分野で公知のキャリアを含有する。

【０１４４】

注射溶液および懸濁液は、先に記述した種類の無菌粉末、顆粒および錠剤から調製できる。非経口投与（例えば、関節内、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内および皮下経路）に適切な処方には、水性および非水性の等張性無菌溶液（これらは、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、およびその処方を予定受容者の血液と等張性にする溶質を含有できる）、ならびに無菌の水性および非水性懸濁液（これは、懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤および防腐剤を含有できる）が挙げられる。

【０１４５】

経皮投与経路に関して、薬剤の経皮投与方法は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７版、（Ｇｅｎｎａｒｏら著、Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，１９８５）で開示されている。皮膚パッチは、本発明の化合物の好ましい経皮送達手段である。パッチは、好ましくは、これらの化合物の吸収を高める吸収向上剤（例えば、ＤＭＳＯ）を提供する。他の経皮薬剤送達方法は、米国特許第５，９６２，０１２号、第６，２６１，５９５号および第６，２６１，５９５号で開示されている。それらの各々の内容は、本明細書中で参考として援用されている。

【０１４６】

好ましいパッチには、皮膚への薬剤送達速度を制御するものが挙げられる。パッチは、種々の投薬系を提供し得、これには、それぞれ、レザバ系またはモノリス系が挙げられる。このレザバ設計は、例えば、以下の４つの層を有し得る：接着剤層（これは、皮膚に直接接触する）；制御膜（これは、薬剤分子の拡散を制御する）；薬剤分子レザバ；および耐水性裏打ち。このような設計は、特定時間にわたって、均一な量の薬剤を送達し、その送達速度は、異なる種類の皮膚の飽和限界未満でなければならない。

【０１４７】

このモノリス設計は、例えば、典型的には、以下の３層しか有しない：接着剤層；この化合物を含有する重合体マトリックス；および防水裏打ち。この設計により、飽和量の薬剤

が皮膚に運ばれる。それにより、送達は、皮膚により制御される。飽和レベルより低く、パッチ内の薬剤量を減少させるにつれて、送達速度は、低下する。

【０１４８】

本発明の化合物は、本発明の他の化合物または他の薬剤（これもまた、ダイエット、または体脂肪の治療、予防、抑制または改善に有用であり得る）と併用され得る。このような他の薬剤は、本発明の化合物と同時にまたは順次に、それに通例使用される量および経路により、投与され得る。本発明の化合物を１種以上の他の薬剤と同時に使用するとき、このような他の薬剤および化合物を含有する単位投薬量の薬学的組成物が好ましい。１種以上の活性成分と併用するとき、本発明の化合物および他の活性成分は、各々を単独で使用するときよりも低い用量で、使用され得る。従って、本発明の薬学的組成物には、上で開示した化合物に加えて、１種以上の他の活性成分を含有するものが挙げられる。

【０１４９】

（本発明の化合物の同定）

上記のような候補化合物は、当該技術分野で公知の種々の手段により、スクリーニングできる。例えば、体脂肪低下化合物は、当該技術分野で公知の動物生検技術を使用して、インビボで、同定できる。試験化合物および適当な賦形剤またはカロリー制限剤は、多数の経路（例えば、経口経路、非経口経路）のいずれかにより、実験被験体に投与でき、これらの被験体の体重は、治療の過程にわたって、モニターできる。これらの実験被験体は、ヒトまたは試験動物（例えば、ラット、マウス）である。

【０１５０】

この化合物の食欲に対する効果または食細りを誘発するか食物摂取量を減らす効果は、例えば、試験被験体の摂食量をモニターすることにより（例えば、食物重量またはカロリーの点で、被験体が食べた量または食べなかった量を測定することにより）、評価できる。これらの化合物の食欲に対する効果はまた、主観的な手段（ヒト被験体の食欲または食物に対する欲求レベルに関する質問票を含めて）により、評価できる。これらの試験化合物の脂質代謝に対する効果は、血中脂質および脂肪酸酸化をモニターすることにより、評価できる。これらの評価技術は、当業者に周知である。その研究は、投与の持続期間および投与効果の追跡調査に関して、短期的、準短期的、長期的または準長期的であり得る。

【０１５１】

体脂肪の低下は、例えば、動物の体脂肪の変化を直接測定することにより、または動物の体重の変化を測定することにより、決定できる。この動物は、マウス、ラット、モルモットまたはウサギからなる群から選択され得る。この動物はまた、体重に関連した疾患について、ｏｂ／ｏｂマウス、ｄｂ／ｄｂマウスもしくはＺｕｃｋｅｒラットまたは他の動物モデルであり得る。ヒトにおける臨床研究もまた、行われ得る。

【０１５２】

（コンビナトリアル化学ライブラリ）

最近、新しい化学化合物の手がかりの発見を助けるために、コンビナトリアル化学ライブラリの使用に注目が集まっている。コンビナトリアル化学ライブラリは、多数の化学「基礎単位」（例えば、試薬）を合わせることにより、化学合成または生物合成のいずれかで生成される多様な化学化合物の集合である。例えば、線形コンビナトリアル化学ライブラリ（例えば、ポリペプチドライブラリ）は、所定化合物長（すなわち、ポリペプチド化合物中のアミノ酸の数）について、可能なあらゆる様式で、アミノ酸と呼ばれる化学基礎単位のセットを組み合わせることにより、形成される。化学基礎単位をこのように組み合わせて混ぜることにより、何百もの数の化学化合物が合成できる。例えば、ある業界関係者は、１００個の交換可能な化学基礎単位の合成性コンビナトリアル混合により、１億の四量体化合物または１００億の五量体化合物の理論的合成がなされることを認めた（Ｇａｌｌｏｐら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７（９）：１２３３（１９９４））。

【０１５３】

コンビナトリアル化学ライブラリの作製およびスクリーリングは、当業者に周知である。このようなコンビナトリアル化学ライブラリには、ｐ－ベンゾジアゼピン（米国特許第５

，２８８，５１４号）、ダイバソマー（例えば、ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチド）（Ｈｏｂｂｓら、ＰＮＡＳ ＵＳＡ ９０：６９０９（１９９３））、小化合物ライブラリの類似の有機合成（Ｃｈｅｎら）Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１６：２６６１（１９９４）、オリゴカーバメート（Ｃｈｏら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１３０３（１９９３））、および／またはペプチジルホスホネート（Ｃａｍｐｂｅｌｌら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．５９：６５８（１９９４））、および小有機分子ライブラリ（例えば、ベンゾジアゼピン（Ｂａｕｍ Ｃ ＆ ＥＮ，Ｊａｎ １８，３３頁（１９９３））、チアゾリジノンおよびメタチアザノン（米国特許第５，５４９，９７４号）、ピロリジン（米国特許第５，５２５，７３５号および同第５，５１９，１３４号）、ベンゾジアゼピン（米国特許第５，２８８，５１４号）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１５４】

コンビナトリアルライブラリを調製する装置は、市販されている（例えば、３５７ ＭＰＳ，３９０ ＭＰＳ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｃｈｅｍ Ｔｅｃｈ，Ｌｏｕｉｓｖｉｌｌｅ ＫＹ，Ｓｙｍｐｈｏｎｙ，Ｒａｉｎｉｎ，Ｗｏｂｕｒｎ，ＭＡ，４３３Ａ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ，９０５０ Ｐｌｕｓ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡを参照）。

【０１５５】

溶液相化学に関して、多数の周知のロボット利用システムもまた、開発されている。これらのシステムには、武田薬品工業（大阪）が開発した自動化合成装置のような自動化ワークステーション、およびロボットアームを使用する多くのロボット利用システム（Ｚｙｍａｔｅ ＩＩ，Ｚｙｍａｒｋ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，Ｍａｓｓ．；Ｏｒｃａ，ＨｅｗｌｅｔｔＰａｃｋａｒｄ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）（これらは、化学者が実行する手動合成操作を模倣している）が挙げられる。上記装置のいずれかも、本発明と併用するのに適当である。これらの装置の性質およびそれを本明細書中で述べたように操作できるように改良を実行することは、関連技術の当業者に明らかである。それに加えて、多数のコンビナトリアルライブラリは、それ自体、市販されている（例えば、ＣｏｍＧｅｎｅｘ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，Ｎ．Ｊ．，Ａｓｉｎｅｘ，Ｍｏｓｃｏｗ，Ｒｕ，Ｔｒｉｐｏｓ，Ｉｎｃ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＣｈｅｍＳｔａｒ，Ｌｔｄ．，Ｍｏｓｃｏｗ，ＲＵ，３Ｄ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｅｘｔｏｎ，ＰＡ，Ｍａｒｔｅｋ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｃｏｌｕｍｂｉａ，ＭＤなどを参照）。

【０１５６】

（化学ライブラリの高処理能力アッセイ）

本明細書中で記述した化合物のアッセイは、高出力スクリーニングに従う。好ましいアッセイは、それゆえ、試験化合物による転写の活性化（すなわち、ｍＲＮＡ産生の活性化）、試験化合物によるタンパク質発現の活性化、もしくは試験化合物による遺伝子産物（発現したタンパク質）への結合；または下記のような脂肪酸変調に対する効果を検出する。

【０１５７】

特定のタンパク質産物の存在、不在または定量化についての高出力アッセイまたは結合アッセイは、当業者に周知である。それゆえ、例えば、米国特許第５，５５９，４１０号は、タンパク質の高出力スクリーニング方法を開示しており、また、米国特許第５，５７６，２２０号および同第５，５４１，０６１号は、リガンド／抗体の結合をスクリーニングする高出力方法を開示している。

【０１５８】

さらに、高出力スクリーニングシステムが、市販されている（例えば、Ｚｙｍａｒｋ Ｃｏｒｐ．，Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，ＭＡ；Ａｉｒ Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｍｅｎｔｏｒ，ＯＨ；Ｂｅｃｋｍａｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ，ＣＡ；Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．，Ｎａｔｉｃｋ，ＭＡなど）。これらのシステムは、典型的には、このアッセイに適当な全試料および試薬のピペット採取、液体調剤、定期インキュベーション、および検出器中のマイクロプレー

トの最終読み取りを含めて全手順を自動化する。これらの設定可能システムによれば、高出力および急速な始動だけでなく、高い程度の融通性および特注化が得られる。このようなシステムの製造業者は、種々の高出力の詳細なプロトコルを提供している。それゆえ、例えば、Ｚｙｍａｒｋ　Ｃｏｒｐ．は、遺伝子転写、リガンド結合などの変調を検出するスクリーニングシステムを記述している技術公報を提供している。

【０１５９】

（化合物が食物摂取量、体重、体脂肪、食欲、食物を求める行動に影響を与えるかまたは脂肪酸酸化を変調するかどうかの決定）

本発明の化合物は、食物摂取量、体重、体脂肪、食欲、食物を求める行動に影響を与えるかまたは脂肪酸酸化を変調するかどうかを決定するために、動物に投与できる。

【０１６０】

動物は、例えば、肥満または正常なモルモット、ブタ、ラット、マウスまたはウサギであり得る。適当なラットには、例えば、Ｚｕｃｋｅｒラットが挙げられる。適当なマウスには、例えば、正常なマウス、食物誘発の肥満になったＡＬＳ／ＬｔＪ、Ｃ３．ＳＷ－Ｈ－^{2b}／ＳｎＪ、（ＮＯＮ／ＬｔＪ　ｘ　ＮＺＯ／Ｈ１Ｊ）Ｆ１、ＮＺＯ／Ｈ１Ｊ、ＡＬＲ／ＬｔＪ、ＮＯＮ／ＬｔＪ、ＫＫ．Ｃｇ－ＡＡＬＲ／ＬｔＪ、ＮＯＮ／ＬｔＪ、ＫＫ．Ｃｇ－Ａ^{y}／Ｊ、Ｂ６．ＨＲＳ（ＢＫＳ）－Ｃｐｅ^{fat}／＋、Ｂ６．１２９Ｐ２－Ｇｃｋ$^{tm／Efr}$、Ｂ６．Ｖ－Ｌｅｐ^{ob}、ＢＫＳ．Ｃｇ－ｍ＋／＋ＬｅｐrdｂおよびＣ５７ＢＬ／６Ｊが挙げられる。

【０１６１】

適当な量の候補化合物の投与は、当業者に公知の任意の手段（例えば、経口または直腸、非経口（例えば、腹腔内、静脈内、皮下、経皮、鼻内または筋肉内））により得る。好ましくは、投与は、腹腔内または経口であり得る。候補化合物の適当な有効量は、当該技術分野で公知のように、経験的に決定され得る。適当な有効量とは、時間の経過と共に、動物における体脂肪の減少または体重の減少を引き起こすのに十分な量であり得る。候補化合物は、体脂肪の減少または体重の減少を引き起こすのに必要な程に頻繁に、例えば、１時間ごと、６時間ごと、８時間ごと、１２時間ごとまたは１８時間ごと、毎日または毎週、投与できる。

【０１６２】

経口投与に適当な処方は、以下からなり得る：（ａ）液状溶液（例えば、希釈剤（例えば、水、生理食塩水またはＰＥＧ４００）に懸濁した有効量の候補化合物）；（ｂ）カプセル、におい袋または錠剤（各々は、液体、固体、顆粒またはゼラチンとし、所定量の活性成分を含有する）；（ｃ）適当な液体中の懸濁液；および（ｄ）適当な乳濁液。錠剤形状は、１種またはそれ以上のラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、コーンスターチ、ポテトスターチ、微結晶セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸および他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、防腐剤、香料、染料、崩壊剤、および薬学的に受容可能なキャリアを含有できる。ロゼンダ形状は、香料（例えば、スクロース）中にて、この活性成分を含有できるだけでなく、香錠は、不活性基剤（例えば、ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシア乳濁液、ゲルなど）で、その活性成分を含有し、これは、この活性成分に加えて、当該技術分野で公知のキャリアを含有する。

【０１６３】

注射溶液および懸濁液は、先に記述した種類の無菌粉末、顆粒および錠剤から調製できる。非経口投与に適当な処方には、水性および非水性の等張性無菌溶液（これらは、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、およびその処方を予定受容者の血液と等張性にする溶質を含有できる）、および無菌の水性および非水性懸濁液（これは、懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤および防腐剤を含有できる）が挙げられる。

【０１６４】

動物に投与される用量は、時間の経過と共に、体重、体脂肪および／または脂肪酸酸化の

変化を引き起こすのに十分である。このような用量は、使用される特定の候補化合物の有効性および動物の状態だけでなく、動物の体重または表面積に従って、決定できる。この用量の大きさはまた、候補化合物の投与に伴う任意の副作用の存在、性質および程度；候補化合物のＬＤ$_{50}$；および種々の濃度での候補化合物の副作用により、決定される。一般に、この用量は、０．１～５０ｍｇ／体重１ｋｇ、好ましくは、１～２５ｍｇ／体重１ｋｇ、最も好ましくは、１～２０ｍｇ／体重１ｋｇの範囲である。用量応答関係の決定は、当業者に周知である。

【０１６５】

（体脂肪低下）

体重減少は、典型的には、体脂肪の変化を直接測定することにより、または体重の減少により、決定される。動物の体脂肪および体重は、候補化合物の投与前、投与中および投与後に、決定される。体脂肪の変化は、当該技術分野で公知の任意の手段（例えば、カリパスを使って脂肪層の測定、生体電気インピーダンス、静水計量または二重Ｘ線吸収測定）により、測定される。好ましくは、動物は、少なくとも２％、５％、８％または１０％の体脂肪減少を示す。体重の変化は、当該技術分野で公知の任意の手段（例えば、携帯型秤、デジタル秤、平衡秤、床秤または台秤）により、測定できる。好ましくは、動物は、少なくとも２％、５％、１０％または１５％の体重減少を示す。体重減少は、候補化合物の投与前、および治療中または治療後に規則的な間隔で、測定される。好ましくは、体重は、５日ごと、好ましくは、４日ごと、さらに好ましくは、３日ごと、さらにより好ましくは、２日ごと、最も好ましくは、毎日、測定される。

【０１６６】

（脂肪酸代謝の変化）

脂肪酸代謝の変化は、例えば、主要な脂肪燃焼組織（例えば、肝臓（Ｂｅｙｎｅｎら、Ｄｉａｂｅｔｅｓ ２８：８２８（１９７９））、筋肉（Ｃｈｉａｓｓｏｎ Ｌａｂ．Ａｎａｔ．ｏｆ Ｒａｔ，（１９８０））、心臓（Ｆｌｉｎｋら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：９９１７（１９９２））および脂肪細胞（Ｒｏｄｂｅｌｌ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２３９：３７５（１９６４））））に由来の細胞における脂肪酸酸化を調べることにより、測定できる。細胞は、初代培養物または細胞系に由来し得る。細胞は、当該技術分野で公知の任意の手段（例えば、酵素消化および解体を含めて）により、初代培養物に対して、調製され得る。適当な細胞株は、当該技術分野で公知である。適当な肝細胞株には、例えば、Ｆａｏ、ＭＨ１Ｃ１、Ｈ－４－ＩＩ－Ｅ、Ｈ４ＴＧ、Ｈ４－ＩＩ－Ｅ－Ｃ３、ＭｃＡ－ＲＨ７７７７、ＭｃＡ－ＲＨ８９９４、Ｎ１－Ｓ１ Ｆｕｄｒ、Ｎ１－Ｓ１、ＡＲＬ－６、Ｈｅｐａ １－６、Ｈｅｐａ－ｌｃｌｃ７、ＢｐＲｃｌ、ｔａｏ ＢｐＲｃｌ、ＮＣＴＣクローン１４６９、ＰＬＣ／ＰＲＦ／５、Ｈｅｐ ３Ｂ２．１－７［Ｈｅｐ ３Ｂ］、Ｈｅｐ Ｇ２［ＨｅｐＧ２］、ＳＫ－ＨＥＰ－１、ＷＣＨ－１７がある。適当な骨格筋細胞株には、例えば、Ｌ６、Ｌ８、Ｃ８、ＮＯＲ－１０、ＢＬＯ－１１、ＢＣ３Ｈ１、Ｇ－７、Ｇ－８、Ｃ２Ｃ１２、Ｐ１９、Ｓｏｌ８、ＳＪＲＨ３０［ＲＭＳ １３］、ＱＭ７がある。適当な心臓細胞株には、例えば、Ｈ９ｃ２（２－１）、Ｐ１９、ＣＣＤ－３２Ｌｕ、ＣＣＤ－３２Ｓｋ、Ｇｉｒａｒｄｉ、ＦＢＨＥがある。適当な脂肪細胞株には、例えば、ＮＣＴＣクローン９２９［Ｌ株の誘導体；Ｌ－９２９；Ｌ細胞］、ＮＣＴＣ ２０７１、Ｌ－Ｍ、Ｌ－Ｍ（ＴＫ－）［ＬＭＴＫ－；ＬＭ（ｔｋ－）］、Ａ９（Ｌ株のＡＰＲＴおよびＨＰＲＴ陰性誘導体）、ＮＣＴＣクローン２４７２、ＮＣＴＣクローン２５５５、３Ｔ３－Ｌ１、Ｊ２６、Ｊ２７－ｎｅｏ、Ｊ２７－Ｂ７、ＭＴＫＰ ９７－１２ ｐＭｐ９７ｂ［ＴＫＭｐ９７－１２］、Ｌ－ＮＧＣ－５ＨＴ２、Ｌｔｋ－１１、Ｌ－ａｌｐｈａ－ｌｂ、Ｌ－ａｌｐｈａ－２Ａ、Ｌ－ａｌｐｈａ－２Ｃ、Ｂ８２がある。

【０１６７】

脂肪酸化速度は、ケトン体への^{14}Ｃ－オレエート酸化（Ｇｕｚｍａｎおよび、Ｇｅｅｌｅｎ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２８７：４８７（１９８２））および／またはCO_2への^{14}Ｃ－オレエート酸化（Ｆｒｕｅｂｉｓ ＰＮＡＳ ９８：２００５（２００１）；Ｂｌａｚｑｕｅｚら、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ ７１：１５９７（１９９８））により、測定

され得る。脂肪分解は、標識した適当な前駆体を使用する脂肪酸またはグリセロールの放出により、または分光光度アッセイ（Ｓｅｒｒａｄｅｉｌ－Ｌｅ Ｇａｌ ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ ４７５：１５０（２０００））により、測定され得る。^{14}Ｃ－オレエートのケトン体への酸化を分析するために、新たに単離した細胞または培養細胞は、適当な時間（例えば、３０分間、６０分間、９０分間、１２０分間または１８０分間）にわたって、^{14}Ｃ－オレイン酸と共にインキュベートされ得る。このインキュベーション培地中の^{14}Ｃ放射能の量は、それらのオレエート酸化速度を決定するために、測定できる。オレエート酸化は、１ｇの細胞あたり、ｘ分間で生成されるオレエートのｎｍｏｌ数として、表わすことができる。脂肪分解／グリセロール放出を測定するために、新たに単離した細胞または培養細胞株は、洗浄され、次いで、適当な時間にわたって、インキュベートできる。このインキュベート培地に放出されるグリセロールの量は、脂肪分解の指標を提供し得る。

【実施例】

【０１６８】

（実施例）

以下の実施例は、限定ではなく例示の目的で提供される。当業者は、種々の重要でないパラメータを変えたり修正して事実上類似の結果が得られることを認識している。

【０１６９】

（実施例１：脂肪酸エタノールアミド化合物、ホモログおよびアナログの合成）

エタノールアミンおよび対応する脂肪アシルから脂肪酸エタノールアミンを形成する方法は、比較的に単純であり、当業者に公知である。例えば、脂肪酸エタノールアミドは、Ａｂａｄｊｊらにより記述されているように、脂肪酸または脂肪酸クロライドとアミノアルコールとを反応させることにより、合成され得る（Ａｂａｄｊｉ，Ｖ．，Ｌｉｎ，Ｓ．Ｙ．，Ｔａｈａ，Ｇ．，Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｇ．，Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎ，Ｌ．Ａ．，Ｐｅｒｔｗｅｅ，Ｒ．Ｇ．＆ Ｍａｋｒｉｙａｎｎｉｓ，Ａ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７，１８８９～１８９３（１９９４））。脂肪酸は、ＳｅｒｄａｒｅｖｉｃｈおよびＣａｒｒｏｌｌの手順と同様に、調製され得る（Ｓｅｒｄａｒｅｖｉｃｈ，Ｂ．＆ Ｃａｒｒｏｌｌ，Ｋ．Ｋ．Ｊ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．７，２７７～２８４（１９６６））。放射標識した脂肪酸エタノールアミドは、Ｄｅｓａｒｎａｕｄ，Ｆ．，Ｃａｄａｓ，Ｈ．＆ Ｐｉｏｍｅｌｌｉ，Ｄ．（１９９５）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０，６０３０～６０３５で記述されているように、アシルクロライド（Ｎｕ－Ｃｈｅｃｋ Ｐｒｅｐ，Ｅｌｙｓｉａｎ，ＭＮ）と［^{3}Ｈ］エタノールアミン（１０～３０Ｃｉ／ｍｍｏｌ；Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ）とを反応させることにより、調製できる。化合物は、フラッシュカラムクロマトグラフィーまたはＨＰＬＣで精製できる。化合物の同定は、ＮＭＲおよび／またはガスクロマトグラフィー－質量分析および薄層クロマトグラフィーにより、精製できる。

【０１７０】

出発試薬および物質は、Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｃａｙｍａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，ＭＩ），Ｎｕ－Ｃｈｅｃｋ Ｐｒｅｐ，Ｒｅｓｅａｒｃｈ ＢｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓまたはＳｉｇｍａから購入し得る。要約すると、Ｇｉｕｆｆｒｉｄａ，Ａ．らにより教示された方法（Ｇｉｕｆｆｒｉｄａ，ＡおよびＰｉｏｍｅｌｌｉ，Ｄ．，Ｌｉｐｉｄ Ｓｅｃｏｎｄ Ｍｅｓｓｅｎｇｅｒｓ（Ｌａｙｃｏｃｋ，Ｓ．Ｇ．およびＲｕｂｉｎ，Ｒ．Ｐ．編、ｐｐ．１１３～１３３ ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ ＬＬＣ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａ）およびＤｅｖａｎｅら（Ｄｅｖａｎｅ Ｗ．，Ｈａｎｕｓ，Ｌ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５８，１９４６～１９４９（１９９２）を参照）によれば、未標識または標識脂肪アシルエタノールアミンは、対応する脂肪アシルクロライドと未標識または標識エタノールアミンとを反応させることにより、合成できる。これらの脂肪酸クロライドは、ジクロロメタン（１０ｍｇ／ｍｌ）に溶解でき、－０．４℃で、１５分間、エタノールアミンと反応できる。この反応は、精製水を加えることにより、クエンチできる。激しく攪拌した後、相分離させる。その上部水相を捨てる

。その有機相を水で２回洗浄する。これらの洗浄により、未反応エタノールアミンを除去する。この方法により、脂肪アシルエタノールアミンが定量的に形成される。これらのエタノールアミン溶液は、窒素ガス流下にて、乾燥状態まで濃縮され、そして２０ｍＭの濃度で、有機溶媒（例えば、ジクロロメタン）中で再構成できる。得られた脂肪アシルエタノールアミンは、使用する必要があるまで、－２０℃で、保存できる。

【０１７１】

脂肪酸のカルボン酸基、第一級および第二級アミン、および第一級アルコール基の化学的性質は、当業者に周知である。そのエチノールアミン部分に種々の置換基を有する脂肪酸エタノールアミドは、多くの様式で形成できるが、最も好ましくは、対応する置換したエタノールアミンおよび脂肪酸部分で出発することにより、形成できる。このような置換したエタノールアミンには、アルキルアミノエタノールエーテルおよびアシルアミノエタノールエステルだけでなく、第二級アルキルエタノールアミンが挙げられる。あるいは、特定の脂肪酸エタノールアミドは、適当な置換基を加えることにより、対応する脂肪酸エタノールアミドから合成できる。

【０１７２】

（実施例２：インビボで脂肪酸エタノールアミド（ＦＡＥ）および本発明の他の化合物をスクリーニングする方法）

動物。オスのウィスターラット（２００～３５０ｇ）を使用した。手順は、ｔｈｅ Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ、およびｔｈｅ Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｍｍｕｎｉｔｉｅｓの指令８６／６０９／ＥＥＣ（これは、動物の研究を規制する）で詳述されたＮＩＨ指針を満たすべきである。

【０１７３】

化学物質。ＦＡＥｓおよび［$^{2}H_{4}$］ＦＡＥｓは、実験室で合成した（Ｇｉｕｆｆｒｉｄａら、「Ｌｉｐｉｄ Ｓｅｃｏｎｄ Ｍｅｓｓｅｎｇｅｒｓ」（Ｌａｙｃｈｏｃｋ，Ｓ．Ｇ．＆ Ｒｕｂｉｎ，Ｒ．Ｐ．編）１１３－１３３（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ ＬＬＣ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ，１９９８））；１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホエタノールアミン－Ｎ－オレイルは、Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ（Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ）から購入した；ＳＲ１４１７１６Ａは、ｔｈｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｐｒｏｇｒａｍ ｏｆ ｔｈｅ ＮＩＭＨ（Ｎ０１ＭＨ３０００３）の一部として、ＲＢＩ（Ｎａｔｉｃｋ，ＭＡ）により提供した；ＳＲ１４４５２８は、Ｓａｎｏｆｉ Ｒｅｃｈｅｒｃｈｅの好意により提供していただいた；他の全ての薬剤は、Ｔｏｃｒｉｓ（Ｂａｌｌｗｉｎ，ＭＯ）またはＳｉｇｍａ（Ｓａｉｎｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から入手した。ＦＡＥをジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に溶解し、そして無菌生理食塩水中の７０％ＤＭＳＯ（短期治療）または無菌生理食塩水中の５％Ｔｗｅｅｎ ８０／５％プロピレングリコール（準長期治療）中で投与した（１ｍｌ／ｋｇ、腹腔内注射）。カプサイシンは、１０％Ｔｗｅｅｎ ８０／１０％エタノール／８０％生理食塩水中で投与した；ＳＲ１４１７１６Ａ、ＳＲ１４４５２８、ＣＣＫ－８およびＣＰ－９３１２９は、５％Ｔｗｅｅｎ ８０／５％プロピレングリコール／９０％生理食塩水中で投与した（１ｍｌ／ｋｇ、腹腔内注射）。

【０１７４】

酵素アッセイ。全ての生化学実験では、種々の期間にわたって食物を欠乏させた後の１４００時間と１６００時間との間に、ラットを殺し、組織を収集した。文献（Ｄｅｓａｒｎａｕｄら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７０：６０３０～６０３５（１９９５））で記述されているように、ミクロソーム断片を調製した。基質として１，２－ジ［^{14}C］パルミチル－ｓｎ－グリセロホスホコリンを使用して、ＮＡＴアッセイを実行した（１０８ｍＣｉ／ｍｍｏｌ，Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）（Ｃａｄａｓら、Ｈ．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，１７：１２２６～１２４２（１９９７））。基質として［^{3}H］アナンダミド（アラキドニル－［１－^{3}H］エタノールアミド；６０Ｃｉ／ｍｍｏｌ；ＡＲＣ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を含めてクロロホルム抽出後に水相で放射活性

を測定した以外、文献（Ｄｅｓａｒｎａｕｄら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７０：６０３０～６０３５（１９９５））に従って、ＦＡＡＨアッセイを実行した。

【０１７５】

ＨＰＬＣ／ＭＳ分析。心臓穿刺により得た血液から血漿を調製し（Ｇｉｕｆｆｒｉｄａら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２８０：８７～９３（２０００））、そして２７Ｇ１／２針を使用して、大槽から、ＣＳＦを収集した（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎｇｌｉｄｅ，ＵＳＡ）。メタノール／クロロホルムを使って、組織から、ＦＡＥおよびＮＡＰＥを抽出し、そしてカラムクロマトグラフィーにより分画した（Ｇｉｕｆｆｒｉｄａら、「Ｌｉｐｉｄ Ｓｅｃｏｎｄ Ｍｅｓｓｅｎｇｅｒｓ」（Ｌａｙｃｈｏｃｋ，Ｓ．Ｇ．＆ Ｒｕｂｉｎ，Ｒ．Ｐ．編）１１３～１３３（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ ＬＬＣ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ，１９９８））。同位体希釈法を使用して、ＨＰＬＣ／ＭＳにより、ＦＡＥを定量した（Ｇｉｕｆｆｒｉｄａら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２８０：８７～９３（２０００））。外部標準法を使用して、個々のＮＡＰＥ種を同定し、そしてＨＰＬＣ／ＭＳにより定量した（Ｃａｌｉｇｎａｎｏら、Ｎａｔｕｒｅ，４０８：９６～１０１（２０００））。

【０１７６】

血液の化学的性質。市販のキット（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を使用して、血漿ｐ－ヒドロキシブチレートおよびグリセロールを測定した。ラジオイムノアッセイにより、血漿プロラクチン、コルチコステロンおよび黄体形成ホルモンを定量した（Ｎａｖａｒｒｏら、Ｎｅｕｒｏｒｅｐｏｒｔ，８：４９１～４９６（１９９７））。

【０１７７】

摂食実験。長期実験。２４時間食物を絶ったラット（Ｎａｖａｒｒｏら、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．，６７：１９８２～１９９１（１９９６））にて、食物提示の１５分前に薬剤を投与して、食物摂取量を測定した。準長期実験。自由に餌を与えたラットに、３日間、ビヒクルを注射した。４日目、これらの動物を２つの同数の群に分割し、７日連続で、毎日、ビヒクルまたはＯＥＡ（１９００時間で５ｍｇ／ｋｇ）を注射し、その間、体重、食物摂取量および水分摂取量を測定した。

【０１７８】

条件付き味覚嫌悪。ラットを、２４時間水を絶ち、次いで、４日間にわたって、３０分間の試験期間中にて、グレードボトルから水を飲むように慣れさせた。５日目、水を０．１％サッカリン溶液に置き換え、３０分後、これらの動物に、ビヒクル、ＯＥＡ（２０ｍｇ／ｋｇ）または塩化リチウム（０．４Ｍ、７．５ｍｌ／ｋｇ）を注射した。次の２日間、３０分の試験期間にわたって、水の消費を記録した。次いで、これらの動物に、水またはサッカリンを提示し、飲水を測定した。

【０１７９】

食物に対するオペラント応答。ラットを、ラット１匹あたり、２０ｇ／日の固形飼料に食物制限しつつ、一定割合１（ＦＲ１）の強化スケジュールで、食物用のレバーを押すように訓練した（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ ｄｅ Ｆｏｎｓｅｃａら、Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｉｎ．，２０：１１０９～１１１４（１９９９））。一旦安定な応答を達成したら、これらの動物を、食物強化のＦＲ５のタイムアウト２分のスケジュールを獲得するよう訓練し、そして食物を制限した。安定なベースラインが得られたとき、これらの動物を、レバー提示の１５分前に投与したビヒクルまたはＯＥＡ（１、５ｇまたは２０ｍｇ／ｋｇ）の効果を試験するのに使用した。試験の持続時間は、６０分間であった。

【０１８０】

他の行動アッセイ。ビヒクルまたはＯＥＡ（２０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内注射）を投与した後、文献（Ｎａｖａｒｒｏら、Ｎｅｕｒｏｒｅｐｏｒｔ，８：４９１～４９６（１９９７））で記述されているように、上昇プラス迷路試験（ｅｌｅｖａｔｅｄ ｐｌｕｓ ｍａｚｅ）を行った。露地での水平活動（Ｂｅｌｔｒａｍｏら、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，２０：３４０１～３４０７（２０００））およびホットプレート試験（５５℃）での苦痛閾値（Ｂｅｌｔｒａｍｏら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２７７：１０９４～１０９７（１９９７））は

、ビヒクルまたはＯＥＡ（２０ｍｇ／ｋｇ）の注射の１５分後、測定した。デジタル温度計を使用して、直腸温を測定した（Ｍａｒｔｉｎ－Ｃａｌｄｅｒｏｎら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，３４４：７７～８６（１９９８））。

【０１８１】

インサイツハイブリダイゼーション。ラットを、５日間にわたって、取り扱いおよび注射手順に慣れさせた。６日目、ビヒクルまたは薬剤ＯＥＡ（１０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内注射）またはオレイン酸（１０ｍｇ／ｋｇ）を投与し、それらのラットを、６０分後、麻酔下での断頭により、殺した。ｃ－ｆｏｓ（Ｇｕｔｈｒｉｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，９０：３３２９～３３３３（１９９３））およびコリンアセチルトランスフェラーゼ（ＣｈＡＴ）（Ｌａｕｔｅｒｂｏｒｎら、Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．Ｍｏｌ．Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．，１７：５９～６９（１９９３））について、^{35}Ｓ－標識ｃＲＮＡプローブを使用して、インサイチュハイブリダイゼーション分析を行った。ラット１匹あたり、少なくとも３つの組織部分から、平均ハイブリダイゼーション密度を測定した。分散（ＡＮＯＶＡ）の一方向分析に続いて、一対比較法用のＴｕｒｋｅｙＫｒａｍｅｒポストホック試験を使用して、統計的な有意性を評価した。

【０１８２】

データ分析。結果は、ｎ回の別々の実験に対して、平均±ｓ．ｅ．ｍとして、表した。特に明記しない限り、ＡＮＯＶＡに続いて、Ｓｔｕｄｅｎｔ－Ｎｅｗｍａｎ－Ｋｅｕｌｓポストホック試験を使用して、グループ間の差の有意性を評価した。

【０１８３】

（実施例３：ラットにおけるＯＥＡおよび他のＦＡＥレベルに対する絶食の効果）

１実施形態では、本発明は、治療方法を提供し、ここで、減量および／または体脂肪減少が必要な個体は、絶食前および／または絶食中にて、ＯＥＡについて試験される。次いで、絶食前または絶食に応答して低レベルのＯＥＡを有する個体は、特に、ＯＥＡ治療に標的にする。

【０１８４】

ラットの食物を絶ち、その間、エレクトロスプレー質量分析器（ＭＳ）に連結した高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）により、心臓血中のＦＡＥレベルを定期的に測定した。血漿ＯＥＡは、絶食の最初の１２時間、ベースラインレベルにとどまり、１８～２４時間で、著しく増加し、そして３０時間で、正常に戻った（図１ａ）。水を絶った後（図１ｂ）またはストレッサー（例えば、拘束固定化およびリポ多糖（ＬＰＳ）投与［ｐｍｏｌ／ｍｌ；１０．３±０．８；１５分間の固定化後、６０分間、８．４１±１．６；ＬＰＳの注射後、６０分間（１ｍｇ／ｋｇ）、７．０±０．７；ｎ＝６～９］）の適用後、このような効果は観察されなかった。血漿ＰＥＡは、これらの治療のいずれによっても著しい影響を受けなかった（データは示さず）のに対して、アナンダミドは、食物を除くと急速に低下し、この実験の全持続期間中にて、ベースラインよりも低いままであった（図１ｄ）。アナンダミドのレベルはまた、固定化後（ｐｍｏｌ／ｍｌ；コントロール、３．６±０．４；固定化、１．１±０．５；ｎ＝７～８；ｐ＜０．０１）およびＬＰＳ治療後（コントロール、２．０±０．５；ＬＰＳ、０．２±０．２；ｎ＝６；ｐ＜０．０１）、低下し、そして、水を絶った後（著しくはないが）、低下した（図１ｅ）。これらの結果は、循環しているＯＥＡレベルが、絶食中にて、一過的に高まることを示す。この応答は、アナダミドおよび他のＦＡＥにわたって、ＯＥＡに対して選択的であり、血中グリセロールおよびβ－ヒドロキシブチラートの上昇と一時的に一致し（表１）、これは、一次燃料として、炭水化物から脂肪酸へのエネルギー代謝のシフトの合図となる（Ｃａｈｉｌｌ，Ｇ．Ｆ．，Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．，５：３９７～４１５（１９７６））。

【０１８５】

表１．絶食ラット中のβ－ヒドロキシブチラート（β－ＨＢＡ）およびグリセロールの血漿レベル

【０１８６】

【表１】

	β-HBA	グリセロール
自由な給餌	1.2±0.4	4.6±0.9
2時間絶食した	1.2±0.2	5.3±0.6
4時間絶食した	0.8±0.1	9.1±1.8
8時間絶食した	1.3±0.2	6.3±0.4
12時間絶食した	4.6±0.8*	7.6±1.0
18時間絶食した	6.8±0.4*	8.4±0.4*
24時間絶食した	9.1±1.2*	8.4±0.3*

濃度は、ｍｇ／ｄｌで表わしている。 *P＜0.05, n＝3／群

脳脊髄液中のＯＥＡレベルは、食物の欠乏には著しく影響されず（図１ｃ）、このことは、血漿ＯＥＡの急激な変化がＣＮＳの外側で始まり得ることを暗示している。この仮説を試験するために、種々のラット組織中のＯＥＡ代謝に対する絶食の影響を研究した。動物細胞がＯＥＡおよび他のＦＡＥを産生し分解する生化学経路は、３つの重要な酵素工程を含むと考えられている。カルシウムイオン刺激ＮＡＴ活性により、脂肪酸基は、ドナーリン脂質のｓｎ－１位置から、ホスファチジルエタノールアミンの第一級アミンへと移動して、ＮＡＰＥ２を生成する（Ｓｃｈｍｉｄら、Ｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓ．Ｌｉｐｉｄｓ，８０：１３３～１４２（１９９６）；Ｐｉｏｍｅｌｌｉら、Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．Ｄｉｓ．，５：４６２～４７３（１９９８））。未知のホスホリパーゼＤによるＮＡＰＥ中の遠位ホスホジエステルの開裂により、ＦＡＥが産生し（Ｓｃｈｍｉｄら、Ｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓ．Ｌｉｐｉｄｓ，８０：１３３～１４２（１９９６）；Ｐｉｏｍｅｌｌｉら、Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．Ｄｉｓ．，５：４６２～４７３（１９９８））、これらは、最終的に、細胞内脂肪酸アミド加水分解酵素（ＦＡＡＨ）により、脂肪酸とエタノールアミンとに分解する（Ｓｃｈｍｉｄら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６０：１４１４５～１４１４９（１９８５）；Ｃｒａｖａｔｔｏら、Ｎａｔｕｒｅ，３８４：８３～８７（１９９６））。食物欠乏（１８時間）は、白色脂肪組織中のＮＡＴ活性の著しい上昇を伴った（図２ａ）が、これは、脳、胃または腎臓では、この上昇を伴わなかった（図２ｂ、ｄおよびデータなし）。肝臓、腸および骨格筋では、ＮＡＴ活性は、絶食により低下した（図２ｃ、ｄおよびデータなし）。これらの酵素的な変化は、ＮＡＰＥ組織内容物中の対応する変化と平行していた。ラット組織では、ＮＡＰＥの数種の分子種が存在しており、これには、ＯＥＡ前駆体であるアルク－１－パルミトエニル－２－アラキドニル－ｓｎ－グリセロ－ホスホエタノールアミン－Ｎ－オレイル（ＮＡＰＥ１；図３ａ）およびアルク－１－パルミチル－２－アラキドニル－ｓｎ－グリセロ－ホスホエタノールアミン－Ｎ－オレイル（ＮＡＰＥ２；図３ａ）；およびＰＥＡ前駆体であるアルク－１－パルミチル－２－アラキドニル－ｓｎ－グリセロ－ホスホエタノールアミン－Ｎ－パルミチル（図示せず）が挙げられる。ＮＡＴ活性測定と一致して、食物の欠乏により、脂肪中のＮＡＰＥ含量が高まり、肝臓中のそれが低下した（図３ｂ、ｃ）。

【０１８７】

ＮＡＰＥ生合成およびＦＡＥ形成は、密接に連関したプロセスであるので（Ｃａｄａｓら、Ｈ．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，１７：１２２６～１２４２（１９９７））、絶食により、脂肪組織中のＯＥＡおよび他のＦＡＥのレベルは増大するが、他の組織中では、これが増大しないと予想され得る。従って、絶食したラット由来の脂肪は、自由に給餌した対照由来の脂肪よりも多くのＯＥＡおよびＰＥＡを含有していたのに対して（図３ｄおよびデータなし）、脳、胃および腸では、このような差は、見られなかった（データなし）。

しかしながら、本発明者らの予想に反して、ＯＥＡおよびＰＥＡの肝臓含量もまた、絶食したラットでは、自由に給餌したラットよりも高かった（図３ｄおよびデータなし）。この不調和は、肝臓によるＦＡＥの蓄積が原因であり得、これは、ＦＡＥの回収および代謝におけるこの臓器の想定される役割と一致している（Ｂａｃｈｕｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２４０：１０１９～１０２４（１９６５）；Ｓｃｈｍｉｄら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６０：１４１４５～１４１４９（１９８５））。

【０１８８】

脂肪酸およびエタノールアミンへの加水分解は、ＦＡＡＨにより触媒されるが、ＦＡＥ分解における重要な工程である（Ｂａｃｈｕｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２４０：１０１９～１０２４（１９６５）；Ｓｃｈｍｉｄら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６０：１４１４５～１４１４９（１９８５）；Ｃｒａｖａｔｔｏら、Ｎａｔｕｒｅ，３８４：８３～８７（１９９６）；Ｄｅｓａｒｎａｕｄら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７０：６０３０～６０３５（１９９５））。絶食すると、脂肪膜中のＦＡＡＨ活性が大きく低下したが、脳、肝臓、胃、腸、腎臓および骨格筋中のＦＡＡＨ活性には影響がなかった（図２ａ～ｅおよびデータなし）。それゆえ、絶食により、２つの相乗様式で、白色脂肪組織中のＯＥＡおよび他のＦＡＥのレベルを高め得るが、これらは、脂肪分解中に起こる他の反応とは機械論的に異なる：ＮＡＴ活性を刺激すると、ＮＡＰＥおよびＦＡＥの生合成の増加を引き起こし得るのに対して、ＦＡＡＨ活性の阻害により、新たに合成されたＦＡＥの寿命が延び得る。いくつかの組織は、血流中のＯＥＡの正常なレベルに寄与し得るものの、脂肪中で観察された動的な生化学変化は、絶食中にＯＥＡを産生する際のこの組織の重要な役割を強調している。

【０１８９】

（実施例４：ＯＥＡおよび他のＦＡＥによる食物摂取量の抑制）

ラットにおける食物摂取量に対する全身的に投与したＯＥＡの効果は、２４時間の絶食を使用して、評価できる。この系では、ＯＥＡにより、用量依存性および時間依存性の食物摂取量抑制が起こった（図４ａ、ｂ）。この応答の選択性を規定するために、種々のＯＥＡアナログを、それらが食細りを生じる能力について、評価した。

【０１９０】

アナンダミドおよびオレイン酸は、効果がなかった。

【０１９１】

パルミチルエタノールアミドは、活性であったが、ＯＥＡよりも有効性が著しく低かった。

【０１９２】

エライジルエタノールアミド（非天然ＯＥＡアナログ）は、ＯＥＡと類似の有効性であった（図４ａ）。

【０１９３】

これらの結果から、ＯＥＡが構造上選択的な様式で摂食を低下させること、また、本発明の用途について、他の脂肪酸エタノールアミド様化合物が同定できることが明らかとなる。

【０１９４】

（実施例５：カンナビノイドレセプタ活性化剤にわたる特異性）

ＯＥＡ食細りに対する分子要件は、アナンダミドとその公知のカンナビノイド標的との相互作用に関与しているものとは区別される（Ｋｈａｎｏｌｋａｒら、Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉ．，６５：６０７～６１６（１９９９））。カンナビノイドレセプタアンタゴニストは、インビボでは、ＯＥＡ食細りに影響を与えず、また、ＯＥＡは、インビトロにて、ラットの脳膜へのカンナビノイド結合にとって代わらなかった。それゆえ、ＯＥＡは、それが構造上および生物発生的にアナンダミドと関係しているにもかかわらず、食欲不振を生じるのに、内生カンナビノイド系に依存していない。

【０１９５】

（実施例６：持続した体重減少）

ある実施形態では、本発明の化合物は、哺乳動物に長期間投与すると持続的な脂肪減少または体重減少をもたらす。この効果は、短期的な投与後に食欲を抑制する種々の薬剤として、有利であるが、治療が長引くと、失敗する（Ｂｌｕｎｄｅｌｌ，Ｊ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ．，１２：１４７～１５７（１９９１））。

【０１９６】

ＯＥＡを、ラットに準長期的に投与した。ＯＥＡ（５ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）を７日間にわたって毎日注射すると、累積的な食物摂取について、少ないが有意の低下が起こり（図５ａ）、これは、体重増加を著しく妨げた（図５ｂ、ｃ）。ＯＥＡは、水分摂取量には影響がなかった（図５ｄ）。体重に対するＯＥＡの影響は、摂食量の穏やかな低下により、部分的に説明できるにすぎず、このことは、他の要因（例えば、エネルギー消費の刺激またはエネルギー蓄積の阻止）がこの効果に寄与し得ることを示している。

【０１９７】

（実施例７：ＦＡＥは、末梢の活性部位を有し得る）

本発明は、その１局面では、化合物に末梢の活性部位を提供する。このような部位は、中枢神経系の副作用の可能性を少なくするのに有利である。

【０１９８】

ＯＥＡは、末梢的に投与したときに強力であるものの、脳室に直接注入しても、効果がなく（表２）、このことは、この化合物の主要作用部位がＣＮＳの外側に位置し得ることを示唆している。さらに別の証明として、迷走神経および他の末梢神経における感覚繊維は、成体ラットを神経毒であるカプサイシンで処理することにより、化学的に破壊された（Ｋａｎｅｋｏら、Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，２７５：Ｇ１０５６～Ｇ１０６２（１９９８））。カプサイシン処理したラットは、末梢的に投与したコレシストキニン－８（ＣＣＫ８）には応答せず（図６ａ、ｃ）、対照よりも多くの水を飲み（図６ｂ、ｄ）、角膜化学感受性反射を失い（データなし）、これらの３つの徴候から、神経毒が感覚求心性神経を破壊したと言える（ＭａｃＬｅａｎ，Ｄ．Ｂ．，Ｒｅｇｕｌ．Ｐｅｐｔ．，１１：３２１～３３３（１９８５）；Ｒｉｔｔｅｒら、Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，２４８：Ｒ５０１～Ｒ５０４（１９８５）；Ｃｕｒｔｉｓら、Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，２７２：Ｒ７０４～Ｒ７０９（１９９７））。処理した動物はまた、ＯＥＡ（１０ｍｇ／日、腹腔内）に応答しなかったが、通常、化合物ＣＰ－９３１２９（これは、ＣＮＳ中の５－ＨＴ$_{1B}$レセプタを標的にする）に応答した（図６ａ、ｃ）（Ｌｅｅら、Ｐｓｙｃｈｏｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，１３６：３０４～３０７（１９９８））。これらの発見は、ＯＥＡが末梢部位で作用することにより食細りを引き起こすこと、また、この効果に感覚繊維が必要であるという仮定を支持している。

【０１９９】

表２。脳室内プラナミド（ｐｒａｎａｍｉｄｅ）の食物摂取量に対する効果

【０２００】

【表２】

	60 分間	120 分間	240 分間
ビヒクル	5.8±0.6	8.0±0.5	9.5±0.5
プラナ 0.4 μg	4.8±0.4	6.6±0.4	8.4±0.4
プラナ 2 μg	4.9±0.4	6.6±0.6	8.7±0.5
プラナ 10 μg	5.9±0.2	8.1±0.4	9.6±0.7

食物を提示する１５分前に、２４時間絶食したラットに、プラナミド／ＯＥＡ（プラナ、μｇ／動物１匹）またはビヒクル（ＤＭＳＯ、５μｌ）を投与した。ｎ＝１２匹／群。

【０２０１】

本発明の化合物は、末梢感覚入力を使用して食欲を抑制し得る。食欲抑制に関係した末梢感覚入力は、数種のＣＮＳ構造を補充し、これには、脳幹における孤束の核（ＮＳＴ）および視床下部におけるアーチ形の脳室周囲（ＰＶＮ）核が挙げられる（Ｓｃｈｗａｒｔｚら、Ｎａｔｕｒｅ，４０４：６６１～６７１（２０００））。ＯＥＡで誘発した食細り中に関与する脳の経路を同定するために、活性制御した遺伝子ｃ－ｆｏｓに対するｍＲＮＡ（Ｃｕｒｒａｎら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ，２：７９～８４（１９８７））は、ＯＥＡ、オレイン酸またはビヒクルを全身投与した後、インサイツハイブリダイゼーションにより、マッピングされた。対照と比較すると、ＯＥＡ（１０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）は、ＰＶＮ、視索上核（図７ａ）およびＮＳＴ（図７ｃ）において、ｃ－ｆｏｓ　ｍＲＮＡレベルの非常に局在化した上昇を誘起した。この増大は、他の脳領域でのｃ－ｆｏｓの発現がＯＥＡ処理により著しく影響を受けない限り、この領域に特異的であった（図７ｂ、ｄ）。ＯＥＡがＮＳＴ（これは、ＣＮＳに対する迷走感覚入力を有する）およびＰＶＮ（中枢異化信号の統合に対する主要部位）でのｃ－ｆｏｓのｍＲＮＡ発現を刺激するという発見（Ｓｃｈｗａｒｔｚら、Ｎａｔｕｒｅ，４０４：６６１～６７１（２０００））は、食欲抑制の末梢媒介物としてのこの脂質の生理学的な役割と一致している。

【０２０２】

ＯＥＡは、行動抑制の非特異的状態を誘発することにより、食欲を低下されることが可能である。このことが真実である場合、ＯＥＡは、馴化された味覚による嫌悪を引き起こすはずであり、これは、ラットにおいて、多数の有毒性物質により、容易に刺激でき（Ｇｒｅｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，１７３：７４９～７５１（１９７１））、この物質には、塩化リチウムが挙げられる（図４ｃ）。しかしながら、最大用量（２０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）のＯＥＡは、このアッセイに殆ど効果がなく（図４ｃ）、このことは、この化合物が有害ではないかもしれないことを示唆している。何回かさらに観察したところ、ＯＥＡの行動特異性が立証された。ＯＥＡは、水分摂取量、体温、苦痛閾値（図４ｄ～ｆ）、または視床下部－下垂体－副腎（ＨＰＡ）軸の活性を変えなかった（表３）。さらに、ＯＥＡは、不安様の症状を起こさず（図４ｇ）、また、それは、食物に対する運動活性およびオペラント応答を低下させたものの、食細りを生じるのに必要な用量よりもかなり高い用量で、それらを引き起こした（図４ｈ～ｉ）。この薬理学的プロフィールにより、ＯＥＡは、他の食欲抑制剤（例えば、アンフェタミンおよびグルカゴン様ペプチド１（その効果は、しばしば、嫌悪、活動亢進、不安、およびＨＰＡ軸の活性化を含む）および内生カンナビノイドであるアナンダミド（これは、部分的に食欲が満たされた動物の食物摂取を刺激し、苦痛閾値を高め、体温を低下させ、そしてＨＰＡ軸を活性化させる））と区別される（Ｐｅｒｔｗｅｅ，Ｒ．Ｇ．，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｒｕｇｓ，９：１５５３～１５７１（２０００））。

【０２０３】

表３。血漿ホルモンレベルに対するＯＥＡの効果

【０２０４】

【表３】

	B	PRL	LH
ビヒクル	212±24	10.8±2.7	5.3±0.9
プラナ 20	280±61	8.2±3.2	6.2±1.5

表３では、血漿コルチコステロン（Ｂ）、プロラクチン（ＰＲＬ）および黄体形成ホルモン（ＬＨ）のレベルは、ビヒクルまたはプラナミド（プラナ、ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）の注射の６０分後に収集した血漿試料にて、ラジオイムノアッセイにより測定し、ｎｇ／ｍｌで表した。ｎ＝６～９匹／群。

【０２０５】

ＯＥＡは、生理学的に関連した用量で、食細りを誘発する。最大有効量の半分（５ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）を投与した１時間後、循環しているＯＥＡレベル（１６．１±２．６ｐｍｏｌ／ｍｌ）は、ベースラインよりも著しく高かったが（１０．１±１．１；Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定；ｎ＝５）、１８時間絶食したＯＥＡで測定した値よりも低かった（図１ａ）。それゆえ、絶食中に血液中のＯＥＡで達成された濃度は、著しい行動応答を引き起こすのに十分であり得る。

【０２０６】

（実施例８：本発明の体脂肪低下化合物の同定）

以下の実施例は、いかにして、陽性対照としてＯＥＡを使用して食欲抑制剤を同定するかを示す。特に、ＯＥＡの合成、体脂肪低下の測定および脂肪酸酸化を述べる。

【０２０７】

（ＯＥＡの合成）

オレイルクロライドは、Ｎｕ－Ｃｈｅｃｋ　Ｐｒｅｐ（Ｅｌｙｓｉａｎ，ＭＮ）から購入するか、標準手順に従って、調製する。オレイルクロライドを、ジクロロメタン（１０ｍｇ／ｍｌ）に溶解し、そして０～４℃で、１５分間にわたって、５当量のエタノールアミンと反応させる。この反応を、精製水を加えることにより、停止する。激しく攪拌し相分離した後、上部水相を捨て、有機相を水で２回洗浄して、未反応エタノールアミンを除去する。得られたＯＥＡを、N_2流下にて、乾燥状態まで濃縮し、２０ｍＭで、クロロホルム中にて再構成し、そして使用するまで、－２０℃で保存する。

【０２０８】

（候補化合物により誘発される体脂肪減少の測定）

ある化合物が体脂肪を減少する能力は、多数の方法により評価できる。例えば、適当な量のＯＥＡおよび／または候補化合物は、腹腔内注射により、ラットに投与される。これらのＯＥＡおよび候補化合物は、無菌生理食塩水中の７０％ＤＭＳＯ、無菌生理食塩水中の５％Ｔｗｅｅｎ　８０／５％プロピレングリコール、または１０％Ｔｗｅｅｎ　８０／１０％エタノール／８０％生理食塩水中に、処方できる。その陽性対照として、５ｍｇ／ｋｇのＯＥＡが使用できる。投与される候補化合物の量は、例えば、１～２５ｍｇ／ｋｇの範囲であり得る。典型的には、どの用量が最適であるかを決定するために、異なるセットのラットに、１ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇおよび２０ｍｇ／ｋｇの用量の各候補化合物が投与できる。注射は、７～１４日間にわたって、その動物の主な食事の３０分前に、行われ得る。

【０２０９】

候補化合物の全体脂肪に対する効果は、皮膚脂肪層カリパス（ｓｋｉｎ　ｆｏｌｄ　ｃａｌｉｐｅｒ）を使用してラットの体脂肪を直接測定することにより、決定できる。ラットの背中、腹部、胸部、前足および後足の皮膚は、ＯＥＡおよび／または候補化合物の投与前、およびＯＥＡおよび／または候補化合物の投与中の４８時間ごとおよび投与後に、カリパスで挟まれ、測定値を得ることができる。挟んだ部位の少なくとも２箇所での測定値の差は、ラットの全体脂肪の変化を反映している。

【０２１０】

（候補化合物により誘発される脂肪酸酸化の測定）

化合物はまた、脂肪酸代謝に対するそれらの効果について、アッセイできる。候補化合物の脂肪酸代謝に対する効果は、肝細胞の初代培養物での脂肪酸酸化を測定することにより、測定できる。肝細胞は、オレエートがケトン体および二酸化炭素に酸化する速度を決定するのに使用され得る。このような細胞は、Ｂｅｙｎｅｎら、ｉｎ　Ｄｉａｂｅｔｅｓ　２８：８２８（１９７９）で記述されているように、酵素消化により、成体ラットの肝臓から単離できる。細胞は、Ｇｕｚｍａｎ　＆　Ｇｅｅｌｅｎ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２８７：４８７（１９９２）で記述されているように、典型的には、懸濁液中にて培養され、そしてＫｒｅｂｓ－Ｈｅｎｓｅｌｅｉｔ’ｓ炭酸水素塩媒体（これは、ウシ血清アルブミンおよびグルコースを補充された）中でインキュベートされる。培養した細胞のタンパク質濃度が決定でき、細胞は、その反応混合物中に４～６ｍｇ／ｍｌのタンパク質が存在しているように、２ｍｌの培地で播種される。細胞は、１０μＭ　ＯＥＡの存在下または非存在下にて、３７℃で、［^{14}Ｃ］－オレイン酸（Ａｍｅｒｓｈａｍ）とともに、１０分間インキュベートでき、反応は、２００μｌの２Ｍ過塩素酸で停止され得、そして酸溶解性生成物は、クロロホルム／メタノール／水（５：１：１、容量：容量：容量）で抽出される。その水相が除去でき、もう２回洗浄できる。タンパク質の濃度は、Ｌｏｗｒｙアッセイで決定できる。オレエートがケトン体に変換される速度は、酸化されたオレエートのｎｍｏｌ数／時間／タンパク質１ｍｇとして表わされ得、そして液体シンチレーション計数を使用して、決定され得る。従って、ＯＥＡは、２１±６％だけ、オレエートの酸化を高める（ｎ＝４、スチューデントｔ検定による対照インキュベーションに対してｐ＜０．０１）。

【０２１１】

（実施例９：脂肪酸代謝に対するＯＥＡの効果）

オレイルエタノールアミン（ＯＥＡ）は、食欲を抑制することだけでなく、おそらく、体脂肪の異化を高めることにより、体重を減少させる。主要な体脂肪燃焼組織（ヒラメ筋、肝臓、培養した心筋細胞および星状細胞）での脂肪酸酸化に対するＯＥＡの効果を調べた。ＯＥＡは、肝臓、骨格筋（ヒラメ筋）および心臓細胞の初代培養物での脂肪酸酸化を有意に刺激するのに対して、脳に由来する星状細胞培養物では、効果がない。それに加えて、ＯＥＡは、一次白色脂肪組織細胞からのトリアシルグリセロール貯蔵の著しい固定化を誘発する。表４は、その方法およびこれらの細胞での脂肪酸酸化に対するＯＥＡの効果を詳述している。構造－活性関係の実験により、骨格筋脂肪酸酸化に対するＯＥＡの効果が特異的であるという証拠が得られる（図８）。それゆえ、ＯＥＡの効果は、加水分解耐性ホモログメチル－ＯＥＡにより、また、部分的にのみ、パルミチルエタノールアミド（ＰＥＡ）により模倣されるが、アラキドニルエタノールアミド（ＡＥＡ）またはオレイン酸（ＯＡ）によっては模倣されない。簡単に言えば、これらの結果から、脂質酸化および可動化がＯＥＡにより高められること、また、ＯＥＡの効果が末梢部位に制限されることが明らかになる。

【０２１２】

表４

【０２１３】

【表４】

表 4.

細胞／組織	肝細胞	ヒラメ筋	心筋細胞	星状細胞	脂肪細胞
起源	成体ラット肝臓	成体ラット後肢	新生ラット心臓	新生ラット脳皮質	成体ラット精巣上体
単離手順	酵素分解 (Beynen ら , 1979)	切開 (Chiasson, 1980)	酵素消化 (Flink ら , 1992)	酵素消化 (McCarthy & De Vellis, 1980)	酵素消化 (Rodbell, 1964)
培養の型	細胞懸濁液	組織懸濁液	細胞単層	細胞単層	細胞単層
インキュベーション培地	BSA および グルコース 添加 Krebs-Henseleit 炭酸水素塩 (Guzman & Geelen, 1992)	BSA および グルコース 添加 Krebs-Henseleit Hepes (Fruebis ら ., 2001)	BSA 添加 高グルコース DMEM (Wu ら ., 2000)	インシュリン、トランスフェリン、プロゲステロン、プトレシン、および 亜セレン酸塩 添加 Hams F12/DMEM (Blazquez ら , 1998)	BSA および グルコース 添加 Krebs-Henseleit Hepes (Rodbell, 1965)
代謝パラメータ	ケトン体 への [^{14}C]オレエート の酸化 (Guzman & Geelen, 1992)	CO_2 への [^{14}C]オレエート の酸化 (Fruebis ら , 2001)	CO_2 への [^{14}C]オレエート の酸化 (Blazquez ら , 1998)	ケトン体 への [^{14}C]オレエート の酸化 (Blazquez ら , 1998)	脂肪分解（グリセロール放出） (Serradeil-Le Gal ら , 2000)
インキュベーション時間（分）	10	30	30	30	30
10μM OEA の 刺激効果 (%)	21±6 (n=4)	36±10 (n=4)	37±9 (n=3)	2±6 (n=3)	38±16 (n=3)
対照に対する統計的有意性	P<0.01	P<0.01	P<0.01	有意性なし	P<0.01

引用した参考文献：Beynen ACら、Diabetes 28：828～835（1979）；Blazquez Cら、J Neurochem 71：1597～1606（1998）；Chiasson RB「Laboratory Anatomy of the White Rat」、WCB, Dubuque, Iowa（1980）；Funk ILら、J Biol Chem 267：9917～9924（1992）；Fruebis Jら、Proc Natl Acad Sci USA 98：2005～2010（2001）；Guzman Mら、Biochem J 287：487～492（1992）；McCarthy KDら、J Cell Biol 85：890～902（1980）；Rodbell M J Biol Chem 239：375～380（1964）；Rodbell M Ann NY Acad Sci 131：302～314（1965）；Serradeil～Le Gal Cら、FEBS Left 475：150～156（2000）；Wu Wら、J Biol Chem 275：40133～40119（2000）。

【0214】

（実施例１０：腸での内生ＯＥＡの役割）
腸のＯＥＡ生合成に対する給餌の影響を研究した。高速液体クロマトグラフィー／質量分析により、自由に餌を与えたラット由来の小腸組織は、相当な量のＯＥＡ（３５４±８６ｐｍｏｌ／ｇ、ｎ＝３）を含有していることが明らかとなった。腸のＯＥＡレベルは、食物欠乏後に著しく低下したが、再び餌を与えた後、ベースラインに戻った。対照的に、胃では、このような変化は、観察されなかった（ｐｍｏｌ／ｇ；対照、２１０±２０；絶食、２３８±８４；絶食／再給餌、２３９±６０、ｎ＝３）。腸でのＯＥＡレベルの変化は、脂肪酸アミド加水分解酵素活性（これは、ＯＥＡ加水分解を触媒する）ではなく、ＮＡＴ活性（これは、ＯＥＡ形成に関与している）での平行した変化を伴っていた。これらの発見は、絶食および給餌が小腸でのＯＥＡ生合成を相反的に調節することを示唆している。ＯＥＡの腹腔内源と一致して、絶食したラットでの血漿ＯＥＡレベルは、大静脈血中よりも門脈血中において、高くなることが分かった（ｐｍｏｌ／ｍｌ；門脈、１４．６±１．８；大静脈、１０．３±２．８；ｎ＝５）。ＯＥＡ形成に対する他の腹腔内組織の寄与は、現在、除外できない。これらの結果は、給餌挙動でのＯＥＡ系を利用する多くの介入を示唆している。このモデルによれば、食物摂取量は、小腸、および多分、他の腹腔内組織にて、ＯＥＡ生合成を高めるＮＡＴ活性を刺激し得る。新たに産生したＯＥＡは、局所感覚繊維を活性化し得、これは、次に、脳構造（例えば、ＮＳＴおよびＰＶＮ）を噛み合わせることにより、給餌を阻害し得る。

【０２１５】
本発明者らの結果から、給餌の末梢調節でのＯＥＡの予想外の役割が明らかとなり、体重または体脂肪を減らし、体重増加または体脂肪増加を防止し、食欲を抑制するか食物を求める行動を少なくし、または食物摂取量を減らし、そして摂食障害、太りすぎまたは肥満を治療する新しい医薬品を開発する枠組みを提供する。これらの医薬品には、ＯＥＡアナログおよびホモログだけでなく、上で開示したように、ＯＥＡの形成および加水分解の系および酵素に作用することによりＯＥＡのレベルを制御する薬剤が挙げられる。

【０２１６】
本明細書中で引用した全ての出版物および特許出願の内容は、各個々の出版物または特許出願の内容が具体的かつ個別に本明細書中で参考として援用されているように、本開示に矛盾しない範囲まで、本明細書中で参考として援用されている。

【０２１７】
前述の発明は、理解し易くする目的のために、説明および例として、ある程度詳細に記述されているものの、本発明の教示に照らして、添付の特許請求の範囲の精神および範囲から逸脱することなく、ある種の変更および改良を行い得ることは、当業者に容易に明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【０２１８】
【図１】ラットにおいて、絶食は、循環しているオレオイルエタノールアミドのレベルを高める：（ａ）血漿オレオイルエタノールアミド（オレオイルエタノールアミド、ＯＥＡ）レベルに対する食物欠乏の効果の時間経過；（ｂ）血漿オレオイルエタノールアミドレベルに対する水欠乏（１８時間）の効果；（ｃ）脳脊髄液（ＣＳＦ）でのオレオイルエタノールアミドレベルに対する食物欠乏（１８時間）の効果；血漿アナンダミド（アラキドニルエタノールアミド、ＡＥＡ）レベルに対する食物欠乏の効果の時間経過；（ｅ）アナンダミド血漿レベルに対する食物欠乏（１８時間）の効果；（ｆ）ＣＳＦにおけるアナンダミドレベルに対する食物欠乏（１８時間）の効果。結果は、平均±ｓ．ｅ．ｍ．として表わされる；星印、Ｐ＜０．０５；星印２個、Ｐ＜０．０１、ｎ＝１０匹／群。
【図２】脂肪組織は、オレオイルエタノールアミドを循環させる主要な供給源である：種々のラット組織におけるＮ－アシルトランスフェラーゼ（ＮＡＴ）および脂肪酸アミド加水分解酵素（ＦＡＡＨ）の絶食誘発変化。（ａ）脂肪；（ｂ）脳；（ｃ）肝臓；（ｄ）胃；（ｅ）小腸。白い棒、自由に餌を与えた動物；黒い棒、１８時間絶食した動物。活性は、ｐｍｏｌ／タンパク質１ｍｇ／分である。星印、Ｐ＜０．０５、ｎ＝３。

【図３】脂肪組織は、オレオイルエタノールアミドを循環させる主要な供給源である：脂肪組織および肝臓組織でのＮＡＰＥおよびオレオイルエタノールアミド（オレオイルエタノールアミド、ＯＥＡ）の絶食で誘発した変化。（ａ）アルク－１－パルミトエニル－２－アラキドニル－ｓｎ－グリセロ－ホスホエタノールアミン－Ｎ－オレイル（左パネル、ＮＡＰＥ１）およびアルク－１－パルミチル－２－アラキドニル－ｓｎ－グリセロ－ホスホエタノールアミン－Ｎ－オレイル（右パネル、ＮＡＰＥ２）；（ｂ）給餌したラット（上部）および１８時間絶食したラット（下部）でのＮＡＰＥ１（左パネル、ｍ／ｚ＝９８７、脱プロトン化した分子、［Ｍ－Ｈ］$^{-}$）およびＮＡＰＥ３（右パネル、ｍ／ｚ＝１００３、［Ｍ－Ｈ］$^{-}$）の選択したイオン特性の代表的なＨＰＬＣ／ＭＳ追跡；（ｃ）食物欠乏（１８時間）は、脂肪中のＮＡＰＥ種の含量を高め、そして肝臓中でのそれを低下させる。同定可能な全てのＮＡＰＥ種を定量したが、これには、オレオイルエタノールアミド前駆体であるＮＡＰＥ１およびＮＡＰＥ２、およびＰＥＡ前駆体であるＮＡＰＥ３が挙げられる；（ｄ）食物欠乏（１８時間）は、脂肪および肝臓中のオレオイルエタノールアミド含量を高める。白い棒、自由に餌を与えた動物；黒い棒、１８時間絶食した動物。星印、Ｐ＜０．０５、スチューデント試験；ｎ＝３。

【図４】オレオイルエタノールアミド／プラナミドは、食物摂取量を選択的に抑制する：（ａ）２４時間食物を絶ったラットにおける食物摂取量に対するオレオイルエタノールアミド（オレオイルエタノールアミド／ＯＥＡ／プラナミド）（腹腔内、白い四角）、エライジルエタノールアミド（白い丸）、ＰＥＡ（三角）、オレイン酸（黒い四角）およびアナンダミド（黒い丸）の用量依存性効果；（ｂ）食物摂取量に対するオレオイルエタノールアミド（２０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）（四角）またはビヒクル（菱形）の食細り効果の時間経過；（ｃ）条件付き味覚嫌悪アッセイでのビヒクル（Ｖ）、塩化リチウム（ＬｉＣｌ、０．４Ｍ、７．５ｍｌ／ｋｇ）またはオレオイルエタノールアミド（２０ｍｇ／ｋｇ）の効果。白い棒、水分摂取量；黒い棒、サッカリンの摂取。以下に対するビヒクル（Ｖ）またはオレオイルエタノールアミド（５または２０ｍｇ／ｋｇ）の効果：（ｄ）水分摂取量（４時間あたりのｍｌで表わす）；（ｅ）体温；（ｆ）ホットプレート鎮痛試験で跳ね上がる潜時；（ｇ）増大プラス迷路不安試験にてオープンアームで費やされた時間の割合；（ｈ）露地活動試験での横断の数；（ｉ）食物に対するオペラント応答の数。星印、Ｐ＜０．０５、ｎ＝８～１２匹／群。

【図５】食物摂取量および体重に対する準長期オレオイルエタノールアミド投与の効果：（ａ）累積的な食物摂取に対するオレオイルエタノールアミド（オレオイルエタノールアミド、ＯＥＡ）（５ｍｇ／ｋｇ、腹腔内、１日１回）（白い棒）またはビヒクル（無菌生理食塩水中の５％Ｔｗｅｅｎ　８０／５％プロピレングリコール；黒い棒）；（ｂ）体重変化に対するオレオイルエタノールアミド（三角）またはビヒクル（四角）の効果の時間経過；（ｃ）正味の体重変化に対するオレオイルエタノールアミドまたはビヒクルの効果；（ｄ）累積的な水分摂取量に対するオレオイルエタノールアミド（５ｍｇ／ｋｇ）またはビヒクルの効果。星印、Ｐ＜０．０５；２個の星印、Ｐ＜０．０１、ｎ＝１０匹／群。

【図６】オレオイルエタノールアミドで誘発した食欲不振における末梢感覚繊維の役割。（ａ）対照ラットおよび（ｃ）カプサイシン治療ラットでの食物摂取量に対するビヒクル（Ｖ）、オレオイルエタノールアミド（オレオイルエタノールアミド／プラナミド／ＯＥＡ）（５ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）、ＣＣＫ－８（１０μｇ／ｋｇ）およびＣＰ－９３１２９（１ｍｇ／ｋｇ）、中枢活性５－HT_{1B}レセプタアゴニストの効果。（ｂ）対照ラットおよび（ｄ）カプサイシン治療ラットでの水分摂取量。星印、Ｐ＜０．０５；ｎ＝８～１２匹／群。

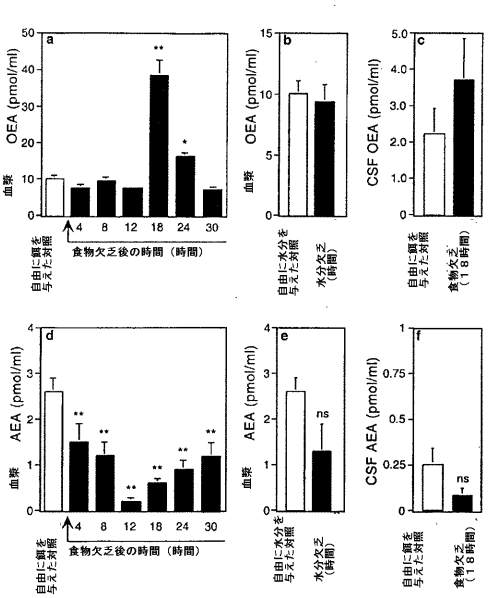
【図７】オレオイルエタノールアミド／プラナミドは、エネルギー恒常性および摂食挙動に関連した個別の脳領域において、ｃ－ｆｏｓ　ｍＲＮＡ発現を高める：（ａ）薄膜オートラジオグラフの偽色画像により、オレオイルエタノールアミド（右セクション）が、インサイツハイブリダイゼーションで評価されるように、脳室周囲（ＰＶＮ）および視索上部（ＳＯ）の視床下部核におけるｃ－ｆｏｓ　ｍＲＮＡ標識化の著しくかつ選択的な増加を誘発することが明らかである。ビヒクルで処理したラットに由来の代表的なセクション

は、左で示す。標識化密度は、色で示される：青色＜緑色＜黄色＜赤色。（ｂ）ビヒクル、オレオイルエタノールアミドおよびオレイン酸で処理したラットの前脳領域［ＰＶＮ、ＳＯ、アーチ形（Ａｒｃ）、層ＩＩ梨状皮質（ｐｉｒ）、腹外側核（ＶＩ）およびＳ１前肢皮質（Ｓ１ＦＬ）］におけるｃ－ｆｏｓ　ｃＲＮＡ標識化の定量；（ｃ）オレオイルエタノールアミドで処理したラットにおける孤束（ＮＳＴ）の核での高い^{35}Ｓ　ｃ－ｆｏｓ　ｍＲＮＡ発現を示す薄膜オートラジオグラム；ＮＳＴ（赤色で示す）での嵌め込んだｃ－ｆｏｓ　ｃＲＮＡ標識化は、隣接遠心性核（迷走神経の舌下および背側運動核）に対する局在化により同定され、これは、コリンアセチルトランスフェラーゼ（ＣｈＡＴ）ｍＲＮＡ（紫色で示す）を発現する；（ｄ）オレオイルエタノールアミドは、舌下核（ＨｇＮ）ではなく、ＮＳＴでのｃ－ｆｏｓ　ｍＲＮＡ発現を増加させる。２個の星印、Ｐ＜０．０００１、ｎ＝５匹／群。

【図８】ヒラメ筋における脂肪酸酸化に対するＯＥＡ、オレイン酸（ＯＡ）、ＡＥＡ、ＰＥＡおよびメチル－ＯＥＡの効果。

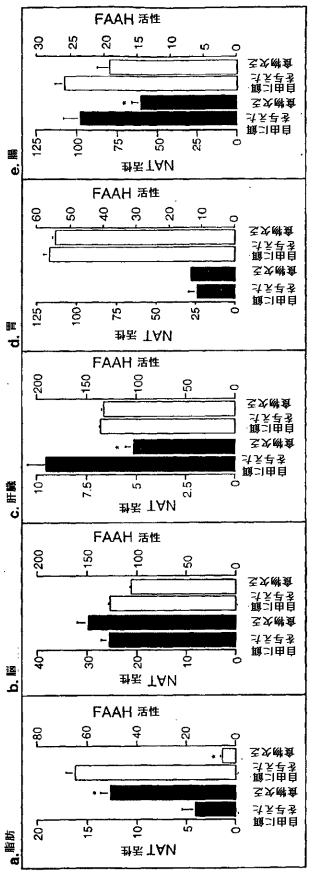
【図１】

Figure 1



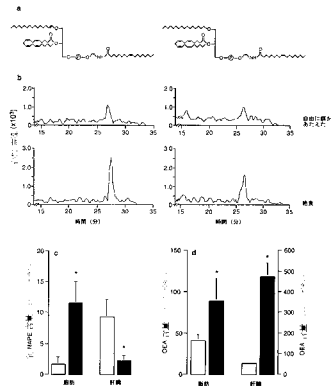
【図２】

Figure 2



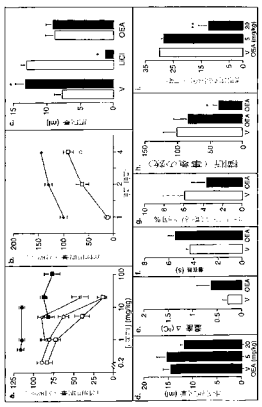
【図３】

Figure 3



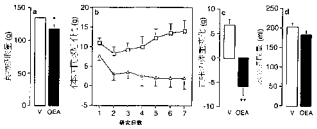
【図４】

Figure 4



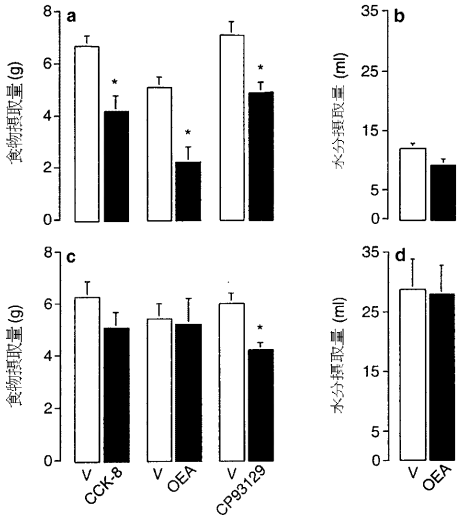
【図５】

Figure 5



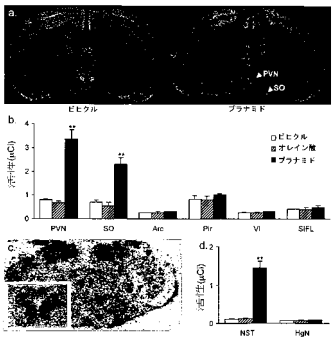
【図６】

Figure 6



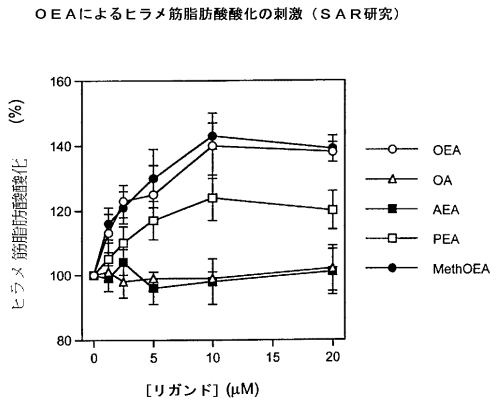
【図７】

Figure 7



【図８】

Figure 8


ＯＥＡによるヒラメ筋脂肪酸酸化の刺激（ＳＡＲ研究）
ヒラメ筋脂肪酸酸化 (%)
160
140
120
100
80
0
5
10
15
20
[リガンド] (μM)
OEA
OA
AEA
PEA
MethOEA

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/080860 A2

(51) International Patent Classification⁷: A61K

(21) International Application Number: PCT/US02/09773

(22) International Filing Date: 27 March 2002 (27.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/279,542 27 March 2001 (27.03.2001) US
60/336,289 31 October 2001 (31.10.2001) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; Office of Technology Transfer, 1111 Franklin St., 5th Floor, Oakland, CA 94607-5200 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: PIOMELLI, Daniele [IT/US]; 3 Valley View, Irvine, CA 92612 (US). DE FONSECA, Fernando, Rodriguez [ES/ES]; Madrid (ES).

(74) Agents: MYCROFT, Frank, J. et al.; TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP, Two Embarcadero Center, Eighth Floor, San Francisco, CA 94111 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

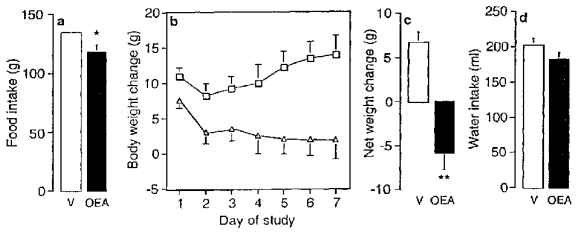
(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:
— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS, COMPOUNDS, AND COMPOSITIONS FOR REDUCING BODY FAT AND MODULATING FATTY ACID METABOLISM



(57) Abstract: Methods, pharmaceutical compositions, and compounds for reducing body weight, modulating body lipid metabolism, and reducing food intake in mammals are provided. The compounds of the invention include fatty acid ethanolamide compounds, homologues and analogs of which the prototype is the endogenous fatty acid ethanolamide, oleoylethanolamide.

WO 02/080860 A2

Methods, Compounds, and Compositions for Reducing Body Fat and Modulating Fatty Acid Metabolism

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[01] This application claims priority of U.S. Patent Application No. 60/336,289 filed October 31, 2001 and U.S. Patent Application U.S. Patent Application 60/279,542 filed March 27, 2001. The contents of which are each incorporated herein by reference.

STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER FEDERALLY SPONSORED RESEARCH AND DEVELOPMENT

[02] This invention was made with government support under Grant No. DA 12653, awarded by the National Institute of Health. The Government has certain rights in this invention.

FIELD OF THE INVENTION

[03] This invention relates to fatty acid ethanolamides, their homologues, and their analogs and to their use as pharmacologically active agents to reduce body fat, reduce food consumption, and modulate lipid metabolism.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[04] Obesity is a worldwide health challenge occuring at alarming levels in the United States and other developed nations. About 97 million adults in the United States are overweight. Of these 40 million are obese. Obesity and overweight greatly increase the risk of many diseases. Hypertension; type 2 diabetes; dyslipidemia; coronary heart disease; stroke; gallbladder disease; osteoarthritis; sleep apnea and other respiratory problems; and endometrial, breast, prostate, and colon cancers have been associated with higher body weights. Persons with higher body weights also suffer from a higher all-cause death rate.

According to the National Institutes of Health about 280,000 adult deaths in the United States each year may be attributed in part to obesity.

[05] Weight loss is desirable in the case of obesity and overweight individuals. Weight loss can help to prevent many of these harmful consequences, particularly with respect to diabetes and cardiovascular disease (CVD). Weight loss may also reduce blood pressure in both overweight hypertensive and non-hypertensive individuals; serum triglycerides levels and increases the beneficial high-density lipoprotein (HDL)-form of cholesterol. Weight loss also generally reduces somewhat the total serum cholesterol and low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels. Weight loss may also reduce blood glucose levels in overweight and obese persons.

[06] While weight loss is desirable, it is hard to achieve. Many treatments for the management of overweight and obesity and the maintenance of weight loss exist. However, recidivism is rampant. Approximately, 40 percent of women and 24 percent of men are trying to actively lose weight at any given time. These treatments include low-calorie diets and low-fat diets; increased physical exercise; behavioral therapies directed toward reducing food intake, pharmacotherapy; surgery; and combinations of the above.

[07] The pharmacopoea of weight loss is relatively bare. Drugs such as sibutramine, dexfenfluramine, orlistat, phenylpropanolamine, phenteramine, or fenfluramine can facilitate weight loss in obese adults when used for prolonged periods. In general, however, the safety of long-term administration of pharmaco-therapeutic weight loss agents is unknown. For instance, recently due to concerns about valvular heart disease observed in patients, fenfluramine and dexfenfluramine have been withdrawn from the market. In the face of the slim pharmacopoea and the high prevalence of obesity and overweight, there is a need for new pharmaceutical methods and compositions to promote and maintain weight loss.

[08] Fatty acid ethanolamides (FAE) are unusual components of animal and plant lipids, and their concentrations in non-stimulated cells are generally low (Bachur et al., *J. Biol. Chem.*, 240:1019-1024 (1965); Schmid et al., *Chem. Phys. Lipids*, 80:133-142 (1996); Chapman, K. D., *Chem. Phys. Lipids*, 108:22 1-229 (2000)). FAE biosynthesis can be rapidly enhanced, however, in response to a wide variety of physiological and pathological stimuli, including exposure to fungal pathogens in tobacco cells(Chapman et al., *Plant Physiol.*, 116:1163-1168 (1998)), activation of neurotransmitter receptors in rat brain neurons (Di Marzo et al., *Nature*, 372:686-691 (1994); Giuffrida et al., *Nat. Neurosci.*, 2:358-363 (1999)) and exposure to metabolic stressors in mouse epidermal cells (Berdyshev et al., *Biochem. J.*, 346:369-374 (2000)). The mechanism underlying stimulus-dependent FAE

generation in mammalian tissues is thought to involve two concerted biochemical reactions: cleavage of the membrane phospholipid, N-acyl phosphatidylethanolamine (NAPE), catalyzed by an unknown phospholipase D; and NAPE synthesis, catalyzed by a calcium ion- and cyclic AMP-regulated N-acyltransferase (NAT) activity (Di Marzo et al., *Nature*, 372:686-691 (1994); Cadas et al., *J. NeuroSci.*, 6:3934-3942 (1996); Cadas et al., H., *J. Neurosci.*, 17:1226-1242 (1997)).

[09] The fact that both plant and animal cells release FAEs in a stimulus-dependent manner suggests that these compounds may play important roles in cell-to-cell communication. Further support for this idea comes from the discovery that the polyunsaturated FAE, anandamide (arachidonylethanolamide), is an endogenous ligand for cannabinoid receptors (Devane et al., *Science*, 258:1946-1949 (1992)) – G protein-coupled receptors expressed in neurons and immune cells, which recognize the marijuana constituent Δ^9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 – THC) (for review, see reference (Pertwee, R. G., *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 9:1553-1571 (2000)).

[10] Two observations make it unlikely that other FAEs also participate in cannabinoid neurotransmission. The FAE family is comprised for the most part of saturated and monounsaturated species, such as palmitylethanolamide and oleoylethanolamide, which do not significantly interact with cannabinoid receptors (Devane et al., *Science*, 258:1946-1949 (1992); Griffin et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292:886-894. (2000)). Second, when the pharmacological properties of the FAEs have been investigated in some detail, as is the case with palmitylethanolamide, such properties have been found to differ from those of Δ^9-THC and to be independent of activation of known cannabinoid receptor subtypes(Calignano et al., *Nature*, 394:277-281 (1998)). Thus, the biological significance of the FAEs remains elusive.

[11] Oleoylethanolamide (OEA) is a natural analogue of the endogenous cannabinoid anandamide. Like anandamide, OEA is produced in cells in a stimulus-dependent manner and is rapidly eliminated by enzymatic hydrolysis, suggesting a role in cellular signaling . However, unlike anandamide, OEA does not activate cannabinoid receptors and its biological functions were here-to-fore essentially unknown.

[12] There is a need for additional methods and agents to treat obesity and overweight as well as to maintain weight loss. The present invention meets this need by providing novel methods and pharmaceutical compositions related to our instant discovery that oleoylethanolamide (OEA) and other fatty acid ethanolamide compounds (e.g., palmitylethanolamide, elaidylethanolamide))can reduce appetite, food intake, body weight, and body fat and alter fat metabolism.

SUMMARY OF THE INVENTION

[13] The present invention provides compounds, compositions, and methods for reducing body fat and for treating or preventing obesity, and overweight in mammals and the diseases associated with these health conditions. In one aspect, the invention provides methods for reducing body fat or body weight and for treating or preventing obesity or overweight and for reducing food intake by administration of pharmaceutical compositions comprising a fatty acid alkanolamide compound, homologue, or analog in an amount sufficient to reduce body fat, body weight or prevent body fat or body weight gain. In other aspects, the invention is drawn to the fatty acid ethanolamide compounds, homologues, analogs; and their pharmaceutical compositions and such methods of use.

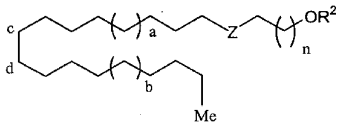
[14] In other embodiments, the fatty acid moiety of the fatty acid alkanolamide or ethanolamide compound, homologue, or analog may be saturated or unsaturated, and if unsaturated may be monounsaturated or polyunsaturated.

[15] In some embodiments, the fatty acid moiety of the fatty acid alkanolamide compound, homologue, or analog is a fatty acid selected from the group consisting of oleic acid, palmitic acid, elaidic acid, palmitoleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid, and gamma-linolenic acid.. In certain embodiments, the fatty acid moieties have from twelve to 20 carbon atoms.

[16] Other embodiments are provided by varying the hydroxyalkylamide moiety of the fatty acid amide compound, homologue or analog. These embodiments include the introduction of a substituted or unsubstituted lower (C_1-C_3) alkyl group on the hydroxyl group of an alkanolamide or ethanolamide moiety so as to form the corresponding lower alkyl ether. In another embodiment, the hydroxy group of the alknaolamide or ethanolamide moiety is bound to a carboxylate group of a C_2 to C_6 substituted or unsubstituted alkyl carboxylic acid to form the corresponding ester of the fatty acid ethanolamide. Such embodiments include fatty acid alkanolamide and fatty acid ethanolamides in ester linkage to organic carboxylic acids such as acetic acid, propionic acid, and butanoic acid. In one embodiment, the fatty acid alkanolamide is oleoylalkanolamide. In a further embodiment, the fatty acid alkanolamide is oleoylethanolamide.

[17] In still another embodiment, the fatty acid ethanolamide compound, homologue, or analog further comprises a substituted or unsubstituted lower alkyl (C_1-C_3) group covalently bound to the nitrogen atom of the fatty acid ethanolamide.

[18] In another aspect, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable excipient and a compound, or its pharmaceutically acceptable salt, having the formula:



(I).

[19] In this formula, n is from 0 to 5 and the sum of a and b can be from 0 to 4. Z is a member selected from –C(O)N(R^o)-; -(R^o)NC(O)-; -OC(O)-; -(O)CO-; O; NR^o; and S, in which R^o and R^2 are independently selected from the group consisting of unsubstituted or unsubstituted alkyl, hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_6 alkyl, substituted or unsubstituted lower (C_1-C_6) acyl, homoalkyl, and aryl. Up to four hydrogen atoms of either or both the fatty acid portion and ethanolamine portion of the compound may also be substituted by methyl or a double bond. In addition, the molecular bond between carbons c and d may be unsaturated or saturated. In some embodiments, the fatty acid ethanolamide of the above formula is a naturally occurring compound.

[20] In other aspects of the invention, the methods and compositions employ fatty acid ethanolamide and fatty acid alkanolamide compounds, homologs and analogs for reducing body weight in which the compounds, homologs and analogs cause weight loss when administered to test animals (e.g., rats, mice, rabbits, hamsters, guinea pigs).

[21] In still other aspects, the invention is drawn to methods of using arylthiazolidinedione compounds and heteroaryl and aryl oxyacetic acid type compounds to reduce body fat, body weight and appetite.

[22] Still other aspects of the invention address methods of using and administering the subject compounds and compositions for reducing body weight or reducing appetite or reducing food intake or causing hypophagia in mammals (e.g., humans, cats or dogs). The subject compositions may be administered by a variety of routes, including orally.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[23] Fig.1. Starvation increases circulating oleoylethanolamide levels in rats: (a) time course of the effects of food deprivation on plasma oleoylethanolamide (oleylethaolamide, OEA) levels; (b) effect of water deprivation (18 h) on plasma oleoylethanolamide levels; (c)

effect of food deprivation (18 h) on oleoylethanolamide levels in cerebrospinal fluid (CSF); (d) time course of the effects of food deprivation on plasma anandamide (arachidonylethanolamide, AEA) levels; (e) effect of water deprivation (18 h) on anandamide plasma levels; (f) effect of food deprivation (18 h) on anandamide levels in CSF. Results are expressed as mean ± s.e.m.; asterisk, $P < 0.05$; two asterisks, $P < 0.01$, $n = 10$ per group.

[24] Fig. 2. Adipose tissue is a primary source of circulating oleoylethanolamide: starvation-induced changes in N-acyltransferase (NAT) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) activities in various rat tissues. (a) fat; (b) brain; (c) liver; (d) stomach; (e) small intestine. Empty bars, free-feeding animals; filled bars, 18-h fasted animals. Activities are in pmol/mg protein/min. Asterisk, $P < 0.05$, $n = 3$.

[25] Fig. 3. Adipose tissue is a primary source of circulating oleoylethanolamide: starvation-induced changes in NAPE and oleoylethanolamide (oleoylethanolamide, OEA) content in adipose and liver tissues. (a) structures of the oleoylethanolamide precursors alk-1-palmitoenyl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamine-N-oleyl (left panel, NAPE 1) and alk-1-palmityl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamine-N-oleyl (right panel, NAPE 2); (b) representative HPLC/MS tracings for selected ions characteristic of NAPE 1 (left panel, $m/z = 987$, deprotonated molecule, $[M - H]^-$) and NAPE 2 (right panel, $m/z = 1003$, $[M - H]^-$) in free-feeding (top) and 18-h fasting rats (bottom); (c) food deprivation (18 h) increases the content of NAPE species in fat and decreases it in liver. All identifiable NAPE species were quantified, including the oleoylethanolamide precursors NAPE1 and NAPE 2, and the PEA precursor NAPE 3; (d) food deprivation (18 h) increases oleoylethanolamide content in fat and liver. Empty bars, free-feeding animals; filled bars, 18-h fasted animals. Asterisk, $P < 0.05$, Student's t test; $n = 3$.

[26] Fig. 4. Oleoylethanolamide/pranamide selectively suppresses food intake: (a) dose-dependent effects of oleoylethanolamide (oleoylethanolamide/OEA/pranamide) (i.p., empty squares), elaidylethanolamide (empty circles), PEA (triangles), oleic acid (filled squares) and anandamide (filled circles) on food intake in 24-h food-deprived rats. Vehicle alone (70% DMSO in saline, 1 ml per kg, i.p.) had no significant effect on acute food intake; (b) time course of the hypophagic effects of oleoylethanolamide (20 mg per kg, i.p.) (squares) or vehicle (lozenges) on food intake. (c) effects of vehicle (V), lithium chloride (LiCl, 0.4 M, 7.5 ml per kg) or oleoylethanolamide (20 mg per kg) in a conditioned taste aversion assay.

Empty bars, water intake; filled bars, saccharin intake. Effects of vehicle (V) or oleoylethanolamide (5 or 20 mg per kg) on: (d) water intake (expressed in ml per 4 h); (e) body temperature; (f) latency to jump in the hot plate analgesia test; (g) percent time spent in open arms in the elevated plus maze anxiety test; (h) number of crossings in the open field activity test; (i) number of operant responses for food. Asterisk, $P < 0.05$, n = 8-12 per group.

6

[27] Fig. 5. Effects of subchronic oleoylethanolamide administration on food intake and body weight: (a) effects of oleoylethanolamide (oleoylethanolamide, OEA) (5 mg per kg, i.p. once a day) (empty bars) or vehicle (5% Tween 80/5% propyleneglycol in sterile saline; filled bars) on cumulative food intake; (b) time course of the effects of oleoylethanolamide (triangles) or vehicle (squares) on body weight change; (c) effects of oleoylethanolamide or
12 vehicle on net body weight change; (d) effects of oleoylethanolamide (5 mg per kg) or vehicle on cumulative water intake. Asterisk, $P < 0.05$; two asterisks, $P < 0.01$, n = 10 per group.

[28] Fig. 6. Role of peripheral sensory fibers in oleoylethanolamide-induced anorexia. Effects of vehicle (V), oleoylethanolamide (oleoylethanolamide/pranamide/OEA) (5 mg per
18 kg, i.p.), CCK-8 (10 μg per kg) and CP-93129 (1 mg per kg), a centrally active 5-HT_{1B} receptor agonist, on food intake in a, control rats and c, capsaicin-treated rats. Water intake in (b) control rats and (d) capsaicin-treated rats. Asterisk, $P < 0.05$; n = 8-12 per group.

[29] Fig. 7. Oleoylethanolamide/pranamide increases c-*fos* mRNA expression in discrete brain regions associated with energy homeostasis and feeding behavior: (a) pseudocolor
24 images of film autoradiographs show that oleoylethanolamide (right section) elicits a striking and selective increase in c-*fos* mRNA labeling in the paraventricular (PVN) and supraoptic (SO) hypothalamic nuclei, as assessed by *in situ* hybridization. A representative section from a vehicle-treated rat is shown at left. Labeling densities are indicated by color: blue<green<yellow<red. (b) quantification of c-*fos* cRNA labeling in forebrain regions [PVN, SO, arcuate (Arc), layer II piriform cortex (pir), ventrolateral thalamas (VI) and S1
30 forelimb cortex (S1FL)] of rats treated with vehicle, oleoylethanolamide and oleic acid; (c) film autoradiogram showing elevated ^{35}S c-*fos* mRNA expression in the nucleus of the solitary tract (NST) in an oleoylethanolamide-treated rat; Inset, c-*fos* cRNA labeling in the NST (shown in red) was identified by its localization relative to adjacent efferent nuclei (hypoglossal and dorsal motor nucleus of the vagus), which express choline acetyl transferase

(ChAT) mRNA (shown in purple); (d) oleoylethanolamide increases c-*fos* mRNA expression in NST but not in the hypoglossal nucleus (HgN). Two asterisks, $P < 0.0001$, $n = 5$ per group.

[30] Fig. 8. The effects of OEA, Oleic acid (OA), AEA, PEA, and methyl-OEA on fatty acid oxidation in soleus muscle.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[31] This invention relates to the surprising discovery that OEA and other fatty acid alkanolamide compounds act to reduce food intake, body weight, and body fat and to modulate fatty acid oxidation. It has been surprisingly discovered that oleoylethanolamide (OEA), a natural lipid of heretofore unknown biological function in mammals, is a potent body fat reducing and weight control compound when administered to test animals. U.S. Patent Application 60/279,542, filed March 27, 2001, and assigned to the same assignee and herein incorporated by reference in its entirety discloses OEA and OEA-like compounds as agents which can reduce body fat and appetite in mammals.

[32] Upon the discovery of the prototype OEA, other fatty acid alkanolamide compounds and homologs were also found to be active.

[33] OEA can serve as a model in the development of other fatty acid alkanolamide-like fat reducing compounds for treating obesity, inducing weight loss, reducing appetite, or food intake. This invention provides such other compounds as disclosed below.

[34] The discovery that OEA adminstration acts to reduce appetite, food intake, and body weight can be used to identify other fatty acid ethanolamides, homologues, and analogs as weight and appetite control agents. This invention provides such agents.

Definitions

[35] The abbreviations used herein have their conventional meaning within the chemical and biological arts.

[36] Where substituent groups are specified by their conventional chemical formulae, written from left to right, they equally encompass the chemically identical substituents which would result from writing the structure from right to left, e.g., $-CH_2O-$ is intended to also recite $-OCH_2-$.

[37] The term "composition", as in pharmaceutical composition, is intended to encompass a product comprising the active ingredient(s), and the inert ingredient(s) that make up the

carrier, as well as any product which results, directly or indirectly, from combination, complexation or aggregation of any two or more of the ingredients, or from dissociation of one or more of the ingredients, or from other types of reactions or interactions of one or more of the ingredients. Accordingly, the pharmaceutical compositions of the present invention encompass any composition made by admixing a compound of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier. The term "pharmaceutical composition" indicates a composition suitable for pharmaceutical use in a subject, including an animal or human. A pharmaceutical composition generally comprises an effective amount of an active agent and a pharmaceutically acceptable carrier.

[38] Compounds of the invention may contain one or more asymmetric centers and can thus occur as racemates and racemic mixtures, single enantiomers, diastereomeric mixtures and individual diastereomers. The present invention is meant to comprehend all such isomeric forms of the inventive compounds.

[39] Some of the compounds described herein contain olefinic double bonds, and unless specified otherwise, are meant to include both E and Z geometric isomers.

[40] Some of the compounds described herein may exist with different points of attachment of hydrogen, referred to as tautomers. Such an example may be a ketone and its enol form known as keto-enol tautomers. The individual tautomers as well as mixture thereof are encompassed by the inventive formulas.

[41] Compounds of the invention include the diastereoisomers of pairs of enantiomers. Diastereomers for example, can be obtained by fractional crystallization from a suitable solvent, for example methanol or ethyl acetate or a mixture thereof. The pair of enantiomers thus obtained may be separated into individual stereoisomers by conventional means, for example by the use of an optically active acid as a resolving agent.

[42] Alternatively, any enantiomer of an inventive compound may be obtained by stereospecific synthesis using optically pure starting materials or reagents of known configuration

[43] As used herein, the term "heteroatom" is meant to include oxygen (O), nitrogen (N), sulfur (S) and silicon (Si).

[44] "Alkanol," as used herein refers to a saturated or unsaturated, substituted or unsubstituted, branched or unbranched alkyl group having a hydroxyl substituent, or a substituent derivable from a hydroxyl moiety, e.g,. ether, ester. The alkanol is preferably also substituted with a nitrogen-, sulfur-, or oxygen-bearing substituent that is included in bond Z (Formula I), between the "fatty acid" and the alkanol.

[45] "Fatty acid," as used herein, refers to a saturated or unsaturated substituted or unsubstituted, branched or unbranched alkyl group having a carboxyl substituent. Preferred fatty acids are C_4-C_{22} acids. Fatty acid also encompasses species in which the carboxyl substituent is replaced with a $-CH_2-$ moiety.

[46] The term "alkyl," by itself or as part of another substituent, means, unless otherwise stated, a straight or branched chain, or cyclic hydrocarbon radical, or combination thereof, which may be fully saturated, mono- or polyunsaturated and can include di- and multivalent radicals, having the number of carbon atoms designated (*i.e.* C_1-C_{10} means one to ten carbons). Examples of saturated hydrocarbon radicals include, but are not limited to, groups such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, t-butyl, isobutyl, sec-butyl, cyclohexyl, (cyclohexyl)methyl, cyclopropylmethyl, homologs and isomers of, for example, n-pentyl, n-hexyl, n-heptyl, n-octyl, and the like. An unsaturated alkyl group is one having one or more double bonds or triple bonds. Examples of unsaturated alkyl groups include, but are not limited to, vinyl, 2-propenyl, crotyl, 2-isopentenyl, 2-(butadienyl), 2,4-pentadienyl, 3-(1,4-pentadienyl), ethynyl, 1- and 3-propynyl, 3-butynyl, and the higher homologs and isomers. The term "alkyl," unless otherwise noted, is also meant to include those derivatives of alkyl defined in more detail below, such as "heteroalkyl." Alkyl groups which are limited to hydrocarbon groups are termed "homoalkyl".

[47] The term "alkylene" by itself or as part of another substituent means a divalent radical derived from an alkane, as exemplified, but not limited, by $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, and further includes those groups described below as "heteroalkylene." Typically, an alkyl (or alkylene) group will have from 1 to 24 carbon atoms, with those groups having 10 or fewer carbon atoms being preferred in the present invention. A "lower alkyl" or "lower alkylene" is a shorter chain alkyl or alkylene group, generally having eight or fewer carbon atoms.

[48] The terms "alkoxy," "alkylamino" and "alkylthio" (or thioalkoxy) are used in their conventional sense, and refer to those alkyl groups attached to the remainder of the molecule via an oxygen atom, an amino group, or a sulfur atom, respectively.

[49] The term "heteroalkyl," by itself or in combination with another term, means, unless otherwise stated, a stable straight or branched chain, or cyclic hydrocarbon radical, or combinations thereof, consisting of the stated number of carbon atoms and at least one heteroatom selected from the group consisting of O, N, Si and S, and wherein the nitrogen and sulfur atoms may optionally be oxidized and the nitrogen heteroatom may optionally be quaternized. The heteroatom(s) O, N and S and Si may be placed at any interior position of the heteroalkyl group or at the position at which the alkyl group is attached to the remainder

of the molecule. Examples include, but are not limited to, $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2,-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$, and $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$. Up to two heteroatoms may be consecutive, such as, for example, $-CH_2-NH-OCH_3$ and $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$. Similarly, the term "heteroalkylene" by itself or as part of another substituent means a divalent radical derived from heteroalkyl, as exemplified, but not limited by, $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ and $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$. For heteroalkylene groups, heteroatoms can also occupy either or both of the chain termini (*e.g.,* alkyleneoxy, alkylenedioxy, alkyleneamino, alkylenediamino, and the like). Still further, for alkylene and heteroalkylene linking groups, no orientation of the linking group is implied by the direction in which the formula of the linking group is written. For example, the formula $-C(O)_2R'-$ represents both $-C(O)_2R'-$ and $-R'C(O)_2-$.

[50] The terms "cycloalkyl" and "heterocycloalkyl", by themselves or in combination with other terms, represent, unless otherwise stated, cyclic versions of "alkyl" and "heteroalkyl", respectively. Additionally, for heterocycloalkyl, a heteroatom can occupy the position at which the heterocycle is attached to the remainder of the molecule. Examples of cycloalkyl include, but are not limited to, cyclopentyl, cyclohexyl, 1-cyclohexenyl, 3-cyclohexenyl, cycloheptyl, and the like. Examples of heterocycloalkyl include, but are not limited to, 1 – (1,2,5,6-tetrahydropyridyl), 1-piperidinyl, 2-piperidinyl, 3-piperidinyl, 4-morpholinyl, 3-morpholinyl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydrofuran-3-yl, tetrahydrothien-2-yl, tetrahydrothien-3-yl, 1 –piperazinyl, 2-piperazinyl, and the like.

[51] The terms "halo" or "halogen," by themselves or as part of another substituent, mean, unless otherwise stated, a fluorine, chlorine, bromine, or iodine atom. Additionally, terms such as "haloalkyl," are meant to include monohaloalkyl and polyhaloalkyl. For example, the term "halo(C_1-C_4)alkyl" is mean to include, but not be limited to, trifluoromethyl, 2,2,2-trifluoroethyl, 4-chlorobutyl, 3-bromopropyl, and the like.

[52] The term "aryl" means, unless otherwise stated, a polyunsaturated, aromatic, hydrocarbon substituent which can be a single ring or multiple rings (preferably from 1 to 3 rings) which are fused together or linked covalently. The term "heteroaryl" refers to aryl groups (or rings) that contain from one to four heteroatoms selected from N, O, and S, wherein the nitrogen and sulfur atoms are optionally oxidized, and the nitrogen atom(s) are optionally quaternized. A heteroaryl group can be attached to the remainder of the molecule through a heteroatom. Non-limiting examples of aryl and heteroaryl groups include phenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl, 4-biphenyl, 1-pyrrolyl, 2-pyrrolyl, 3-pyrrolyl, 3-pyrazolyl, 2-

imidazolyl, 4-imidazolyl, pyrazinyl, 2-oxazolyl, 4-oxazolyl, 2-phenyl-4-oxazolyl, 5-oxazolyl, 3-isoxazolyl, 4-isoxazolyl, 5-isoxazolyl, 2-thiazolyl, 4-thiazolyl, 5-thiazolyl, 2-furyl, 3-furyl, 2-thienyl, 3-thienyl, 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, 2-pyrimidyl, 4-pyrimidyl, 5-benzothiazolyl, purinyl, 2-benzimidazolyl, 5-indolyl, 1-isoquinolyl, 5-isoquinolyl, 2-quinoxalinyl, 5-quinoxalinyl, 3-quinolyl, and 6-quinolyl. Substituents for each of the above noted aryl and heteroaryl ring systems are selected from the group of acceptable substituents described below.

[53] For brevity, the term "aryl" includes both aryl and heteroaryl rings as defined above. Thus, the term "arylalkyl" is meant to include those radicals in which an aryl group is attached to an alkyl group (*e.g.*, benzyl, phenethyl, pyridylmethyl and the like) including those alkyl groups in which a carbon atom (*e.g.*, a methylene group) has been replaced by, for example, an oxygen atom (*e.g.*, phenoxymethyl, 2-pyridyloxymethyl, 3-(1-naphthyloxy)propyl, and the like).

[54] Each of the above terms (*e.g.*, "alkyl," "heteroalkyl," "aryl" and "heteroaryl") are meant to include both substituted and unsubstituted forms of the indicated radical. Preferred substituents for each type of radical are provided below.

[55] Substituents for the alkyl and heteroalkyl radicals (including those groups often referred to as alkylene, alkenyl, heteroalkylene, heteroalkenyl, alkynyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, cycloalkenyl, and heterocycloalkenyl) can be one or more of a variety of groups selected from, but not limited to: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halogen, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO_2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R"', -NR"$C(O)_2$R', -NR-C(NR'R"R"')=NR"", -NR-C(NR'R")=NR"', -S(O)R', -$S(O)_2$R', -$S(O)_2$NR'R", -$NRSO_2$R', -CN and $-NO_2$ in a number ranging from zero to (2m'+1), where m' is the total number of carbon atoms in such radical. R', R", R"' and R"" each preferably independently refer to hydrogen, substituted or unsubstituted heteroalkyl, substituted or unsubstituted aryl, e.g., aryl substituted with 1-3 halogens, substituted or unsubstituted alkyl, alkoxy or thioalkoxy groups, or arylalkyl groups. When a compound of the invention includes more than one R group, for example, each of the R groups is independently selected as are each R', R", R"' and R"" groups when more than one of these groups is present. When R' and R" are attached to the same nitrogen atom, they can be combined with the nitrogen atom to form a 5-, 6-, or 7-membered ring. For example, -NR'R" is meant to include, but not be limited to, 1-pyrrolidinyl and 4-morpholinyl. From the above discussion of substituents, one of skill in the art will understand that the term "alkyl" is meant to include groups including carbon atoms bound to groups other than hydrogen groups, such

as haloalkyl (*e.g.*, -CF_3 and –CH_2CF_3) and acyl (*e.g.*, -C(O)CH_3, -C(O)CF_3, -C(O)CH_2OCH_3, and the like).

[56] Similar to the substituents described for the alkyl radical, substituents for the aryl and heteroaryl groups are varied and are selected from, for example: halogen, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halogen, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO_2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R"', -NR"$C(O)_2$R', -NR-C(NR'R"R"')=NR"", -NR-C(NR'R")=NR"', -S(O)R', -$S(O)_2$R', -$S(O)_2$NR'R", -$NRSO_2$R', -CN and –NO_2, -R', -N_3, -$CH(Ph)_2$, fluoro(C_1-C_4)alkoxy, and fluoro(C_1-C_4)alkyl, in a number ranging from zero to the total number of open valences on the aromatic ring system; and where R', R", R"' and R"" are preferably independently selected from hydrogen, (C_1-C_8)alkyl and heteroalkyl, unsubstituted aryl and heteroaryl, (unsubstituted aryl)-(C_1-C_4)alkyl, and (unsubstituted aryl)oxy-(C_1-C_4)alkyl. When a compound of the invention includes more than one R group, for example, each of the R groups is independently selected as are each R', R", R"' and R"" groups when more than one of these groups is present.

[57] The term "body fat reduction" means loss of a portion of body fat.

[58] The formula for Body Mass Index (BMI) is [Weight in pounds ÷ Height in inches ÷ Height in inches] x 703. BMI cutpoints for human adults are one fixed number, regardless of age or sex, using the following guidelines: Overweight human adults individuals have a BMI of 25.0 to 29.9. Obese human adults have a BMI of 30.0 or more. Underweight adults have a BMI less of than 18.5. A nomal body weight range for an adult is defined as a BMI between 18.5 and 25. BMI cutpoints for children under 16 are defined according to percentiles: Overweight is defined as a BMI for age greater than ≥85th percentile and obesity is defined as a BMI-for-age ≥95th percentile. Underweight is a BMI-for-age <5th percentile. A normal body weight range for a child is defined as a BMI above the 5th percentile and below the 85 percentile.

[59] The term "fatty acid oxidation" relates to the conversion of fatty acids (e.g., oleate) into ketone bodies.

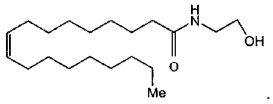
[60] The term "hepatocytes" refers to cells originally derived from liver tissue. Hepatocytes may be freshly isolated from liver tissue or established cell lines.

[61] The term "modulate" means to induce any change including increasing or decreasing. (e.g., a modulator of fatty acid oxidation increases or decreases the rate of fatty oxidation.

[62] The term "muscle cells" refers to cells derived from the predominant cells of muscle tissue. Muscle cells may be freshly isolated from muscle tissue or established cell lines.

[63] The term "obese" indicates a body weight 20% over ideal body weight as measured by body mass index

[64] Oleoylethanolamide (OEA) refers to a natural lipid of the following structure:

[65] 

[66] In the formulas herein, "Me" represents the methyl group.

[67] The term "weight loss" refers to loss of a portion of total body weight.

[68] The term "pharmaceutically acceptable carrier" encompasses any of the standard pharmaceutical carriers, buffers and excipients, including phosphate-buffered saline solution, water, and emulsions (such as an oil/water or water/oil emulsion), and various types of wetting agents and/or adjuvants. Suitable pharmaceutical carriers and their formulations are described in REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., Easton, 19th ed. 1995). Preferred pharmaceutical carriers depend upon the intended mode of administration of the active agent. Typical modes of administration are described below.

[69] The term "effective amount" means a dosage sufficient to produce a desired result. The desired result may comprise a subjective or objective improvement in the recipient of the dosage. A subjective improvement may be decreased appetite or craving for food. An objective improvement may be decreased body weight, body fat, or food, decreased food consumption, or decreased food seeking behavior.

[70] A "prophylactic treatment" is a treatment administered to a subject who does not exhibit signs of a disease or exhibits only early signs of a disease, wherein treatment is administered for the purpose of decreasing the risk of developing a pathology associated with increased body weight or body fat. The compounds of the invention may be given as a prophylactic treatment to prevent undesirable or unwanted weight gain.

[71] A "therapeutic treatment" is a treatment administered to a subject who exhibits signs of pathology, wherein treatment is administered for the purpose of diminishing or eliminating those pathological signs.

[72] The term "to control weight" encompasses the loss of body mass or the reduction of weight gain over time.

[73] The methods, compounds and compositions of the present invention are generally useful for reducing or controlling body fat and body weight in mammals. For instance, the methods, compositions, and compounds of the present invention are helpful in reducing

appetite or inducing hypophagia in mammals. The methods, compounds, and compositions are also useful in preventing or mitigating the diseases associated with overweight or obesity by promoting the loss of body fat and body weight.

[74] The methods, compositions, and compounds of the present invention include modulators of lipid metabolism, and particularly, fat and fatty acid catabolism.

6

COMPOUNDS OF THE INVENTION

[75] Certain compounds of the present invention may possess asymmetric carbon atoms (optical centers) or double bonds; the racemates, diastereomers, geometric isomers and individual isomers are all intended to be encompassed within the scope of the present invention.

12 [76] Such compounds of the invention may be separated into diastereoisomeric pairs of enantiomers by, for example, fractional crystallization from a suitable solvent, for example methanol or ethyl acetate or a mixture thereof. The pair of enantiomers thus obtained may be separated into individual stereoisomers by conventional means, for example by the use of an optically active acid as a resolving agent.

[77] Alternatively, any enantiomer of such a compound of the invention may be obtained

18 by stereospecific synthesis using optically pure starting materials of known configuration.

[78] The compounds of the present invention may have unnatural ratios of atomic isotopes at one or more of their atoms. For example, the compounds may be radiolabeled with isotopes, such as tritium or carbon-14. All isotopic variations of the compounds of the present invention, whether radioactive or not, are within the scope of the present invention.

[79] The instant compounds may be isolated in the form of their pharmaceutically

24 acceptable acid addition salts, such as the salts derived from using inorganic and organic acids. Such acids may include hydrochloric, nitric, sulfuric, phosphoric, formic, acetic, trifluoroacetic, propionic, maleic, succinic, malonic and the like. In addition, certain compounds containing an acidic function can be in the form of their inorganic salt in which the counterion can be selected from sodium, potassium, lithium, calcium, magnesium and the like, as well as from organic bases. The term "pharmaceutically acceptable salts" refers to

30 salts prepared from pharmaceutically acceptable non-toxic bases or acids including inorganic bases or acids and organic bases or acids.

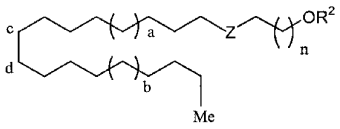
[80] The invention also encompasses prodrugs of the present compounds, which on administration undergo chemical conversion by metabolic processes before becoming active pharmacological substances. In general, such prodrugs will be derivatives of the present

compounds that are readily convertible in vivo into a functional compound of the invention. Conventional procedures for the selection and preparation of suitable prodrug derivatives are described, for example, in "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985. The invention also encompasses active metabolites of the present compounds.

A. Fatty acid alkanolamide compounds, homologs, and analogs.

[81] Compounds of the invention include body fat reducing fatty acid alkanolamide compounds, including the fatty acid ethanolamide compounds, and their homologues and certain analogs of the fatty acid alkanolamides. Such compounds may be identified and defined in terms of either an ability to cause reduced appetite, food intake, and/or body weight or body fat upon administration to test animals *in vivo*.

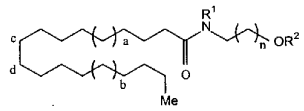
[82] A variety of such fatty acid alkanolamides, homologs and analogs are therefore contemplated. Compounds of the invention include compounds of the following general formula:



(I).

[83] In this formula, n is from 0 to 5 and the sum of a and b can be from 0 to 4. Z is a member selected from –C(O)N(R^o)-; -(R^o)NC(O)-; -OC(O)-; -(O)CO-; O; NR^o; and S, in which R^o and R^2 are independently selected from the group consisting of unsubstituted or unsubstituted alkyl, hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_6 alkyl, substituted or unsubstituted lower (C_1-C_6) acyl, homoalkyl, and aryl. Up to four hydrogen atoms of either or both the fatty acid portion and alkanolamine (e.g. ethanolamine) portion of the compound may also be substituted by methyl or a double bond. In addition, the molecular bond between carbons c and d may be unsaturated or saturated. In some embodiments, the fatty acid ethanolamide of the above formula is a naturally occurring compound.

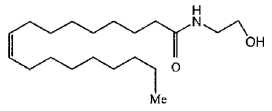
[84] Compounds of the invention also include compounds of the following formula:



(Ia).

[85] In one embodiment, the compounds of Formula Ia have n from 0 to 5; and a sum of a and b that is from 0 to 4; and members R^1 and R^2 independently selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_6 alkyl, lower substituted or unsubstituted (C_1-C_6) acyl, homoalkyl, and substituted or unsubstituted aryl. In this embodiment, up to four hydrogen atoms of the fatty acid portion and alkanolamine (e.g., ethanolamine) portion of compounds of the above formula may also be substituted by methyl or a double bond. In addition, the molecular bond between carbons c and d may be unsaturated or saturated. In some embodiments with acyl groups, the acyl groups may be the propionic, acetic, or butyric acids and attached via an ester linkage as R^2 or an amide linkage as R^1.

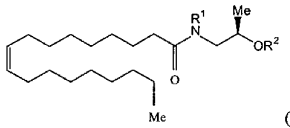
[86] In another embodiment, the above compounds particularly include those in which the fatty acid moiety comprises oleic acid, elaidic acid, or palmitic acid. Such compounds include oleoylethanolamide, elaidylethanolamide and palmitylethanolamide.



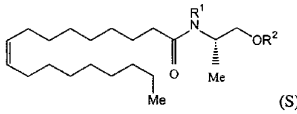
Oleylethanolamide (Ia)

[87] In another embodiment, the compounds of Formula Ia have n from 1 to 3; and a sum of a and b that is from 1 to 3; and members R^1 and R^2 independently selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_6 alkyl, and lower substituted or unsubstituted (C_1-C_6) acyl. In this embodiment, up to four hydrogen atoms of the fatty acid portion and alkanolamine (e.g., ethanolamine) portion of compounds of the above formula may also be substituted by methyl or a double bond. In addition, the molecular bond between carbons c and d may be unsaturated or saturated. In a further embodiment, the molecular bond between carbons c and d is unsaturated and no other hydrogen atoms are substituted. In a still further embodiment thereof, the members R^1 and R^2 are independently selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_3 alkyl, and substituted or unsubstituted lower (C_1-C_3) acyl.

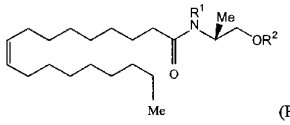
[88] Exemplary compounds provide mono-methyl substituted compounds, including ethanolamides, of Formula Ia. Such compounds include:



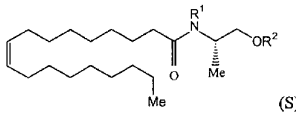
(R)1'-methyl



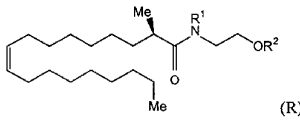
(S)1'-methyl



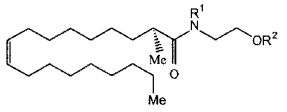
(R)2'-methyl



(S)2'-methyl



(R)1-methyl



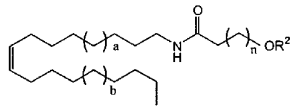
(S)1-methyl.

[89] The methyl substituted compounds of the above formula include particularly those compounds where R^1 and R^2 are both H: (R)1'-methyloleoylethanolamide, S(1')-methyloleoylethanolamide, (R)2'-methyloleoylethanolamide, (S)2'-

methyloleoylethanolamide, (R)1-methyloleoylethanolamide, and (S)1-methyloleoylethanolamide.

Reverse OEA-like compounds.

[90] Compounds of the invention also include a variety of analogs of OEA. These compounds include reverse OEA compounds of the general formula:

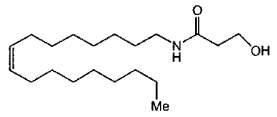


(II).

[91] In some embodiments, the invention provides compounds of Formula II. Exemplary the compounds of Formula II have n from 1 to 5, and a sum of a and b from 0 to 4. In this embodiment, the member R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_6 alkyl, substituted or unsubstituted lower (C_1-C_6) acyl, homoalkyl, and aryl. In addition, up to four hydrogen atoms of either or both the fatty acid portion and alkanolamine (e.g., ethanolamine) portion of compounds of the above formula may also be substituted by methyl or a double bond.

[92] Exemplary compounds of formula II include those compounds where the alkanolamine portion is ethanolamine, compounds where R^2 is H, and compounds where a and b are each 1, and compounds where n is 1.

[93] One embodiment of a compound according to Formula II is



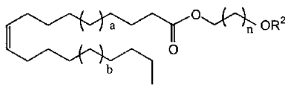
Reverse OEA

[94] In another embodiment, the compounds of Formula II have n from 1 to 5 and a sum of a and b from 1 to 3. In this embodiment, the member R^2 is selected from the group consisting

of hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_6 alkyl, and substituted or unsubstituted lower (C_1-C_6) acyl. In addition, up to four hydrogen atoms of either or both the fatty acid portion and alkanolamine (e.g., ethanolamine) portion of compounds of the above formula may also be substituted by methyl or a double bond.

Oleoylalkanol ester compounds.

[95] Compounds of the invention also include oleoylalkanol esters of the general formula:

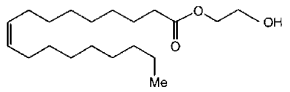


(III).

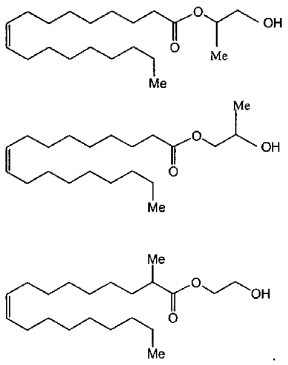
[96] In some embodiments, the compounds of Formula III, have n from 1 to 5; and the sum of a and b from 0 to 4. The member R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_6 alkyl, lower (C_1-C_6) acyl, homoalkyl, and aryl. Up to four hydrogen atoms of either or both the fatty acid portion and alkanol (e.g., ethanol) portion of compounds of the above formula may also be substituted by methyl or a double bond.

[97] In some embodiments, the compounds of Formula III, have n from 1 to 3; and the sum of a and b from 1 to 3. The member R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_6 alkyl, and substituted or unsubstituted lower (C_1-C_6) acyl. Up to four hydrogen atoms of the fatty acid portion and alkanol (e.g., ethanol) portion of compounds of the above formula may also be substituted by methyl or a double bond.

[98] Compounds of Formula III include those compounds where R^2 is H, compounds where a and b are each 1, and compounds where n is 1. Examples of compounds according to Formula III include the oleoyldiethanol ester:



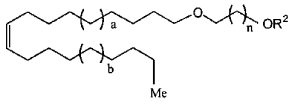
[99] Compounds of Formula III also include mono-methyl substituted oleoyl ethanol esters such as the (R or S)-2'-methyloleoylethanolesters; the (R or S)-1'-methyloleoylethanolesters; and the (R or S))-1'-methyloleoylethanolesters; respectively:



6

Oleoyl alkanol ethers

[100] Compounds of the invention also include oleoylalkanol ethers according to the general formula:



(IV).

12

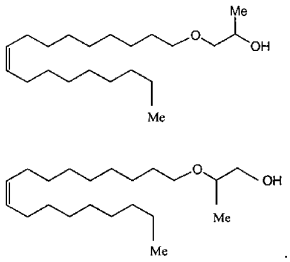
[101] In some embodiments, the compounds of Formula IV, have an n from 1 to 5 and a sum of a and b that can be from 0 to 4. The member R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_6 alkyl, substituted or unsubstituted lower (C_1-C_6) acyl, alkyl, and substituted and unsubstituted aryl. Up to four hydrogen atoms of either or both the fatty acid portion and alkanol (e.g., ethanol) portion of compounds of the above

18 formula may also be substituted by methyl or a double bond.

[102] In other embodiments, the compounds of Formula IV, have n from 1 to 3; and the sum of a and b can be from 1 to 3. The member R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C_1 –C_6 alkyl, and substituted or unsubstituted lower (C_1-C_6) acyl. Up to four hydrogen atoms of either or both the fatty acid portion and alkanol

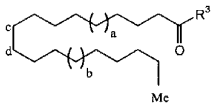
(e.g., ethanol) portion of compounds of the above formula may also be substituted by methyl or a double bond.

[103] Compounds of Formula IV include those compounds where R^2 is H, compounds where a and b are each 1, and compounds where n is 1. Examples of compounds according to Formula IV include the following (R or S) 1'-oleoylethanol ethers and (R or S)-2'-oleoylethanol ethers:



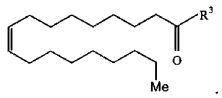
Fatty Acid Alkanolamide Analogs Having Polar Head Variants.

[104] Compounds of the invention also include a variety of polar head analogs of OEA. These compounds include compounds having a fatty acid moiety of the general formula:



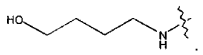
(V).

[105] In some embodiments, the compounds of Formula V have a sum of a and b that can be from 0 to 4. In other embodiments, the sum of a and b is from 1 to 3. In these embodiments, up to four hydrogen atoms of the compounds of the above formula may also be substituted by methyl or a double bond. In addition, the molecular bond between carbons c and d may be unsaturated or saturated. A particularly preferred embodiment is that of the oleic acid fatty acid moiety:

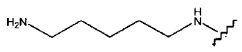


[106] The R^3 group of the above structures may be selected from any of the following:

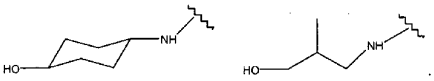
[107] HO-$(CH_2)_z$-NH- wherein z is from 1 to 5, and the alkyl portion thereof is an unbranched methylene chain. For example:



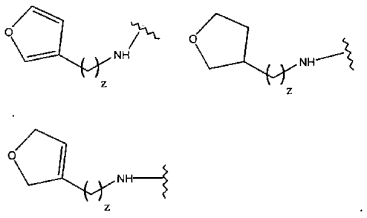
[108] H_2N-$(CH_2)_z$-NH- wherein z is from 1 to 5, and the alkyl portion thereof is an unbranched methylene chain. For example:



[109] HO-$(CH_2)_x$-NH- wherein x is from 1 to 8, and the alkyl portion thereof may be branched or cyclic. For example,

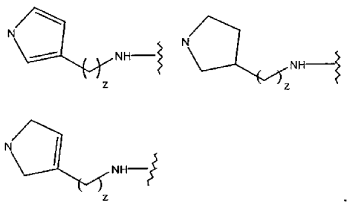


[110] Additional polar head groups for R^3 include, for instance, compounds having furan, dihydrofuran and tetrahydrofuran functional groups:



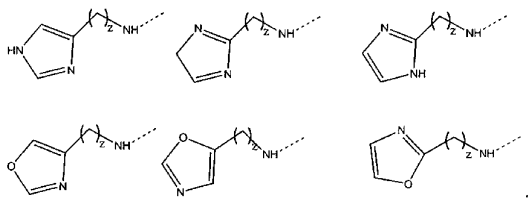
In the above structures, z can be from 1 to 5.

[111] Compounds of the invention include, for instance, those having R^3 polar head groups based upon pyrole, pyrrolidine, and pyrroline rings:



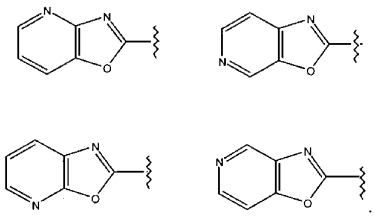
In the compounds of the above structures, z can be from 1 to 5.

[112] Other exemplary polar head groups include a variety of imidazole and oxazoles, for example:



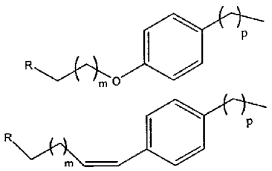
In the compounds of the above structures, z can be from 1 to 5.

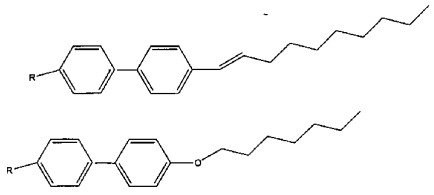
[113] Oxazolpyridine polar head groups are also exemplary:

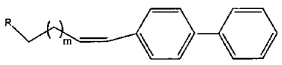


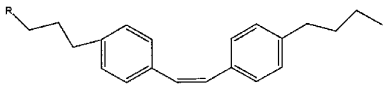
Fatty Acid Alkanolamide Analogs Having Apolar Tail Variants.

[114] Compounds of the invention include a variety of alkanolamide and ethanolamide compounds having a variety of flexible apolar tails. These compounds include compounds of the following formulas in which R represents an ethanolamine moiety, an alkanolamine moiety, or a stable analog thereof. In the case of ethanolamine, the ethanolamine moiety is attached preferably via the ethanolamine nitrogen rather than the ethanolamine oxygen.



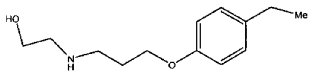




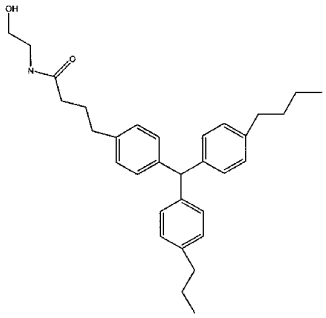


In the above structures, m is from 1 to 9 and p is independently from 1 to 5.

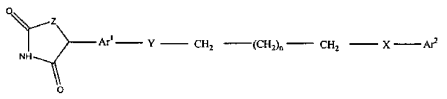
[115] An exemplary compound is:



[116] Another exemplary compound is an ethanolamine analog with an apolar tail of the following structural formula:



[117] Exemplary compounds include analogs of fatty acid alkanolamides. Such analogs include those compounds taught in U.S. Patent No. 6,200,998 (hereby incorporated by reference). This reference teaches compounds of the general formula:

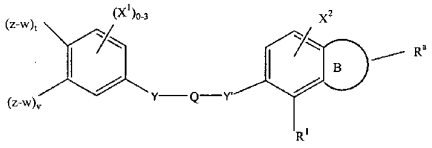


(VI).

[118] In the above formula, and as defined in U.S. Patent No. 6,200,998 , Ar^1 is (1) arylene or (2) heteroarylene, wherein arylene and heteroarylene are optionally substituted with from 1 to 4 groups selected from R^a ; Ar^2 is (1) ortho-substituted aryl or (2) ortho-substituted heteroaryl, wherein said ortho substituent is selected from R; and aryl and heteroaryl are optionally further substituted with from 1-4 groups independently selected from R^a ; X and Y are independently O, S, N-R^b, or CH_2 ;Z is O or S; n is 0 to 3; R is (1) C_{3-10} alkyl optionally substituted with 1-4 groups selected from halo and C_{3-6} cycloalkyl, (2) C_{3-10} alkenyl, or (3) C_{3-8} cycloalkyl; R^a is (1) C_{1-15} alkanoyl, (2) C_{1-15} alkyl, (3) C_{2-15} alkenyl, (4) C_{2-15} alkynyl, (5) halo, (6) OR^b, (7) aryl, or (8) heteroaryl, wherein said alkyl, alkenyl, alkynyl, and alkanoyl are optionally substituted with from 1-5 groups selected from R^c, and said aryl and heteroaryl optionally substituted with 1 to 5 groups selected from R^d ; R^b is (1) hydrogen, (2) C_{1-10} alkyl, (3) C_{2-10} alkenyl, (4) C_{2-10} alkynyl, (5) aryl, (6) heteroaryl, (7) aryl C_{1-15} alkyl, (8) heteroaryl C_{1-15} alkyl, (9) C_{1-15} alkanoyl, (10) C_{3-8} cycloalkyl, wherein alkyl, alkenyl, alkynyl are optionally substituted with one to four substituents independently selected from R^e, and cycloalkyl, aryl and heteroaryl are optionally substituted with one to four substituents independently selected from R^d ; or R^e is (1) halo, (2) aryl, (3) heteroaryl, (4) CN, (5) NO_2, (6) OR^f ; (7) $S(O)_mR^f$, m=0, 1 or 2, provided that R^f is not H when m is 1 or 2;(8) NR^fR^f, (9) NR^fCOR^f, (10) $NR^fCO_2R^f$, (11) $NR^fCON(R^f)_2$, (12) $NR^fSO_2R^f$, provided that R^f is not H, (13) COR^f, (14) CO_2R^f, (15) $CON(R^f)_2$, (16) $SO_2N(R^f)_2$, (17) $OCON(R^f)_2$, or(18) C_{3-8} cycloalkyl, wherein said cycloalkyl, aryl and heteroaryl are optionally substituted with 1 to 3 groups of halo or C_{1-6} alkyl; R^d is (1) a group selected from R^e, (2) C_{1-10} alkyl, (3) C_{2-10} alkenyl, (4) C_{2-10} alkynyl, (5) aryl C_{1-10} alkyl, or (6) heteroaryl C_{1-10} alkyl, wherein alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl are optionally substituted with a group independently selected from R^e ; R^e is (1) halogen, (2) amino, (3) carboxy, (4) C_{1-4} alkyl, (5) C_{1-4} alkoxy, (6)

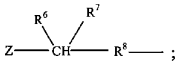
hydroxy, (7) aryl, (8) aryl C_{1-4} alkyl, or (9) aryloxy; R^f is (1) hydrogen, (2) C_{1-10} alkyl, (3) C_{2-10} alkenyl, (4) C_{2-10} alkynyl, (5) aryl, (6) heteroaryl, (7) aryl C_{1-15} alkyl, (8) heteroaryl C_{1-15} alkyl, (9) C_{1-15} alkanoyl, (10) C_{3-8} cycloalkyl; wherein alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, alkanoyl and cycloalkyl are optionally substituted with one to four groups selected from R^e.

[119] Also preferred are the analogs taught in U.S. Patent No. 5,859,051. These analogs have the following general formula:



(VII).

[120] In the embodiments according to Formula VII, as defined in U.S. Patent No. 5,859,051, R^1 is selected from the group consisting of H, C_{1-6} alkyl, C_{5-10} aryl, and C_{5-10} heteroaryl, said alkyl, aryl and heteroaryl optionally substituted with 1 to 3 groups of R^a; R^1 is selected from a group consisting of: H, C_{1-15} alkyl, C_{2-15} alkenyl, C_{2-15} alkynyl and C_{3-10} cycloalkyl, said alkyl, alkenyl, alkynyl, and cycloalkyl optionally substituted with 1 to 3 groups of R^a; R^3 is selected from a group consisting of: H, NHR^1, NHacyl, C_{1-15} alkyl, C_{3-10} cycloalkyl, C_{2-15} alkenyl, C_{1-15} alkoxy, CO_2 alkyl, OH, C_{2-15} alkynyl, C_{5-10} aryl, C_{5-10} heteroaryl said alkyl, cycloalkyl, alkenyl, alkynyl, aryl and heteroaryl optionally substituted with 1 to 3 groups of R^a; (Z--W-) is $Z\text{-}CR^6R^7\text{-}$, Z-CH.=CH-, or:



;

[121] R^8 is selected from the group consisting of CR^6R^7, O, NR^6, and $S(O)_p$; R^6 and R^7 are independently selected from the group consisting of H, C_{1-6} alkyl; B is selected from the group consisting of: 1) a 5 or 6 membered heterocycle containing 0 to 2 double bonds, and 1 heteroatom selected from the group consisting of O, S and N, heteroatom being substituted at any position on the five or six membered heterocycle, the heterocycle being optionally unsubstituted or substituted with 1 to 3 groups of R^a; 2) a 5 or 6 membered carbocycle containing 0 to 2 double bonds, the carbocycle optionally unsubstituted or substituted with 1 to 3 groups of R^a at any position on the five or six membered carbocycle; and 3) a 5 or 6

membered heterocycle containing 0 to 2 double bonds, and 3 heteroatoms selected from the group consisting of O, N, and S, which are substituted at any position on the five or six membered heterocycle, the heterocycle being optionally unsubstituted or substituted with 1 to 3 groups of R^a ; X^1 and X^2 are independently selected from a group consisting of: H, OH, C_{1-15} alkyl, C_{2-15} alkenyl, C_{2-15} alkynyl, halo, OR^3, $ORCF_3$, C_{5-10} aryl, C_{5-10} aralkyl, C_{5-10} heteroaryl and C_{1-10} acyl, said alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl and heteroaryl optionally substituted with 1 to 3 groups of R^a; R^a represents a member selected from the group consisting of: halo, acyl, aryl, heteroaryl, CF_3, OCF_3, --O--, CN, NO_2, R^3, OR^3 ; SR^3, =N(OR), $S(O)R^3$, SO_2R^3, NR^3R^3, NR^3 COR^3, NR^3 CO_2 R^3, $NR^3CON(R^3)_2$, NR^3 SO_2 R^3, COR^3, CO_2R^3, $CON(R^3)_2$, SO_2 $N(R^3)_2$, $OCON(R^3)_2$ said aryl and heteroaryl optionally substituted with 1 to 3 groups of halo or C_{1-6} alkyl; Y is selected from the group consisting of: $S(O)_p$, $-CH_2$ -,-C(O)-, -C(O)NH-, -NR-, -O-, $-SO_2NH$-,$-NHSO_2$; Y^1 is selected from the group consisting of: O and C; Z is selected from the group consisting of: CO_2R^3, $R^3CO_2R^3$, $CONHSO_2Me$, $CONHSO_2$, $CONH_2$ and 5-(1H-tetrazole); t and v are independently 0 or 1 such that t+v=1 Q is a saturated or unsaturated straight chain hydrocarbon containing 2-4 carbon atoms and p is 0-2 with the proviso when Z is CO_2 R^3 and B is a 5 membered heterocycle consisting of O, R^3 does not represent methyl.

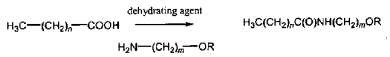
[122] Additional analogs suitable for practicing the inventive methods and compositions include compounds taught in U.S. Patent No. 5,847,008, U.S. Patent No 6,090,836 and U.S. Patent No. 6,090,839, each of which is herein incorporated by reference in its entirety to the extent not inconsistent with the present disclosure.

[123] Additionally a variety of suitable analogs are taught in U.S. Patent No. 6,274,608. Aryl and heteroaryl acetic acid and oxyacetic acid analogs are taught for instance in U.S. Patent No. 6,160,000; substituted 5-aryl-2,4-thiazolidinedione analogs are taught in U.S. Patent No. 6,200,998; other possible analogs such as polyunsaturated fatty acids and eicosanoids are known (see for instance, Forman, BM, Chen, J, and Evans RM, PNAS 94:4312-4317. The compounds of these publications, which are each herein incorporated by reference in their entirety to the extent not inconsistent with the present disclosure can be screened by the methods provide below to provide compounds which are useful, for instance, in reducing body fat. and body weight, modulating fat catabolism, and reducing appetite according to the present disclosure.

[124] Synthesis of Fatty Acid Alkanolamides

[125] Compounds useful in practicing the present invention are readily synthesized and purified using methods recognized in the art. In an exemplary synthetic scheme (Scheme 1),

a carboxylic acid and an aminoalcohol (or an O-protected derivative thereof) are reacted in a the presence of a dehydrating agent, e.g., dicyclohexylcarbodiimide, in an appropriate solvent. The fatty acid alkanol amide is isolated by methods such as extraction, crystallization, precipitation, chromatography and the like. If the final product is the O-protected adduct, it is deprotected, typically by an art-recognized method, to afford a fatty acid adduct having a free hydroxyl group.



Scheme 1

[126] Those of skill in the art will recognize that many variants on the scheme set forth above are available. For example, an activated derivative, e.g, acyl halide, active ester, of the acid can be used. Similarly, a glycol (preferably mono O-protected) can be substituted for the amino alcohol, resulting in an ester linkage between the two constituents of the molecule.

[127] Reverse esters and reverse amides are also readily synthesized by art-recognized methods. For example, a hydroxycarboxylic acid is reacted with an amine or hydroxy derivative of a long chain alkyl (i.e., C_4-C_{22}) in the presence of a dehydrating agent. In certain reaction pathways, it is desirable to protect the hydroxyl moiety of the hydroxycarboxylic acid.

[128] Ethers and mercaptans are prepared by methods well-known to those of skill in the art, e.g., Williamson synthesis. For example, a long chain alkyl alcohol or thiol is deprotonated by a base, e.g, NaH, and a reactive alcohol derivative, e.g., a halo, tosyl, mesyl alcohol, or a protected derivative thereof is reacted with the resulting anion to form the ester or mercaptan.

[129] The above-recited methods and variations thereof can be found in, for example, RECENT DEVELOPMENTS IN THE Synthesis OF FATTY ACID DERIVATIVES, Knothe G, ed., Amer. Oil Chemists Society 1999; COMPREHENSIVE NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY AND OTHER SECONDARY METABOLITES INCLUDING FATTY ACIDS AND THEIR DERIVATIVES, Nakanishi K, ed., Pergamon Press, 1999; ORGANIC SYNTHESIS COLLECTED VOLUMES I-V, John Wiley and Sons; COMPENDIUM OF ORGANIC SYNTHETIC METHODS, Volumes 1-6, Wiley Interscience 1984; ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATION, Volumes I-III, Academic

Press Ltd. 1983; Greene T, PROTECTING GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, 2d ed., Wiley Interscience 1991.

[130] Methods of use, Pharmaceutical Compositions, and their Administration

[131] Methods of Use

[132] The compounds, compositions and methods of the invention (e.g., fatty acid alkanolamides, fatty acid ethanolamide compounds, analogs, and homologues) are used to reduce body fat and or body weight in mammals, including dogs, cats, and especially humans. The weight loss may be for aesthetic or therapeutic purposes. The compounds may also be used to reduce appetite or induce hypophagia.

[133] The compounds, compositions, and methods of the invention are used to prevent weight gain or body fat increases in individuals within a normal weight range. The compounds may be used in otherwise healthy individuals who are not otherwise in need of any pharmaceutical intervention for diseases related to diabetes or hyperlipidemia or cancer. In some embodiments, the individuals to be treated are free of diseases related to disturbances in sugar or lipid levels or metabolism or free of risk factors for cardiovascular and cerebrovascular disease. The individuals may be non-diabetic and have blood sugar levels in the normal range. The individuals may also have blood lipids (e.g., cholesterol) or triglyceride levels in the normal range. The individuals may be free of atherosclerosis. The individuals may be free of other conditions such as cancer or other tumors, disorders involving insulin resistance, Syndrome X, and pancreatitis.

[134] In other embodiments, the subjects are overweight or obese persons in need of body fat and/or body weight reduction. In these embodiments, the methods, compounds, and compositions of the invention can be administered to promote weight loss and also to prevent weight gain once a body weight within the normal range for a person of that sex and age and height has been achieved. The compounds may be used in otherwise healthy individuals who are not in need of any pharmaceutical treatment of a disorder related to diabetes, hyperlipidemia, or cancer. The individuals may also otherwise free of risk factors for cardiovascular and cerebrovascular diseases. In some embodiments, the individuals to be treated are free of diseases related to sugar (e.g., glucose) or lipid metabolism. The individuals may be non-diabetic and have blood sugar levels in the normal range. The individuals may also have blood lipids (e.g., cholesterol, HDL, LDL, total cholesterol) or triglyceride levels in the normal range. The individuals may not need to be in treatment for atherosclerosis.

[135] The compounds methods, and compositions of the invention may also be administered to suppress appetite in mammals, including cats, dogs, and humans. In some embodiments, the compounds may be used in otherwise healthy individuals who are not in need of pharmaceutical interventions for any disease. In some embodiments, the individuals do not need preventive or ameliorative therapy for diseases, including cancer, diabetes, or hyperlipidemia. In some embodiments, the individuals to be treated are free of diseases related to abnormal sugar or lipid levels. In other embodiments the individuals may be free of risk factors for cardiovascular or cerebrovascular disease. The individuals may be non-diabetic and have blood sugar levels in the normal range. The individuals may also have blood lipids (e.g., cholesterol) or triglyceride levels in the normal range. The individuals may be free of atherosclerosis.

[136] The compounds methods, and compositions of the invention may also be administered to modulate fat metabolism (e.g., increase fat catabolism) in mammals, including cats, dogs, and humans. In some embodiments, the compounds may be used to reduce appetite in otherwise healthy individuals. In some embodiments, the individuals to be treated are free of diseases related to sugar or lipid metabolism (e.g., diabetes, hypercholesterolemia, low HDL levels or high LDL levels). The individuals may be non-diabetic and have blood sugar levels in the normal range. The individuals may also have blood lipids (e.g., cholesterol) or triglyceride levels in the normal range. The individuals may be free of atherosclerosis.

[137] Treatment with the compounds and compositions of the invention may be for a period predetermined by the degree or amount of weight loss has been accomplished or when the individual achieves a BMI within the normal range. Treatment with the compounds and compositions of the invention may be reduced once a predetermined degree or amount of weight loss has been accomplished or when the individual achieves a BMI within the normal range

[138] The compounds and compositions of the invention may be administered solely for the purposes of reducing body fat or reducing appetite.

Pharmaceutical Compositions.

[139] Another aspect of the present invention provides pharmaceutical compositions which comprise compounds of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

[140] The pharmaceutical compositions of the present invention comprise a compound of the instant invention as an active ingredient or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and

may also contain a pharmaceutically acceptable carrier and optionally other therapeutic ingredients.

[141] The compositions include compositions suitable for oral, rectal, topical, parenteral (including subcutaneous, intramuscular, and intravenous), ocular (ophthalmic), pulmonary (nasal or buccal inhalation), or nasal administration, although the most suitable route in any given case will depend in part on the nature and severity of the conditions being treated and on the nature of the active ingredient. An exemplary route of administration is the oral route. The compositions may be conveniently presented in unit dosage form and prepared by any of the methods well-known in the art of pharmacy.

[142] In practical use, the compounds of the invention can be combined as the active ingredient in intimate admixture with a pharmaceutical carrier according to conventional pharmaceutical compounding techniques. The carrier may take a wide variety of forms depending on the form of preparation desired for administration, e.g., oral or parenteral (including intravenous). In preparing the compositions for oral dosage form, any of the usual pharmaceutical media may be employed, such as, for example, water, glycols, oils, alcohols, flavoring agents, preservatives, coloring agents and the like in the case of oral liquid preparations, such as, for example, suspensions, elixirs and solutions; or carriers such as starches, sugars, microcrystalline cellulose, diluents, granulating agents, lubricants, binders, disintegrating agents and the like in the case of oral solid preparations such as, for example, powders, hard and soft capsules and tablets, with the solid oral preparations being preferred over the liquid preparations.

[143] Because of their ease of administration, tablets and capsules represent the most advantageous oral dosage unit form in which case solid pharmaceutical carriers are obviously employed. If desired, tablets may be coated by standard aqueous or nonaqueous techniques. Such compositions and preparations can contain at least 0.1 percent of active compound. The percentage of active compound in these compositions may, of course, be varied and may conveniently be between about 2 percent to about 60 percent of the weight of the unit. The amount of active compound in such therapeutically useful compositions is such that a therapeutically effective dosage will be obtained. The active compounds can also be administered intranasally as, for example, liquid drops or spray.

[144] The tablets, pills, capsules, and the like may also contain a binder such as gum tragacanth, acacia, corn starch or gelatin; excipients such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent such as corn starch, potato starch, alginic acid; a lubricant such as magnesium stearate; and a sweetening agent such as sucrose, lactose or saccharin. When a

dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier such as a fatty oil.

[145] Various other materials may be present as coatings or to modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets may be coated with shellac, sugar or both. A syrup or elixir may contain, in addition to the active ingredient, sucrose as a sweetening agent, methyl and propylparabens as preservatives, a dye and a flavoring such as cherry or orange flavor. To prevent breakdown during transit through the upper portion of the GI tract, the composition may be an enteric coated formulation.

Administration

[146] The compounds of the invention may also be administered parenterally. Solutions or suspensions of these active compounds can be prepared in water suitably mixed with a surfactant such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols and mixtures thereof in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

[147] The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (e.g. glycerol, propylene glycol and liquid polyethylene glycol), suitable mixtures thereof, and vegetable oils.

[148] The compounds of the invention can be effective over a wide dosage range. For example, in the treatment of adult humans, dosages from about 10 to about 1000 mg, about 100 to about 500 mg or about 1 to about 100 mg may be needed. Doses of the 0.05 to about 100 mg, and more preferably from about 0.1 to about 100 mg, per day may be used. A most preferable dosage is about 0.1 mg to about 70 mg per day. In choosing a regimen for patients, it may frequently be necessary to begin with a dosage of from about 2 to about 70 mg per day and when the condition is under control to reduce the dosage as low as from about 0.1 to about 10 mg per day. For example, in the treatment of adult humans, dosages from about 0.05 to about 100 mg, preferably from about 0.1 to about 100 mg, per day may be used. The exact dosage will depend upon the mode of administration, on the therapy desired, form in which

administered, the subject to be treated and the body weight of the subject to be treated, and the preference and experience of the physician or veterinarian in charge.

[149] Generally, the compounds of the present invention can be dispensed in unit dosage form comprising preferably from about 0.1 to about 100 mg of active ingredient together with a pharmaceutically acceptable carrier per unit dosage. Usually, dosage forms suitable for oral, nasal, pulmonary or transdermal administration comprise from about 0.001 mg to about 100 mg, preferably from about 0.01 mg to about 50 mg of the compounds admixed with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. For storage and use, these preparations preferably contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

[150] Administration of an appropriate amount the candidate compound may be by any means known in the art such as, for example, oral or rectal, parenteral, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, subdermal, intranasal, or intramuscular. In some embodiments, administration is transdermal. An appropriate amount or dose of the candidate compound may be determined empirically as is known in the art. An appropriate or therapeutic amount is an amount sufficient to effect a loss of body fat or a loss in body weight in the animal over time. The candidate compound can be administered as often as required to effect a loss of body fat or loss in body weight, for example, hourly, every six, eight, twelve, or eighteen hours, daily, or weekly

[151] Formulations suitable for oral administration can consist of (a) liquid solutions, such as an effective amount of the packaged nucleic acid suspended in diluents, such as water, saline or PEG 400; (b) capsules, sachets or tablets, each containing a predetermined amount of the active ingredient, as liquids, solids, granules or gelatin; (c) suspensions in an appropriate liquid; and (d) suitable emulsions. Tablet forms can include one or more of lactose, sucrose, mannitol, sorbitol, calcium phosphates, corn starch, potato starch, microcrystalline cellulose, gelatin, colloidal silicon dioxide, talc, magnesium stearate, stearic acid, and other excipients, colorants, fillers, binders, diluents, buffering agents, moistening agents, preservatives, flavoring agents, dyes, disintegrating agents, and pharmaceutically compatible carriers. Lozenge forms can comprise the active ingredient in a flavor, e.g., sucrose, as well as pastilles comprising the active ingredient in an inert base, such as gelatin and glycerin or sucrose and acacia emulsions, gels, and the like containing, in addition to the active ingredient, carriers known in the art.

[152] Injection solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described. Formulations suitable for parenteral administration, such as, for example, by intraarticular (in the joints), intravenous,

intramuscular, intradermal, intraperitoneal, and subcutaneous routes, include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain antioxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives.

[153] With respect to transdermal routes of administration, methods for transdermal administration of drugs are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, (Gennaro et al. Eds., Mack Publishing Co., 1985). Dermal or skin patches are a preferred means for transdermal delivery of the compounds of the invention. Patches preferably provide an absorption enhancer such as DMSO to increase the absorption of the compounds. Other methods for transdermal drug delivery are disclosed in U.S. Patents No. 5,962,012, 6,261,595, and 6,261,595. Each of which is incorporated by reference in its entirety.

[154] Preferred patches include those that control the rate of drug delivery to the skin. Patches may provide a variety of dosing systems including a reservoir system or a monolithic system, respectively. The reservoir design may, for example, have four layers: the adhesive layer that directly contacts the skin, the control membrane, which controls the diffusion of drug molecules, the reservoir of drug molecules, and a water-resistant backing. Such a design delivers uniform amounts of the drug over a specified time period, the rate of delivery has to be less than the saturation limit of different types of skin.

[155] The monolithic design, for example, typically has only three layers: the adhesive layer, a polymer matrix containing the compound, and a water-proof backing. This design brings a saturating amount of drug to the skin. Thereby, delivery is controlled by the skin. As the drug amount decreases in the patch to below the saturating level, the delivery rate falls.

[156] Compounds of the invention may be used in combination with other compounds of the invention or with other drugs that may also be useful in dieting or the treatment, prevention, suppression or amelioration of body fat. Such other drugs may be administered, by a route and in an amount commonly used therefor, contemporaneously or sequentially with a compound of the invention. When a compound of the invention is used contemporaneously with one or more other drugs, a pharmaceutical composition in unit dosage form containing such other drugs and the compound is preferred. When used in combination with one or more other active ingredients, the compound of the present invention and the other active ingredients may be used in lower doses than when each is used singly. Accordingly, the pharmaceutical compositions of the present invention include those

that contain one or more other active ingredients, in addition to the compounds disclosed above.

IDENTIFICATION OF COMPOUNDS OF THE INVENTION

[157] Candidate compounds, such as disclosed above, can be screened by a variety of means known in the art. Body fat reducing compounds, for instance, can be identified *in vivo* using animal bioassay techniques known to those of ordinary skill in the art. Test compounds and appropriate vehicle or caloric controls can be administered by any of a number of routes (e.g., the oral route, a parenteral route) to experimental subjects and the weight of the subjects can be monitored over the course of therapy. The experimental subjects are humans or test animals (e.g., rats, mice).

[158] The effect of the compound on appetite or in inducing hypophagia or reduced food intake can be assessed, for instance, by monitoring the food consumption of the test subjects (e.g., measuring the amount eaten or not eaten by a subject in terms of food weight or caloric content). The effect of the compounds on appetite can also be assessed by subjective means including questionnaires as to appetite or food cravings levels by human subjects. The effect of the test compounds on lipid metabolism can be assessed by monitoring blood lipids and fatty acid oxidation. The techniques for these assessments are well known to those of ordinary skill in the art. The studies may be acute, subacute, chronic, or subchronic with respect to the duration of administration and or follow-up of the effects of the administration.

[159] Body fat reduction can be determined, for instance, by directly measuring changes in body fat of the animal or by measuring changes in the body weight of the animal. The animal may selected from the group consisting of a mouse, a rat, a guinea pig, or a rabbit. The animal may also be an ob/ob mouse, a db/db mouse, or a Zucker rat or other animal model for a weight-associated disease. Clinical studies in humans may also be conducted.

[160] Combinatorial chemical libraries

[161] Recently, attention has focused on the use of combinatorial chemical libraries to assist in the generation of new chemical compound leads. A combinatorial chemical library is a collection of diverse chemical compounds generated by either chemical synthesis or biological synthesis by combining a number of chemical "building blocks" such as reagents. For example, a linear combinatorial chemical library such as a polypeptide library is formed by combining a set of chemical building blocks called amino acids in every possible way for a given compound length (i.e., the number of amino acids in a polypeptide compound).

Millions of chemical compounds can be synthesized through such combinatorial mixing of chemical building blocks. For example, one commentator has observed that the systematic, combinatorial mixing of 100 interchangeable chemical building blocks results in the theoretical synthesis of 100 million tetrameric compounds or 10 billion pentameric compounds (Gallop et al. *J. Med. Chem.* 37(9):1233(1994)).

[162] Preparation and screening of combinatorial chemical libraries are well known to those of skill in the art. Such combinatorial chemical libraries include, but are not limited to, p benzodiazepines (U.S. Pat. No. 5,288,514), diversomers such as hydantoins, benzodiazepines and dipeptides (Hobbs et al. *PNAS* USA 90: 6909(1993)), analogous organic syntheses of small compound libraries (Chen et al.) *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661(1994), oligocarbamates (Cho, et al., *Science* 261: 1303(1993)), and/or peptidyl phosphonates (Campbell et al., *J. Org. Chem.* 59: 658(1994)), and small organic molecule libraries (see, e.g., benzodiazepines (Baum *C&EN*, Jan 18, page 33(1993)), thiazolidinones and metathiazanones (U.S. Patent 5,549,974), pyrrolidines (U.S. Patents 5,525,735 and 5,519,134), benzodiazepines (U.S. Patent 5,288,514), and the like.

[163] Devices for the preparation of combinatorial libraries are commercially available (see, e.g., 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA).

[164] A number of well known robotic systems have also been developed for solution phase chemistries. These systems include automated workstations like the automated synthesis apparatus developed by Takeda Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japan) and many robotic systems utilizing robotic arms (Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, HewlettPackard, Palo Alto, CA) which mimic the manual synthetic operations performed by a chemist. Any of the above devices are suitable for use with the present invention. The nature and implementation of modifications to these devices so that they can operate as discussed herein will be apparent to persons skilled in the relevant art. In addition, numerous combinatorial libraries are themselves commercially available (see, e.g., ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd., Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.).

[165] High throughput assays of chemical libraries

[166] The assays for compounds described herein are amenable to high throughput screening. Preferred assays thus detect activation of transcription (i.e., activation of mRNA

production) by the test compound(s), activation of protein expression by the test compound(s), or binding to the gene product (e.g., expressed protein) by the test compound(s); or effects on fatty acid modulation as described below.

[167] High throughput assays for the presence, absence, or quantification of particular protein products or binding assays are well known to those of skill in the art. Thus, for example, U.S. Patent 5,559,410 discloses high throughput screening methods for proteins, and U.S. Patents 5,576,220 and 5,541,061 disclose high throughput methods of screening for ligand/antibody binding.

[168] In addition, high throughput screening systems are commercially available (see, e.g., Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA, etc.). These systems typically automate entire procedures including all sample and reagent pipetting, liquid dispensing, timed incubations, and final readings of the microplate in detector(s) appropriate for the assay. These configurable systems provide high throughput and rapid start up as well as a high degree of flexibility and customization. The manufacturers of such systems provide detailed protocols the various high throughput. Thus, for example, Zymark Corp. provides technical bulletins describing screening systems for detecting the modulation of gene transcription, ligand binding, and the like.

[169] Determining Whether Compounds Affect Food Intake, Body Weight, Body Fat, Appetite, Food Seeking Behavior, or Modulate Fatty Acid Oxidation

[170] Compounds of the invention can be administered to an animal to determine whether they affect food intake and body weight, body fat, appetite, food seeking behavior, or modulate modulator fatty acid oxidation.

[171] Animals can be, for example, obese or normal guinea pigs, rats, mice, or rabbits. Suitable rats include, for example, Zucker rats. Suitable mice include, for example, normal mice, ALS/LtJ, C3.SW-*H*-^{2b}/SnJ, (NON/LtJ x NZO/HlJ)F1, NZO/HlJ, ALR/LtJ, NON/LtJ, KK.Cg-AALR/LtJ, NON/LtJ, KK.Cg-A^{y}/J, B6.HRS(BKS)-*Cpe*^{fat}/+, B6.129P2-*Gck*$^{tm/Efr}$, B6.V-*Lep*^{ob}, *BKS.Cg*-m +/+ *Lep*rd*b*, and C57BL/6J with Diet Induced Obesity.

[172] Administration of an appropriate amount the candidate compound may be by any means known in the art such as, for example, oral or rectal, parenteral such as, for example, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, subdermal, intranasal, or intramuscular. Preferably administration may be intraperitoneal or oral. An appropriate effective amount of the candidate compound may be determined empirically as is known in the art. An

appropriate effective amount may be an amount sufficient to effect a loss of body fat or a loss in body weight or reduction in food consumption in the animal over time. The candidate compound can be administered as often as required to effect a loss of body fat or loss in body weight, for example, hourly, every six, eight, twelve, or eighteen hours, daily, or weekly.

[173] Formulations suitable for oral administration include (a) liquid solutions, such as an effective amount of the candidate compound suspended in diluents, such as water, saline or PEG 400; (b) capsules, sachets or tablets, each containing a predetermined amount of the active ingredient, as liquids, solids, granules or gelatin; (c) suspensions in an appropriate liquid; and (d) suitable emulsions. Tablet forms include one or more of lactose, sucrose, mannitol, sorbitol, calcium phosphates, corn starch, potato starch, microcrystalline cellulose, gelatin, colloidal silicon dioxide, talc, magnesium stearate, stearic acid, and other excipients, colorants, fillers, binders, diluents, buffering agents, moistening agents, preservatives, flavoring agents, dyes, disintegrating agents, and pharmaceutically compatible carriers. Lozenge forms can comprise the active ingredient in a flavor, e.g., sucrose, as well as pastilles comprising the active ingredient in an inert base, such as gelatin and glycerin or sucrose and acacia emulsions, gels, and the like containing, in addition to the active ingredient, carriers known in the art.

[174] Injection solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described. Formulations suitable for parenteral administration, include, for example, aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain antioxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives.

[175] The dose administered to the animal is sufficient to effect a change in body weight, body fat, and/or fatty acid oxidation over time. Such a dose can be determined according to the efficacy of the particular candidate compound employed and the condition of the animal, as well as the body weight or surface area of the animal. The size of the dose also will be determined by the existence, nature, and extent of any adverse side-effects that accompany the administration of a candidate compound; the LD_{50} of the candidate compound;. and the side-effects of the candidate compound at various concentrations. In general, the dose will range from 0.1-50 mg per kg, preferably 1-25 mg per kg, most preferably 1-20 mg per kg body weight. The determination of dose response relationships is well known to one of ordinary skill in the art.

[176] **Body Fat Reduction**

[177] Body weight reduction is typically determined by direct measurements of the change in body fat or by loss of body weight. Body fat and body weight of the animals is determined before, during, and after the administration of the candidate compound. Changes in body fat are measured by any means known in the art such as, for example, fat fold measurements with calipers, bioelectrical impedance, hydrostatic weighing, or dual x-ray absorbiometry. Preferably animals demonstrate at least 2%, 5%, 8%, or 10% loss of body fat. Changes in body weight can be measured by any means known in the art such as, for example, on a portable scale, on a digital scale, on a balance scale, on a floor scale, or a table scale. Preferably animals demonstrate at least 2%, 5%, 10%, or 15% loss of body weight. Body weight reduction is measured before administration of the candidate compound and at regular intervals during and after treatment. Preferably, body weight is measured every 5 days, more preferably every 4 days, even more preferably every 3 days, yet more preferably every 2 days, most preferably every day.

[178] **Changes in Fatty Acid Metabolism**

[179] Changes in fatty acid metabolism can be measured, for instance, by looking at fatty acid oxidation in cells from major fat burning tissues such as, for example, liver (Beynen, et al. *Diabetes* 28:828 (1979)), muscle (Chiasson Lab. Anat. of Rat, (1980)), heart (Flink, et al. *J. Biol. Chem.* 267: 9917 (1992)), and adipocytes (Rodbell *J. Biol. Chem.* 239: 375 (1964)), Cells may be from primary cultures or from cell lines. Cells may be prepared for primary cultures by any means known in the art including, for example, enzymatic digestion and dissection. Suitable cell lines are known to those in the art. Suitable hepatocyte lines are, for example, Fao, MH1C1, H-4-II-E, H4TG, H4-II-E-C3, McA-RH7777, McA-RH8994, N1-S1 Fudr, N1-S1, ARL-6, Hepa 1-6, Hepa-1c1c7, BpRcl, tao BpRcl, NCTC clone 1469, PLC/PRF/5, Hep 3B2.1-7 [Hep 3B], Hep G2 [HepG2], SK-HEP-1, WCH-17. Suitable skeletal muscle cell lines are, for example, L6, L8, C8, NOR-10, BLO-11, BC3H1, G-7, G-8, C2C12, P19, Sol8, SJRH30 [RMS 13], QM7. Suitable cardiac cell lines are, for example, H9c2(2-1), P19, CCD-32Lu, CCD-32Sk, Girardi, FBHE. Suitable adipocyte lines are, for example, NCTC clone 929 [derivative of Strain L; L-929; L cell], NCTC 2071, L-M, L-M(TK-) [LMTK-; LM(tk-)], A9 (APRT and HPRT negative derivative of Strain L), NCTC clone 2472, NCTC clone 2555, 3T3-L1, J26, J27-neo, J27-B7, MTKP 97-12 pMp97b [TKMp97-12], L-NGC-5HT2, Ltk-11, L-alpha-1b, L-alpha-2A, L-alpha-2C, B82.

[180] The rate of fatty acid oxidation may be measured by ^{14}C-oleate oxidation to ketone bodies (Guzmán and Geelen Biochem. J. 287:487 (1982)) and/or ^{14}C-oleate oxidation to CO_2 (Fruebis PNAS 98:2005 (2001); Blazquez et al. *J. Neurochem* 71: 1597 (1998)). Lypolysis may be measured by fatty acid or glycerol release by using appropriate labeled precursors or spectrophotometric assays (Serradeil-Le Gal *FEBS Lett* 475: 150 (2000)). For analysis of ^{14}C -oleate oxidation to ketone bodies, freshly isolated cells or cultured cell lines can be incubated with ^{14}C-oleic acid for an appropriate time, such as, for example, 30, 60, 90, 120, or 180 minutes. The amount of ^{14}C radioactivity in the incubation medium can be measured to determine their rate of oleate oxidation. Oleate oxidation can be expressed as nmol oleate produced in x minutes per g cells. For analysis of lypolysis/glycerol release, freshly isolated cells or cultured cells lines can be washed then incubated for an appropriate time. The amount of glycerol released into the incubation media can provide an index for lypolysis.

EXAMPLES

[181] The following examples are provided by way of illustration only and not by way of limitation. Those of skill will readily recognize a variety of non-critical parameters which could be changed or modified to yield essentially similar results.

Example 1: Synthesis of fatty acid ethanolamide compounds, homologues and analogs.

[182] Methods for the formation of fatty acid ethanolamines from ethanolamines and the corresponding fatty acyl are relatively straight forward and known to one of ordinary skill in the art. For example, fatty acid ethanolamides may be synthesized by reacting a fatty acid or fatty acid chloride with an aminoalcohol as described by Abadjj et al. (Abadji, V., Lin, S. Y., Taha, G., Griffin, G., Stevenson, L. A., Pertwee, R. G. & Makriyannis, A. *J. Med. Chem.* 37, 1889-1893 (1994)). Fatty acids may be prepared similarly to the procedure of Serdarevich and Carroll (Serdarevich, B. & Carroll, K. K. *J. Lipid Res.* 7, 277-284 (1966)). Radioactively labeled fatty acid ethanolamides can be prepared by reaction with acyl chlorides (Nu-Check Prep, Elysian, MN) with [^{3}H]ethanolamine (10-30 Ci/mmol; American Radiolabeled Chemicals, St. Louis) as described by Desarnaud, F., Cadas, H. & Piomelli, D. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 6030-6035. Compounds can be purified by flash column chromatography or HPLC. Compound identity can be established by use of NMR and/or gas chromatography-mass spectrometry and thin layer chromatography.

[183] Starting reagents and materials may be purchased from Avanti Polar Lipids, Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI), Nu-Check Prep, Research Biochemicals, or Sigma. Briefly,

according to methods taught by Giuffrida, A. et al. (see Giuffrida, A and Piomelli, D. in Lipid Second Messengers (Laycock, S.G. and Rubin, R.P. Eds. pp. 113-133 CRC Press LLC, Boca Raton, Florida) and Devane et al. (Devane W., Hanus, L. et al.Science 258, 1946-1949 (1992)), unlabeled or labeled fatty acyl ethanolamines can be synthesized by the reaction of the corresponding fatty acyl chlorides with unlabeled or labeled ethanolamine. The fatty acid chorides can be dissolved in dichloromethane (10 mg/ml) and reacted with ethanolamine at −0.4°C for 15 minutes. The reaction can be quench by the addition of purified water. After vigorous stirring the phases are allowed to separate. The upper aqueous phase is discarded. The organic phase is washed twice with water. These washes remove the unreacted ethanolamine. This method provides a quantitative formation of fatty acyl ethanolamines. The ethanolamines are concentrated to dryness under a stream of nitrogen gas and can be reconstituted in an organic solvent such as dichloromethane at a concentration of 20 mM. The resulting fatty acyl ethanolamine solution can be stored at -20°C until needed for use.

[184] The chemistry of fatty acid carboxylic acid groups, primary and secondary amines, and primary alcohol groups is well known to one of ordinary skill in the art. Fatty acid ethanolamides having a variety of substituents on the ethanolamine portion thereof can be formed in many ways, but most preferably by starting with the corresponding substituted ethanolamine and fatty acid moieties. Such substituted ethanolamines would include the alkyl aminoethanol ethers and acyl aminoethanol esters as well as secondary akyl ethanol amines. Alternatively, the particular fatty acid ethanolamide can be synthesized from the corresponding fatty acid ethanolamide by the addition of the appropriate substituent groups.

[185] Example 2: Methods for Screening Fatty Acid Ethanolamide (FAE) in Vivo and other Compounds of the Invention.

[186] Animals. Male Wistar rats (200-350 g) were used. Procedures should met NIH guidelines detailed in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the European Communities directive 86/609/EEC regulating animal research.

[187] Chemicals. FAEs and [$^2H_4$] FAEs were synthesized in the laboratory (Giuffrida et al., "*Lipid Second Messengers*" (ed. Laychock, S.G. & Rubin, R.P.) 113-133 (CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 1998)); 1,2-dioleyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamine-N-oleyl was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL); SR141716A was provided by RBI (Natick, MA) as part of the Chemical Synthesis Program of the NIMH (N01MH30003); SR144528 was a generous gift of Sanofi Recherche; all other drugs were from Tocris (Ballwin, MO) or Sigma (Saint Louis, MO). FAE were dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO) and administered in

70% DMSO in sterile saline (acute treatments) or 5% Tween 80/5% propylenglycol in sterile saline (subchronic treatments) (1 ml per kg, i.p.). Capsaicin was administered in 10% Tween 80/10% ethanol/80% saline; SR141716A, SR144528, CCK-8 and CP-93129 in 5% Tween 80/5% propylenglycol/90% saline (1 ml per kg, i.p.).

[188] Enzyme assays. In all biochemical experiments, rats were killed and tissues collected between 1400 and 1600 h, after varying periods of food deprivation. Microsome fractions were prepared as described (Désarnaud et al., *J. Biol. Chem.*, 270:6030-6035 (1995)). NAT assays were performed using 1,2-di[^{14}C]palmityl-*sn*-glycerophosphocholine as a substrate (108 mCi/mmol, Amersham, Piscataway, NJ) (Cadas et al., H., *J. Neurosci.*, 17:1226-1242 (1997)). FAAH assays were performed according to (Désarnaud et al., *J. Biol. Chem.*, 270:6030-6035 (1995)), except that [^{3}H]anandamide (arachidonyl-[1-^{3}H]ethanolamide; 60 Ci/mmol; ARC, St. Louis, MO) was included as a substrate and radioactivity was measured in the aqueous phase after chloroform extraction.

[189] HPLC/MS analyses. Plasma was prepared from blood obtained by cardiac puncture (Giuffrida et al., *Anal. Biochem.*, 280:87-93 (2000)) and CSF was collected from the *cisterna magna* using a 27G 1/2 needle (Precisionglide, USA). FAEs and NAPE were extracted from tissues with methanol/chloroform and fractionated by column chromatography (Giuffrida et al., "*Lipid Second Messengers*" (ed. Laychock, S.G. & Rubin, R.P.) 113-133 (CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 1998)). FAEs were quantified by HPLC/MS, using an isotope dilution method (Giuffrida et al., *Anal. Biochem.*, 280:87-93 (2000)). Individual NAPE species were identified and quantified by HPLC/MS, using an external standard method (Calignano et al., *Nature*, 408:96-101 (2000)).

[190] Blood chemistry. Plasma β-hydroxybutyrate and glycerol were measured using commercial kits (Sigma, St. Louis, MO). Plasma prolactin, corticosterone and luteinizing hormone were quantified by radioimmunoassay (Navarro et al., *Neuroreport*, 8:491-496 (1997)).

[191] Feeding experiments. *Acute experiments.* Food intake was measured in 24-h food-deprived rats (Navarro et al., *J. Neurochem.*, 67:1982-1991 (1996)), administering drugs 15 min before food presentation. *Subchronic experiments. Ad libitum* fed rats received vehicle injections for three days. On day four, the animals were divided in two equal groups and gave them daily injections of vehicle or OEA (5 mg per kg at 1900 h) for 7 consecutive days, while measuring body weight, food intake and water intake.

[192] Conditioned taste aversion. Rats were water-deprived for 24 h and then accustomed to drink from a graded bottle during a 30-min test period for four days. On day five, water

was substituted with a 0.1% saccharin solution and, 30 min later, the animals received injections of vehicle, OEA (20 mg per kg) or lithium chloride (0.4 M, 7.5 ml per kg). During the following two days, water consumption was recorded over 30-min test periods. The animals were then presented with water or saccharin, and drinking measured.

[193] Operant responses for food. Rats were trained to lever press for food on a fixed ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement, while food-restricted at 20 g of chow per rat per day (Rodriguez de Fonseca et al., *Acta Pharmacol. Sin.*, 20:1109-1114 (1999)). Once stable responding was achieved, the animals were trained to acquire an FR5, time out 2-min schedule of food reinforcement and kept in limited access to food. When a stable baseline was obtained, the animals were used to test the effects of vehicle or OEA (1, 5 or 20 mg per kg) administered 15 min before lever presentation. Test duration was 60 min.

[194] Other behavioral assays. The elevated plus maze test was conducted as described (Navarro et al., *Neuroreport*, 8:491-496 (1997)) after the administration of vehicle or OEA (20 mg per kg, i.p.). Horizontal activity in an open field (Beltramo et al., *J. Neurosci.*, 20:3401-3407 (2000)) and pain threshold in the hot plate test (55°C) (Beltramo et al., *Science*, 277:1094-1097 (1997)) were measured 15 min after injection of vehicle or OEA (20 mg per kg). Rectal temperature was measured using a digital thermometer (Martin-Calderón et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 344:77-86. (1998)).

[195] *In situ* hybridization. Rats were accustomed to the handling and injection procedure for five days. On day six, vehicle or drug OEA (10 mg per kg, i.p.), or oleic acid (10 mg per kg) was administered, and the rats killed 60 min later by decapitation under anesthesia. *In situ* hybridization analyses were conducted using ^{35}S-labeled cRNA probes for c-*fos* (Guthrie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:3329-3333 (1993)) and choline acetyl transferase (ChAT) (Lauterborn et al., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 17:59-69 (1993)). Average hybridization densities were determined from at least three tissue sections per rat. Statistical significance was evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer post-hoc test for paired comparisons.

[196] Data analysis. Results are expressed as mean ± s.e.m of n separate experiments. The significance of differences among groups was evaluated using ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls post hoc test, unless indicated otherwise.

Example 3. Effects of Starvation on OEA and other FAE levels in the rat.

[197] In one embodiment, the invention provides methods of treatment wherein individuals needing to lose weight and/or body fat are tested for OEA levels before and/or during fasting.

Individuals with low levels of OEA prior to or in response to fasting are particularly then targeted for OEA treatment.

[198] Rats were deprived of food while periodically measuring FAE levels in cardiac blood by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to electrospray mass spectrometry (MS). Plasma OEA remained at baseline levels for the first 12 h of fasting, markedly increased at 18-24 h, and returned to normal at 30 h (Figure 1 a). No such effect was observed following water deprivation (Figure 1 b) or application of stressors such as restraint immobilization and lipopolysaccharide (LPS) administration [in pmol per ml; 10.3±0.8; 60 min after a 15-min immobilization, 8.4±1.6; 60 min after LPS injection (1 mg per kg), 7.0±0.7; n = 6-9]. Plasma PEA was not significantly affected by any of these treatments (data not shown), whereas anandamide decreased rapidly upon food removal, remaining lower than baseline for the entire duration of the experiment (Figure 1 d). Anandamide levels also declined after immobilization (in pmol per ml; control, 3.6±0.4; immobilization, 1.1±0.5; n = 7-8; $P < 0.01$), LPS treatment (control, 2.0±0.5; LPS, 0.2±0.2; n = 6; $P < 0.01$) and, though not significantly, water deprivation (Figure 1 e). These results indicate that circulating OEA levels increase transiently during starvation. This response is selective for OEA over anandamide and other FAEs, and coincides temporally with the rise in blood glycerol and β-hydroxybutyrate (Table 1), which signals the shift of energy metabolism from carbohydrates to fatty acids as primary fuel(Cahill, G. F., *Clin. Endocrinol. Metab.*, 5:397-415 (1976)).

[199] Table 1. Plasma level of β-hydroxybutyrate (β-HBA) and glycerol in fasting rats.

	β-HBA	**Glycerol**
Free feeding	1.2±0.4	4.6±0.9
2h fasted	1.2±0.2	5.3±0.6
4h fasted	0.8±0.1	9.1±1.8
8h fasted	1.3±0.2	6.3±0.4
12h fasted	4.6±0.8*	7.6±1.0
18h fasted	6.8±0.4*	8.4±0.4*
24h fasted	9.1±1.2*	8.4±0.3*

Concentrations are expressed in mg per dl. *$P < 0.05$, n = 3 per group.

[200] OEA levels in cerebrospinal fluid were not significantly affected by food deprivation (Figure 1 c), implying that the surge in plasma OEA may originate outside the CNS. To test

this hypothesis, the impact of starvation on OEA metabolism in various rat tissues was investigated. The biochemical route by which animal cells produce and degrade OEA and other FAEs is thought to comprise three key enzymatic steps. Calcium ion-stimulated NAT activity transfers a fatty acid group from the *sn*-1 position of a donor phospholipid to the primary amine of phosphatidylethanolamine, producing NAPE2 (Schmid et al., *Chem. Phys. Lipids*, 80:133-142 (1996); Piomelli et al., *Neurobiol. Dis.*, 5:462-473 (1998)). Cleavage of the distal phosphodiester bond in NAPE by an unknown phospholipase D generates FAEs (Schmid et al., *Chem. Phys. Lipids*, 80:133-142 (1996); Piomelli et al., *Neurobiol. Dis.*, 5:462-473 (1998)), which are eventually broken down to fatty acid and ethanolamine by an intracellular fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Schmid et al., *J. Biol. Chem.*, 260:14145-14149 (1985); Cravatt et al., *Nature*, 384:83-87 (1996)). Food deprivation (18 h) was accompanied by a marked increase in NAT activity in white adipose tissue (Figure 2 a), but not in the brain, stomach or kidney (Figure 2 b,d and data not shown). In liver, intestines and skeletal muscle, NAT activity was reduced by fast (Figure 2 c,d and data not shown). These enzymatic changes were paralleled by corresponding alterations in NAPE tissue content. Several molecular species of NAPE are present in rat tissues, including the OEA precursors alk-l-palmitoenyl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamine-N-oleyl (NAPE 1; Figure 3 a) and alk-1-palmityl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamine-N-oleyl (NAPE 2; Figure 3 a); and the PEA precursor alk-l-palmityl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-phosphoethanolamine-N-palmityl (not shown). In agreement with NAT activity measurements, food deprivation increased NAPE content in fat, and decreased it in liver (Figure 3 b,c).

[201] Since NAPE biosynthesis and FAE formation are tightly coupled processes (Cadas et al., H., *J. Neurosci.*, 17:1226-1242 (1997)), one might expect starvation to augment the levels of OEA and other FAEs in adipose, but not in other tissues. Accordingly, fat from starved rats contained more OEA and PEA than did fat from free-feeding controls (Figure 3 d and data not shown), whereas no such difference was seen in the brain, stomach, and intestines (data not shown). Contrary to our expectation, however, the liver content of OEA and PEA was also higher in food-deprived than in free-feeding rats (Figure 3 d and data not shown). This discordance may be due to an accumulation of FAEs by the liver, which is consistent with the postulated roles of this organ in FAE recapture and metabolism (Bachur et al., *J. Biol. Chem.*, 240:1019-1024 (1965); Schmid et al., *J. Biol. Chem.*, 260:14145-14149 (1985)).

[202] The hydrolysis to fatty acid and ethanolamine, catalyzed by FAAH, is a key step in FAE degradation (Bachur et al., *J. Biol. Chem.*, 240:1019-1024 (1965); Schmid et al., *J. Biol.*

Chem., 260:14145-14149 (1985); Cravatt et al., *Nature*, 384:83-87 (1996); Désarnaud et al., *J. Biol. Chem.*, 270:6030-6035 (1995)). Food deprivation profoundly reduced FAAH activity in adipose membranes, but had no effect on FAAH activity in the brain, liver, stomach, intestines, kidney and skeletal muscle (Figure 2 a-e and data not shown). Thus, food deprivation may increase the levels of OEA and other FAEs in white fat in two synergistic ways, which are mechanistically distinct from other reactions occurring during lipolysis: stimulation of NAT activity may lead to increase the biosynthesis of NAPE and FAEs, while inhibition of FAAH activity may prolong the life span of newly synthesized FAEs. Although several tissues may contribute to the normal levels of OEA in the bloodstream, the dynamic biochemical changes observed in fat underscore the crucial role of this tissue in generating OEA during starvation.

Example 4. Suppression of Food Intake by OEA and other FAEs.

[203] The effects of systemically administered OEA on food intake in rats can be assessed using a 24 h fast. In this system, OEA caused a dose- and time-dependent suppression of food intake (Figure 4 a,b). To define the selectivity of this response, various OEA analogs were evaluated for their ability to produce hypophagia.

[204] Anandamide and oleic acid had no effect.

[205] Palmitylethanolamide was active but significantly less potent than OEA.

[206] Elaidylethanolamide (an unnatural OEA analog) was similar in potency to OEA (Figure 4 a).

[207] These results indicate that OEA reduces eating in a structurally selective manner and that other fatty acid ethanolamide-like compounds can be identified for use according to the invention.

Example 5. Specificity over cannabinoid receptor activators.

[208] The molecular requisites for OEA hypophagia are distinct from those involved in the interaction of anandamide with its known cannabinoid targets (Khanolkar et al., *Life Sci.*, 65:607-616 (1999)). Cannabinoid receptor antagonists did not affect OEA hypophagia *in vivo*, and OEA did not displace cannabinoid binding to rat brain membranes *in vitro*. Thus, despite its structural and biogenetic relationships with anandamide, OEA does not depend on the endogenous cannabinoid system to produce anorexia.

Example 6. Sustained Body Weight Reduction

[209] In some embodiments, the compounds of the instant invention provide for a sustained fat reduction or body weight reduction upon prolonged administration to mammals. This effect is advantageous as a variety of drugs suppress eating after acute administration, but fail to do so when treatment is prolonged (Blundell, J., *Trends Pharmacol. Sci.*, 12:147-157 (1991)).

[210] OEA was subchronically administered to rats. Daily injections of OEA (5 mg per kg, i.p.) for seven days resulted in a small, but significant decrease in cumulative food intake (Figure 5 a), which was accompanied by a profound inhibition of weight gain (Figure 5 b, c). OEA did not affect water intake (Figure 5 d). The impact of OEA on body weight is only partially explained by its moderate reduction of food consumption indicating that other factors, such as stimulation of energy expenditure or inhibition of energy accumulation, may contribute to this effect.

Example 7. FAE's May Have a Peripheral Site of Action

[211] In one of its aspects, the invention provides compounds with a peripheral site of action. Such a site is advantageous in reducing the likelihood of central nervous system side effects.

[212] Though potent when administered peripherally, OEA was ineffective after direct injection into the brain ventricles (Table 2), suggesting that the primary sites of action of this compound might be located outside the CNS. As a further demonstration, sensory fibers in the vagus and other peripheral nerves were chemically destroyed by treating adult rats with the neurotoxin, capsaicin (Kaneko et al., *Am. J. Physiol.*, 275:G1056-G1062 (1998)). Capsaicin-treated rats failed to respond to peripherally administered cholecystokinin-8 (CCK-8) (Figure 6, a,c), drank more water than controls (Figure 6 b,d) and lost the corneal chemosensory reflex (data not shown), three indications that the neurotoxin had destroyed sensory afferents (MacLean, D. B., *Regul. Pept.*, 11:321-333 (1985); Ritter et al., *Am. J. Physiol.*, 248:R501-R504 (1985); Curtis et al., *Am. J. Physiol.*, 272:R704-R709 (1997)). Treated animals also failed to respond to OEA (10 mg per kg, i.p.), but responded normally to the compound CP-93129, which targets 5-HT_{1B} receptors in the CNS (Figure 6 a,c) (Lee et al., *Psychopharmacology*, 136:304-307 (1998)). These findings support the hypothesis that OEA causes hypophagia by acting at a peripheral site, and that sensory fibers are required for this effect.

[213] Table 2. Effects of intracerebroventricular pranamide on food intake.

	60 min	120 min	240 min
vehicle	5.8±0.6	8.0±0.5	9.5±0.5
prana 0.4 μg	4.8±0.4	6.6±0.4	8.4±0.4
prana 2 μg	4.9±0.4	6.6±0.6	8.7±0.5
prana 10 μg	5.9±0.2	8.1±0.4	9.6±0.7

Pranamide/OEA(prana, μg per animal) or vehicle (DMSO, 5 μl) was administered to 24 h food-deprived rats 15 min before food presentation. n = 12 per group.

[214] The compounds of the invention may use peripheral sensory inputs to suppress appetite. Peripheral sensory inputs related to appetite suppression recruit several CNS structures, which include the nucleus of the solitary tract (NST) in the brainstem and the arcuate and paraventricular (PVN) nuclei in the hypothalamus (Schwartz et al., *Nature*, 404:661-671 (2000)). To identify the brain pathways engaged during OEA-induced hypophagia, mRNA levels for the activity regulated gene c-*fos* (Curran et al., *Oncogene*, 2:79-84 (1987)) were mapped by *in situ* hybridization after systemic administration of OEA, oleic acid or vehicle. When compared to controls, OEA (10 mg per kg, i.p.) evoked a highly localized increase in c-*fos* mRNA levels in the PVN, supraoptic nucleus (Figure 7 a) and NST (Figure 7 c). This enhancement was specific to these areas, insofar as c-*fos* expression in other brain regions was not significantly affected by OEA treatment (Figure 7 b,d). The finding that OEA stimulates c-*fos* mRNA expression in the NST (which processes vagal sensory inputs to the CNS) and the PVN (a primary site for the orchestration of central catabolic signals) (Schwartz et al., *Nature*, 404:661-671 (2000)), is consistent with a physiological role for this lipid as a peripheral mediator of anorexia.

[215] It is possible that OEA reduced eating by inducing a non-specific state of behavioral suppression. If this is the case, OEA should cause conditioned taste aversion, which can be readily provoked in rats by a number of noxious substances (Green et al., *Science*, 173:749-751 (1971)), including lithium chloride (Figure 4 c). However, a maximal dose of OEA (20 mg per kg, i.p.) had little effect in this assay (Figure 4 c), suggesting that the compound may not be aversive. Several additional observations support the behavioral specificity of OEA. OEA did not alter water intake, body temperature, pain threshold (Figure 4 d-f), or activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis (Table 3). Moreover, OEA did not produce anxiety-like symptoms (Figure 4 g) and, though it reduced motor activity and operant

responses for food, it did so at a dose that was substantially higher than those required to produce hypophagia (Figure 4 h-i). This pharmacological profile differentiates OEA from other appetite suppressants such as amphetamine and glucagon-like peptide 1 (whose effects often include aversion, hyperactivity, anxiety and activation of the HPA axis) and from the endogenous cannabinoid anandamide (which stimulates food intake in partially satiated animals, increases pain threshold, decreases body temperature and activates the HPA axis) (Pertwee, R. G., *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 9:1553-1571 (2000)).

[216] Table 3. Effects of OEA on plasma hormone levels.

	B	PRL	LH
vehicle	212±24	10.8±2.7	5.3±0.9
prana 20	280±61	8.2±3.2	6.2±1.5

In Table 2, plasma corticosterone (B), prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH) levels were measured by radioimmunoassay in plasma samples collected 60 min after injection of vehicle or pranamide (prana, in mg per kg, i.p.) and are expressed in ng per ml. n = 6-9 per group.

[217] OEA elicits hypophagia at physiologically relevant doses. 1 hr after administration of a half-maximally effective dose (5 mg per kg, i.p.), circulating OEA levels (16.1±2.6 pmol per ml) were significantly higher than baseline (10.1±1.1; $P < 0.05$, Student's *t* test; n = 5), but below those measured in 18-h food-deprived animals (Figure 1 a). Thus, the concentrations reached by OEA in blood during starvation can be sufficient to elicit notable behavioral responses.

Example 8. Identifying body fat reducing compounds of the invention.

[218] The following example demonstrates how to identify appetite suppressors using OEA as a positive control. In particular, the synthesis of OEA, the measurement of body fat reduction and fatty acid oxidation are discussed.

Synthesis of OEA.

[219] Oleylchloride is purchased from Nu-Check Prep (Elysian, MN) or prepared following standard procedures. Oleylchloride is dissolved in dichloromethane (10 mg/ml) and allowed to react with five equivalents of ethanolamine for 15 min. at 0-4°C. The reaction is stopped by the addition of purified water. After vigorous stirring and phase separation, the upper

aqueous phase is discarded and the organic phase is washed twice with water to remove non-reacted ethanolamine. The resulting OEA is concentrated to dryness under a N_2 stream, reconstituted in chloroform at 20 mM, and stored at -20°C until use.

Measuring Body Fat Reduction Induced by Candidate Compounds

[220] The ability of a compound to reduce body fat can be evaluated by a number of methods. For example, appropriate amounts OEA and/or candidate compounds are administered to rats via intraperitoneal injection. The OEA and candidate compounds can be formulated in 70% DMSO in sterile saline, 5% Tween 80/5% propylenglycol in sterile saline, or 10% Tween 80/10% ethanol/80% saline. Five mg per kg of OEA can be used as the positive control. Amounts of candidate compounds administered may range, for instance, from 1-25 mg per kg. Typically 1, 2, 5, 10, 15, and 20 mg per kg doses of each candidate compound can be administered to different sets of rats to determine which dose is optimal. Injections may be given 30 minutes before the animals' principal meal for 7- 14 days.

[221] The effect of the candidate compound on total body fat can be determined by taking direct measurements of the rat's body fat using skin fold calipers. Skin on the rats' backs, abdomen, chest, front and rear legs can be pinched with calipers to obtain measurements before administration of OEA and/or candidate compounds and every 48 hours during and after administration of OEA and/or candidate compounds. Differences in measurements in at least two of the pinched sites reflect the change in the rat's total body fat.

Measuring Fatty Acid Oxidation Induced by Candidate Compounds

[222] Compounds can also be assayed for their effect on fatty acid metabolism. The effect of the candidate compound on fatty acid metabolism can be measured by measurements of fatty acid oxidation in primary cultures of liver cells. Hepatocytes may be used to determine the rate of oleate oxidation to ketone bodies and carbon dioxide. Such cells can be isolated from adult rat liver by enzymatic digestion as described by Beynen et al. in *Diabetes* 28:828 (1979). Cells typically are cultured in suspension and incubated in Krebs-Henseleit's bicarbonate medium supplemented with bovine serum albumin and glucose as described by Guzmán & Geelen, *Biochem. J.* 287:487(1992). The protein concentration of the cultured cells can be determined and cells seeded in 2 ml media so that 4-6 mg protein per ml is present in the reaction mixture. Cells can be incubated for 10 minutes at 37°C with [^{14}C]-oleic acid (Amersham), in the presence or absence of 10 μM OEA, reactions may be stopped

with 200 µl 2M perchloric acid and acid-soluble products extracted with chloroform/methanol/water (5:1:1, vol:vol:vol). The aqueous phase can be removed and washed twice more. Protein concentration can be determined using a Lowry assay. The rate of oleate conversion into ketone bodies may be expressed as nmol of oleate oxidized per hour per mg protein and may be determined using liquid scintillation counting. Accordingly, OEA enhances oleate oxidation by 21+-6% (n=4, $p<0.01$ vs. control incubations by the Student t test).

Example 9. Effect of OEA on fatty acid metabolism.

[223] Oleoylethanolamide (OEA) decreases body weight not only by suppressing appetite, but also by possibly enhancing body fat catabolism. The effects of OEA on fatty acid oxidation in major body-fat burning tissues (soleus muscle, liver, cultured cardiac myocytes and astrocytes) was examined. OEA significantly stimulates fatty acid oxidation in primary cultures of liver, skeletal muscle (soleus) and heart cells, whereas it has no effect in brain-derived astroglial cell cultures. In addition, OEA induces a significant mobilization of triacylglycerol stores from primary white adipose tissue cells. Table 4 details the methods and effects of OEA on fatty acid oxidation in these cells. Structure-activity relationship experiments provide evidence that the effect of OEA on skeletal muscle fatty acid oxidation is specific (Figure 8). Thus, the effects of OEA are mimicked by the hydrolysis-resistant homologue methyl-OEA and -only partially- by palmitylethanolamide (PEA), but not by arachidonylethanolamide (AEA) or oleic acid (OA). In short, these results show that lipid oxidation and mobilization are enhanced by OEA, and that the effects of OEA are restricted to peripheral sites.

Table 4.

Cell/tissue	Hepatocyte	Soleus muscle	Cardiomyocyte	Astrocyte	Adipocyte
Origin	Adult rat liver	Adult rat hind limb	Newborn rat heart	Newborn rat brain cortex	Adult rat epididymus
Isolation procedure	Enzymatic digestion (Beynen et al., 1979)	Dissection (Chiasson, 1980)	Enzymatic digestion (Flink et al., 1992)	Enzymatic digestion (McCarthy & De Vellis, 1980)	Enzymatic digestion (Rodbell, 1964)
Type of culture	Cell suspension	Tissue suspension	Cell monolayer	Cell monolayer	Cell suspension
Incubation medium	Krebs-Henseleit bicarbonate plus BSA and glucose (Guzman & Geelen, 1992)	Krebs-Henseleit Hepes plus BSA and glucose (Fruebis et al., 2001)	High-glucose DMEM plus BSA (Wu et al., 2000)	Hams F12/DMEM plus insulin, transferrin, progesterone, putrescine and selenite (Blazquez et al., 1998)	Krebs-Henseleit Hepes plus BSA and glucose (Rodbell, 1965)
Metabolic parameter	[^{14}C]oleate oxidation to ketone bodies (Guzman & Geelen, 1992)	[^{14}C]oleate oxidation to CO_2 (Fruebis et al., 2001)	[^{14}C]oleate oxidation to CO_2 (Blazquez et al., 1998)	[^{14}C]oleate oxidation to ketone bodies (Blazquez et al., 1998)	Lypolysis (glycerol release) (Serradeil-Le Gal et al., 2000)
Incubation time (min)	10	30	30	30	30
Stimulatory effect of 10 μM OEA (%)	21±6 (n=4)	36±10 (n=4)	37±9 (n=3)	2±6 (n=3)	38±16 (n=3)
Statistical significance vs. control	P<0.01	P<0.01	P<0.01	Non significant	P<0.01

[224] References cited: Beynen AC et al., *Diabetes* 28:828-835 (1979); Blazquez C et al., *J Neurochem* 71:1597-1606 (1998); Chiasson RB "Laboratory Anatomy of the White Rat" WCB, Dubuque, Iowa (1980); Funk IL et al., *J Biol Chem* 267:9917-9924 (1992); Fruebis J et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2005-2010 (2001); Guzman M et al., *Biochem J* 287:487-492 (1992); McCarthy KD et al., *J Cell Biol* 85:890-902 (1980);Rodbell M *J Biol Chem* 239:375-380 (1964);Rodbell M *Ann NY Acad* Sci 131:302-314 (1965); Serradeil-Le Gal C et al., *FEBS Left* 475:150-156 (2000);Wu W et al., *J Biol Chem* 275:40133-40119 (2000).

Example 10. Role of endogenous OEA in the intestines.

[225] The impact of feeding on intestinal OEA biosynthesis was studied. High performance liquid chromatography/mass spectrometry analyses revealed that small intestinal tissue from free-feeding rats contains substantial amounts of OEA (354±86 pmol per g, n =3). Intestinal OEA levels were markedly decreased after food deprivation, but returned to baseline after refeeding. By contrast, no such changes were observed in stomach (in pmol per g; control, 210±20; starvation, 238±84; starvation/refeeding, 239±60, n = 3). Variations in intestinal OEA levels were accompanied by parallel alterations in NAT activity, which participates in OEA formation, but not in fatty acid amide hydrolase activity, which catalyzes OEA hydrolysis. These findings suggest that starvation and feeding reciprocally regulate OEA biosynthesis in small intestine. In agreement with an intra-abdominal source of OEA, plasma OEA levels in starved rats were found to be higher in portal than in caval blood (in pmol per ml; porta, 14.6±1.8; cava, 10.3±2.8; n = 5). The contribution of other intra-abdominal tissues to OEA formation cannot be excluded at present. These results suggest many interventions to utilize the OEA systems in feeding behavior. According to this model, food intake may stimulate NAT activity enhancing OEA biosynthesis in the small intestine and possibly other intra-abdominal tissues. Newly produced OEA may activate local, sensory fibers, which may in turn inhibit feeding by engaging brain structures such as the NST and PVN.

[226] Our results reveal an unexpected role for OEA in the peripheral regulation of feeding, and provide a framework to develop novel medicines for reducing body weight or body fat, for preventing body weight gain or body fat increase, for suppressing appetite or reducing food seeking behavior, or food intake, and for the treating eating disorders,overweight, or obesity. These medicines would include not only OEA analogues and homologues but also agents which controlling OEA levels by acting upon the OEA formation and hydrolyzing systems and enzymes as disclosed above.

[227] All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by reference to the extent not inconsistent with the present disclosure as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

[228] Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of reducing food intake in a mammal, said method comprising administering to said mammal a fatty acid alkanolamide, wherein said administering is in an effective amount to reduce food intake in said mammal.

2. The method according to claim 1, wherein the fatty acid alkanolamide is oleoylethanolamide.

3. The method of claim 1, wherein the fatty acid alkanolamide comprises a fatty acid moiety covalently bonded to an ethanolamine moiety via an amide linkage.

4. The method of claim 3, wherein the fatty acid moiety is monounsaturated or polyunsaturated.

5. The method of claim 1, wherein the administering is via a dermal patch.

6. The method of claim 4, wherein the fatty acid moiety is oleic acid.

7. The method of claim 3, wherein the fatty acid moiety has from 12 to 20 carbon atoms.

8. The method of claim 3, wherein the fatty acid is selected from the group consisting of elaidic acid, palmitoleic acid, palmitic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid, and gamma-linolenic acid.

9. The method of claim 3, wherein the hydroxy group of the ethanolamine moiety is substituted with a lower (C_1-C_3) alkyl group to form the corresponding ether.

10. The method of claim 3, wherein the hydroxy group of the ethanolamine moiety is bound to a the carboxylate group of a lower (C_2-C_6) alkyl carboxylic acid to form the corresponding ester.

11. The method of claim 3, wherein the fatty acid ethanolamide further comprises a lower alkyl (C_1-C_3) group covalently bound to the nitrogen atom of the fatty acid ethanolamide.

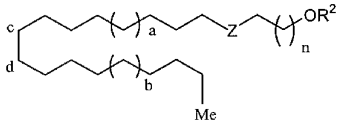
12. A method according to claim 1, wherein the mammal is human.

13. A method according to claim 1, wherein the fatty acid alkanolamide is palmitoylethanolamide.

14. A method according to claim 1, wherein the fatty acid alkanolamide does not activate the cannabinoid CB2 or the cannabinoid CB1 receptor.

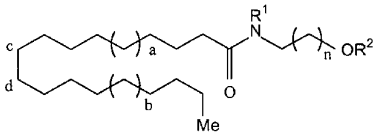
15. A method according to claim 1, wherein said fatty acid alkanolamide is administered with a pharmaceutically acceptable carrier by an oral, rectal, topical, or parenteral route.

16. A method of reducing or controlling body fat or body weight in a mammal, said method comprising administering to said mammal, in an effective amount to reduce body fat or body weight, a compound of the formula



or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein n is from 0 to 5, the sum of a and b can be from 0 to 4; Z is a member selected from the group consisting of –C(O)N(R^o)-; -(R^o)NC(O)-; -OC(O)-; -(O)CO-; O; NR^o; and S; and wherein R^o and R^2 are members independently selected from the group consisting of unsubstituted or unsubstituted alkyl, hydrogen, C_1 –C_6 alkyl, and lower (C_1-C_6) acyl, and wherein up to four hydrogen atoms of the fatty acid portion and alkanol portion thereof are substituted by methyl or a double bond, and the bond between carbons c and d may be unsaturated or saturated.

17. A method of claim 16, said compound is of the formula:



or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein n is from 0 to 4, the sum of a and b is from 1 to 3, and R^1 and R^2 are members independently selected from the group comprising hydrogen, C_1 –C_6 alkyl, and lower (C_1-C_6) acyl, and wherein up to four hydrogen atoms of the fatty acid portion and alkanolamine portion thereof are substituted by methyl or a double bond, and the bond between carbons c and d may be unsaturated or saturated.

18. The method of claim 17, wherein R^1 and R^2 are members independently selected from the group comprising hydrogen, C_1 –C_3 alkyl, and lower (C_1-C_3) acyl.

19. The method of claim 17, wherein a = 1 and b= 1.

20. The method of claim 17, wherein n = 1.

21. The method of claim 17, wherein R^1 and R^2 are each H.

22. The method of claim 17, wherein the bond between carbon c and carbon d is a double bond.

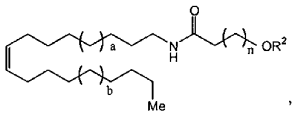
23. The method of claim 17, wherein the compound is oleoylethanolamide.

24. The method of claim 17, wherein the compound is palmitoylethanolamide

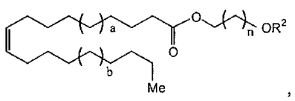
25. The method of claim 17, wherein the administering is parenteral, oral, transdermal, rectal, or intranasal.

26. The method of claim 17, wherein the mammal is a human.

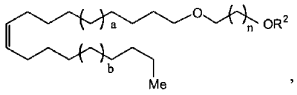
27. The method of claim 16, wherein the compound is according to one of the following formulae:



,



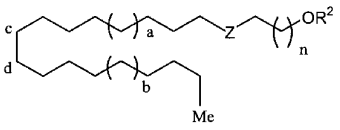
, and



,

wherein n is from 1-5 and the sum of a and b is from 0 to 4; R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, C_1 –C_6 alkyl, and lower (C_1-C_6) acyl; and up to four hydrogen atoms of the fatty acid portion and alkanol portion thereof may also be substituted by methyl or a double bond.

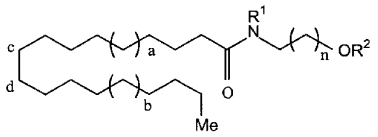
28. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable excipient and a compound of the formula:



or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein n is from 0 to 5, the sum of a and b can be from 0 to 4; Z is a member selected from the group consisting of –C(O)N(R^o)-; -(R^o)NC(O)-; -OC(O)-; -(O)CO-; O; NR^o; and S; and wherein R^o and R^2 are members independently selected from the group consisting of unsubstituted or unsubstituted alkyl, hydrogen, C_1 –C_6 alkyl, and lower (C_1-C_6) acyl, and wherein up to four hydrogen

atoms of the fatty acid portion and alkanol portion thereof are substituted by methyl or a double bond, and the bond between carbons c and d may be unsaturated or saturated.

29. A pharmaceutical composition of claim 28, wherein the compound is of the formula:



or a pharmaceutically acceptable salt of the compound, wherein n is from 1 to 3, the sum of a and b is from 1 to 3, and R^1 and R^2 are members independently selected from the group consisting of hydrogen, C_1 –C_6 alkyl, and lower (C_1-C_6) acyl and wherein up to four hydrogen atoms of the fatty acid portion and alkanol portion thereof are substituted by methyl or a double bond, and the bond between carbons c and d may be unsaturated or saturated.

30. The composition of claim 29, wherein said composition is in unit dosage format and the unit dose contains an effective amount of the compound to reduce or control body weight.

31. The composition of claim 29, wherein the amount is about from 10 to 1000 mg.

32. The composition of claim 29, wherein the amount is about from 1 to 100 mg.

33. The composition of claim 29, wherein the amount is about from 100 to 500 mg.

34. The composition of claim 29, wherein the compound is palmitoylethanolamide.

35. The composition of claim 29, wherein the composition is a topical composition, an oral composition, or a parenteral composition.

36. The composition of claim 29, wherein R^1 and R^2 are members independently selected from the group comprising hydrogen, C_1 –C_3 alkyl, and lower (C_1-C_3) acyl.

37. The composition of claim 29, wherein a = 1 and b= 1 and n =1.

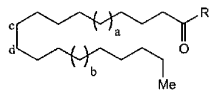
38. The composition of claim 29, wherein the compound is oleoylethanolamide.

39. The composition of claim 29, wherein R^1 and R^2 are each H.

40. The composition of claim 30, wherein the bond between carbon c and carbon d is a double bond.

41. The composition of claim 30, wherein the compound is palmitylethanolamide.

42. The pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable excipient and a compound of the formula:



wherein the sum of a and b is from 0 to 4, and up to four hydrogen atoms of the fatty acid portion of the above formula may also be substituted by methyl or a double bond; and the molecular bond between carbons c and d may be unsaturated or saturated and R represents group selected from the group consisting of straight and branched chain alkyl amines, a cyclic alkyl amine, a furan, tetrahydrofuran, a pyrole, pyrollidine, and a pyridine; and wherein the compound is present in an effective amount for reducing food intake upon administration to a mammal.

43. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable excipient and a fatty acid alkanolamide in an effective amount for reducing body weight upon administration to a mammal.

44. The composition of claim 46, wherein the fatty acid moiety is oleic acid.

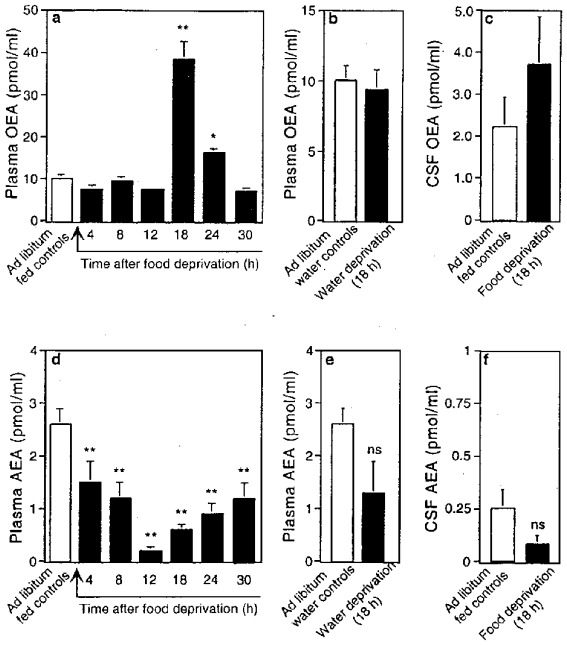
45. The composition of claim 46, wherein the fatty acid moiety has from 12 to 20 carbon atoms.

46. The composition of claim 46, wherein the fatty acid is selected from the group consisting of elaidic acid, palmitoleic acid, palmitic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid, and gamma-linolenic acid.

47. The composition of claim 46, wherein the alkanolamine of the alkanolamide is ethanolamine.

48. The composition of claim 46, wherein the composition is an enteric-coated oral formulation.

Figure 1


a
Plasma OEA (pmol/ml)
Ad libitum fed controls
4
8
12
18
24
30
Time after food deprivation (h)
b
Plasma OEA (pmol/ml)
Ad libitum water controls
Water deprivation (18 h)
c
CSF OEA (pmol/ml)
Ad libitum fed controls
Food deprivation (18 h)
d
Plasma AEA (pmol/ml)
Time after food deprivation (h)
e
Plasma AEA (pmol/ml)
ns
f
CSF AEA (pmol/ml)
ns

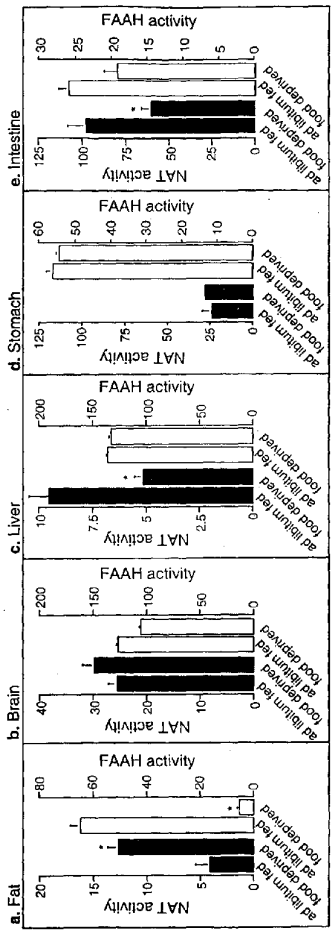

FAAH activity
NAT activity
e. Intestine
d. Stomach
c. Liver
b. Brain
a. Fat
ad libitum fed
food deprived
ad libitum fed
food deprived

Figure 2

Figure 3

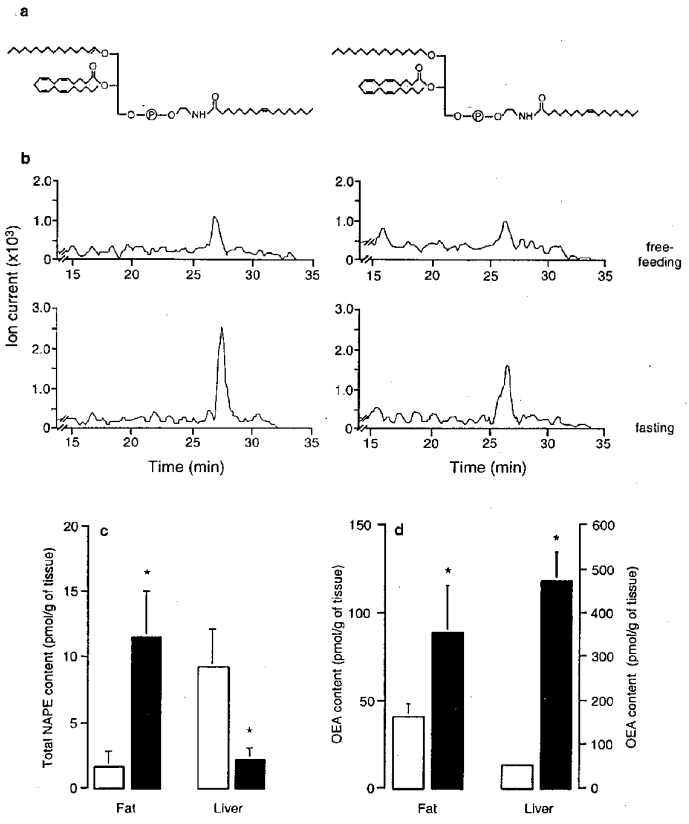

a
b
Ion current (x10³)
free-feeding
fasting
Time (min)
Time (min)
c
Total NAPE content (pmol/g of tissue)
Fat
Liver
d
OEA content (pmol/g of tissue)
OEA content (pmol/g of tissue)
Fat
Liver

Figure 4

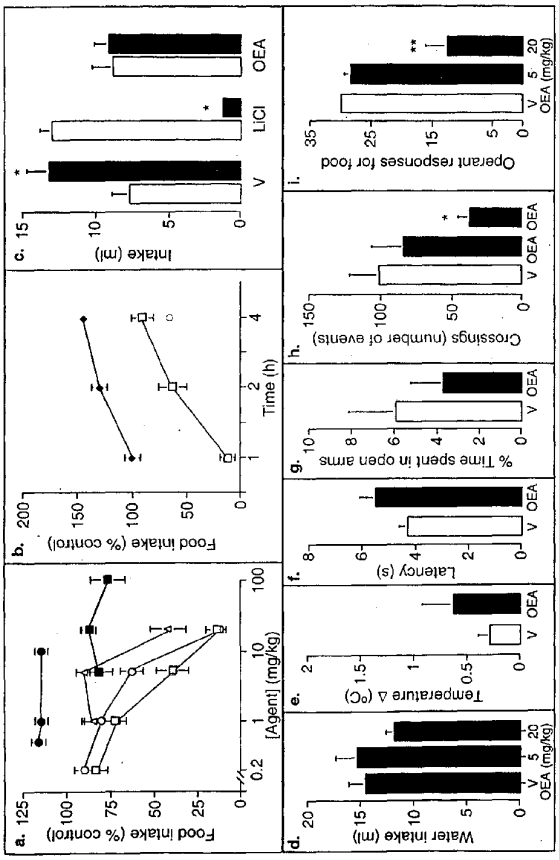

a.
Food intake (% control)
[Agent] (mg/kg)
b.
Food intake (% control)
Time (h)
c.
Intake (ml)
V
LiCl
OEA
d.
Water intake (ml)
OEA (mg/kg)
e.
Temperature Δ (°C)
f.
Latency (s)
g.
% Time spent in open arms
h.
Crossings (number of events)
i.
Operant responses for food

Figure 5

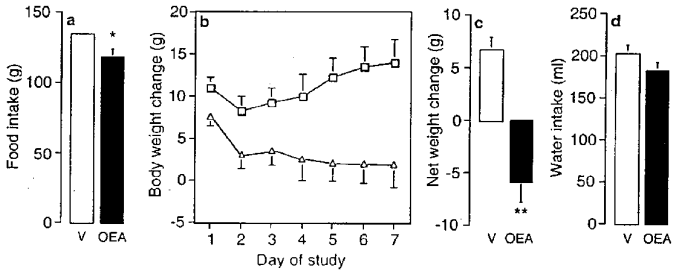

a
Food intake (g)
150
100
50
0
*
V
OEA
b
Body weight change (g)
20
15
10
5
0
-5
1
2
3
4
5
6
7
Day of study
c
Net weight change (g)
10
5
0
-5
-10
**
V
OEA
d
Water intake (ml)
250
200
150
100
50
0
V
OEA

Figure 6

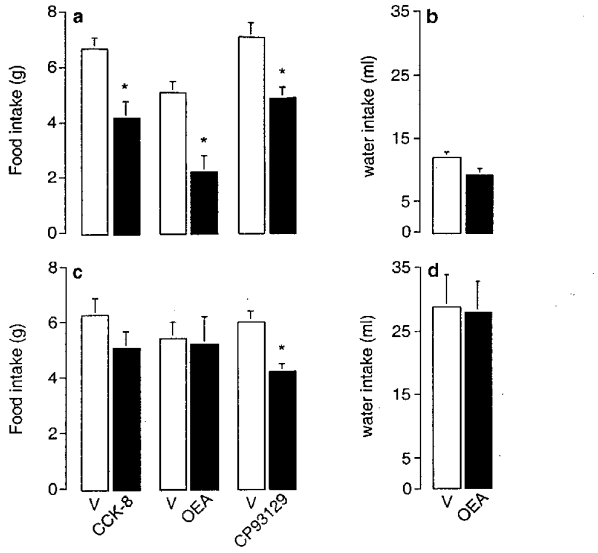

a
b
c
d
Food intake (g)
water intake (ml)
0
2
4
6
8
5
15
25
35
V
CCK-8
OEA
CP93129

Figure 7

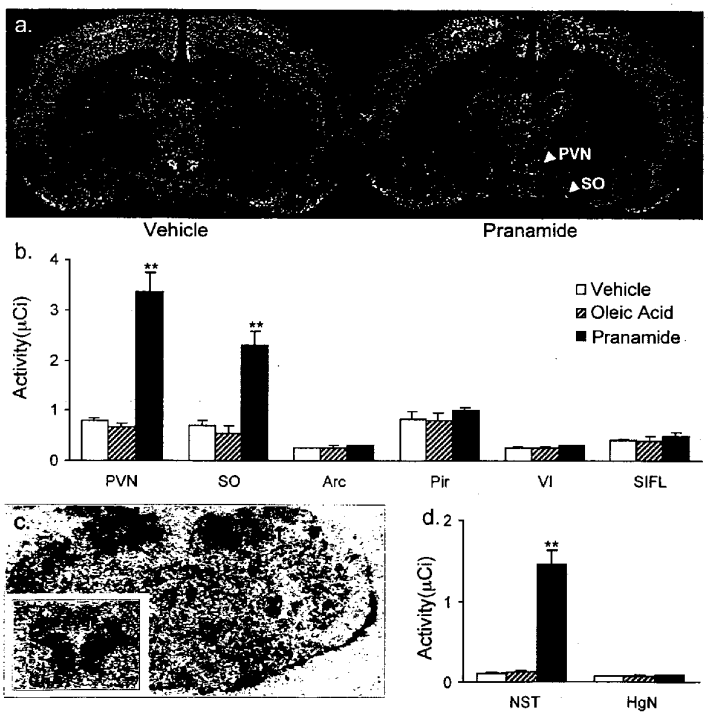
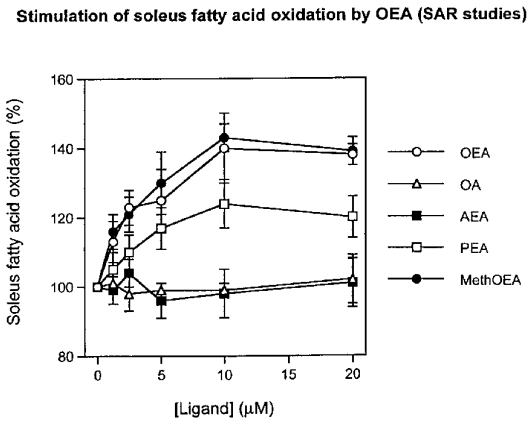

a.
PVN
SO
Vehicle
Pranamide
b.
Activity(μCi)
Vehicle
Oleic Acid
Pranamide
PVN
SO
Arc
Pir
VI
SIFL
c.
d.
Activity(μCi)
NST
HgN

Figure 8


Stimulation of soleus fatty acid oxidation by OEA (SAR studies)
Soleus fatty acid oxidation (%)
160
140
120
100
80
0
5
10
15
20
[Ligand] (μM)
OEA
OA
AEA
PEA
MethOEA

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/09773

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) :A61K 31/16
US CL :514/613; 625; 627; 909
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. :514/613; 625; 627; 909

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	US 6,348,498 B1 (CALIGNANO et al.) 19 February 2002, entire document.	1-48

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 25 JUNE 2002	Date of mailing of the international search report 18 OCT 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Valerie Bell-Harris for DEBORAH D. CARR Telephone No. (703) 308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)★

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 31/40	Ａ６１Ｋ 31/40	
Ａ６１Ｋ 31/44	Ａ６１Ｋ 31/44	
Ａ６１Ｐ 3/04	Ａ６１Ｐ 3/04	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ピオメリ, ダニエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２６１２, アーバイン, バレイ ビュー ３
(72)発明者 デ フォンセカ, フェルナンド ロドリゲズ
スペイン国 ２９７６０ マラガ, リンコン デ ラ ビクトリア, アニョレターゴルフ, ウルバニザシオン ラス ミモーサス １８

Ｆターム(参考) 4B018 MD18 ME01
4C086 AA01 AA02 BA03 BC05 BC07 BC17 MA01 MA04 MA52 MA55 MA59 MA60 MA63 NA14 ZA70
4C206 AA01 AA02 CA23 DB07 DB45 GA03 GA25 MA01 MA04 MA72 MA75 MA79 MA80 MA83 NA14 ZA70