

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 780

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-985**
(22) Přihlášeno: **31.12.2014**
(40) Zveřejněno: **09.03.2016**
(Věstník č. 10/2016)
(47) Uděleno: **27.01.2016**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **09.03.2016**
(Věstník č. 10/2016)

(56) Relevantní dokumenty:

US 2013/0 196 354 A1; US 2013/0066053 A1; US 6 013 648.

(73) Majitel patentu:

Vysoká škola chemicko- technologická v Praze,
Praha 6, CZ

(72) Původce:

Ing. Martin Kuchař, Ph.D., Kladno - Kročehlavy,
CZ

Ing. Anna Šuláková, Kopřivnice, CZ

Ing. Lucie Fojtíková, Hať, CZ

prof. Dr. RNDr. Oldřich Lapčík, Praha 6, CZ

(74) Zástupce:

PATENT SKY s. r. o., Ing. Petra Kolářová, Dušní
8/11, 110 00 Praha 1

(54) Název vynálezu:

**Derivát syntetického kanabinoidu, způsob
jeho přípravy a použití**

(57) Anotace:

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

CZ 305780 B6

Derivát syntetického kanabinoidu, způsob jeho přípravy a použitíOblast techniky

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

Dosavadní stav techniky

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

Početně nejbohatší a ze strukturního hlediska značně rozmanitou skupinou NSD jsou syntetické kanabinoidy. Tyto látky se váží na kanabinoidní receptory, což jsou s G-proteinem spřažené transmembránové receptory. Podtyp receptoru CB1 se nachází především v centrální nervové soustavě, podtyp CB2 je exprimován zejména v buňkách imunitního systému. Endokanabinoidní systém dodnes nebyl zcela pochopen. Je však známo, že endogenní kanabinoidy, jejichž nejznámějším zástupcem je anandamid, ovlivňují citění bolesti, náladu, paměť, ale i chuť k jídlu. Ke kanabinoidním receptorům se váže též celá řada exogenních sloučenin, k nejvýznamnějším patří aktivní složky konopí Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC) a kanabidiol (CBD), které jsou parciálními agonisty obou zmíněných podtypů receptorů. Syntetické kanabinoidy jsou plní agonisté kanabinoidních receptorů s mnohem dramatičtějšími psychickými účinky. Zaznamenána byla celá řada intoxikací, které měly v některých případech i fatální důsledky. Popsány jsou i případy indukované psychózy. (Banister SD, Wilkinson SM, Longworth M, Stuart J, Apetz N, English K, Brooker L, Goebel C, Hibbs DE, Glass M, Connor M, McGregor IS, Kassiou M. *The Synthesis and Pharmacological Evaluation of Adamantane-Derived Indoles: Cannabimimetic Drugs of Abuse*. *Chem. Neurosci.* 2013;4:1081–92.)

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

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

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

20 Podstata vynálezu

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

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

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

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

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

Způsob přípravy derivátů syntetických kanabinoidů

Zatímco 4-benzyloxybenzoová kyselina byla připravena standardním, v literatuře popsaným způsobem, pro přípravu 4-benzyloxynaftalen-1*karboxylové kyseliny je představena inovativní syntetická cesta. V molekule 1-benzyloxy4-bromnaftalenu je brom nejprve nahrazen nitrilovou funkční skupinou při Rosenmundově – von Braunově reakci. Redukce získaného nitrilu diisobutylaluminium hydridem a zpětná oxidace aldehydu oxidem stříbrným, připravovaným in situ z dusičnanu stříbrného a hydroxidu sodného, umožní zavést do molekuly karboxylovou funkční skupinu s vyšším výtěžkem, než publikovaný postup založený na lithiaci a následné reakci organokovového species s oxidem uhličitým, přestože je reakční sekvence delší.

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

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

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

Přehled obrázků na výkresech

35

Obr. 1: Schéma syntézy haptenu V

Obr. 2: Schéma syntézy haptenu VI

40

Obr. 3: Schéma provedené konjugace haptenu s BSA

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

45

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

50

Obr. 6: Schematický průběh nepřímé kompetitivní ELISA; **A** imobilizace konjugátu na stěny jamek mikrotitrační destičky; **B** aplikace kompetujících složek; **C** aplikace sekundární protilátky značené enzymem (peroxidázou); **D** aplikace substrátu pro peroxidázu; **E** enzymová reakce peroxidázy se substrátem; **F** zastavení enzymové reakce kyselinou sírovou; ● imobilizační konjugát; ● cílový analyt ve vzorku; Y primární protilátka; K^e sekundární protilátka značená enzymem; ● substrát pro peroxidázu.

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

5 Obr. 8: Chemická struktura haptenu V

Obr. 9: Chemická struktura haptenu VI

10 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

15 Syntéza haptenu V

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

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

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

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.61 - 0.75 (m, 5 H), 1.03 (q, *J*=7.20 Hz, 2 H), 1.30 (t, *J*=7,50 Hz, 2 H), 1.96 - 2,14 (m, 2 H), 2.55 (t, *J*=6.60 Hz, 2 H), 3.58 (t, *J*=6.60 Hz, 3 H), 4.58 (quint, *J*=6.60 Hz, 1 H), 5.61 (s, 1 H), 7.11 - 7.23 (m, 4 H, ArH), 7.38 (d, *J*=6.90 Hz, 1 H, ArH), 7.46 - 7.53 (m, 3 H, ArH), 7.91 - 7.95 (m, 3 H, ArH), 7.47 (d, *J*=7.50 Hz, 1 H, ArH). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.86, 22.06, 23.90, 28.37, 28.78, 32.21, 46.32, 49.26, 108.17, 109.32, 121.62, 122.63, 122.88, 122.91, 125.90, 126.97, 127.43, 127.80, 128.69, 128.84, 128.89, 130.78, 131.65, 134.92, 135.22, 139.76, 167.09, 178.47. IČ (CHCl₃): 3130, 3067, 3050, 2955, 2927, 2872, 2855, 2700, 2628, 1704. 1626. 1589. 1572. 1523, 1509, 1484, 1466, 1449, 1415, 1395, 1377, 1359, 1311, 1292, 1281, 1249, 1226, 1199, 1164, 1125, 1115, 1073, 1015, 953, 927, 896, 857, 803, 789, 777, 744, 680, 658, 569, 421. HRMS-ESI: monoisotopická hmota: 442.22564 Da, nalezeno (*m/z*) 443.23304 (vypočteno 443.23292) odpovídá iontu [M+H]⁺ připravené látky.

Příklad 2

Syntéza haptenu VI

- 5 Ethyl-4-(adamantan-1-ylamino)butanoát hydrochlorid (275 mg, 0,91 mmol) byl rozpuštěn v suchém dichlormethanu (25 mL), k roztoku byl přidán triethylamin (407 μ L, 2,92 mmol). Po 2 hodinách byl stříkačkou přikapán roztok 1-pentyl-1*H*-indol-3-karbonylchloridu (250 mg, 1,00 mmol) v suchém dichlormethanu (5 mL), reakční směs byla 20 hodin míchána při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek extrahován mezi ethyl-acetát a vodu. Organic-
- 10 ká fáze byla postupně promyta třemi podíly 1 mol/l kyseliny chlorovodíkové, třemi podíly nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného, poté byla vysušena pomocí síranu hořečnatého. Ethyl-acetát byl odpařen a produkt přečištěn sloupcovou chromatografií (hexan-aceton, gradient 99/1 $\rightarrow$ 4/5). Byl izolován produkt ethyl-4-[*N*-(adamantan-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanoát (201 mg, 0,42 mmol) ve výtěžku 46 %.
- 15 Ethyl-4-[*N*-(adamantan-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanoát (180 mg, 0,38 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (20 mL), k roztoku byl stříkačkou přikapán 1M roztok hydroxidu sodného (34 mg, 0,85 mmol) ve vodě. Reakce probíhala 90 minut při teplotě 60 °C. Ethanol byl odpařen, vodná fáze byla zředěna 1 mol/l roztokem kyseliny chlorovodíkové a protřepána se dvěma podíly dichlormethanu. Organické extrakty byly spojeny a vysušeny pomocí síranu
- 20 hořečnatého. Dichlormethan byl odpařen a produkt přečištěn sloupcovou chromatografií (dichlormethan-methanol, gradient 99/1 $\rightarrow$ 10/1). Byl izolován produkt 4-[*N*-(adamantan-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanová kyselina (45 mg, 0,10 mmol) ve výtěžku 27 %.
- 1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.80 (t, J=6.90 Hz, 3 H, CH₃), 1.19 - 1.27 (m, 4 H, 2xCH₂), 1.61 - 1.78 (m, 10 H, 3xCH₂), 2.01 (t, J=7.50 Hz, 2 H, CH₂COOH), 2.08 (s, 3 H, CH-CH₂-CH),
- 25 2.28 (s, 6 H, CH₂-CH-CH₂), 3.54 (t, J=7.35 Hz, 2 H, NCH₂), 4.00 (t, J=7.20 Hz, 2 H, NCH₂), 7.06 - 7.25 (m, 3 H, ArH), 7.37 (s, 1 H, ArH), 7.48 (d, J=7,50 Hz, 1 H, ArH). 13C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 14.02, 22.38, 27.98, 29.17, 29.81, 30.39, 31.16, 36.73, 40.91, 46.06, 49.72, 58.42, 110.04, 114.48, 120.24, 120.71, 122.18, 125.54, 130.55, 135.75, 169.62, 177.69. IČ (CHCl₃): 3118, 3055, 2956, 2927, 2901, 2850, 2701, 2589, 2499, 1724, 1709, 1613, 1561, 1539,
- 30 1466, 1452, 1415, 1392, 1356, 1341, 1322, 1307, 1273, 1213, 1183, 1142, 1119, 1074, 1053, 1014, 979, 893, 854, 780, 741, 702, 573, 524, 436. HRMS-ESI: monoisotopická hmota: 450.28824 Da, nalezeno (m/z) 451.29553 (vypočteno 451.29552) odpovídá iontu [M+H]⁺ a 473.27723 (vypočteno 473.473,27746) odpovídá iontu [M+Na]⁺ připravené látky.

35

Příklad 3

Provedení nepřímé nekompetitivní ELISY

- 40 Imobilizace konjugátu na stěny jamek mikrotitrační destičky

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

45

Aplikace kompetujících složek

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

Aplikace sekundární protilátky

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

10 Aplikace substrátu pro peroxidázu

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

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

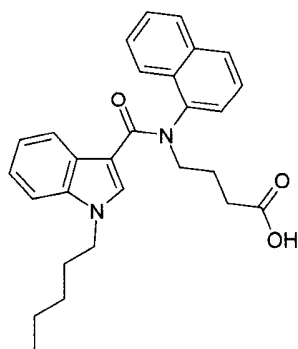
20 Průmyslová využitelnost

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

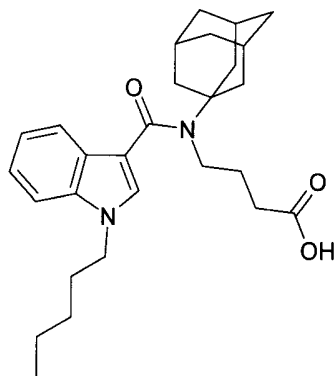
PATENTOVÉ NÁROKY

30 1. Derivát syntetického kanabinoidu o názvu 4-[N-(**R**₂-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanová kyselina, přičemž **R**₂ je naftalen nebo adamantan.

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

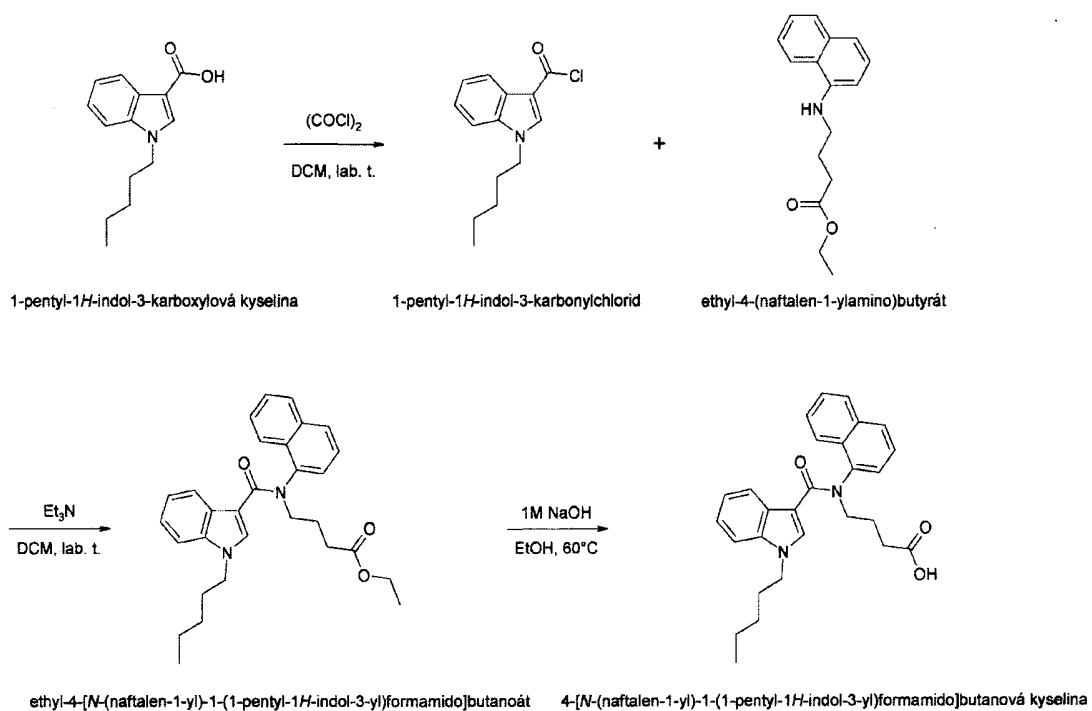


40 3. Derivát syntetického kanabinoidu podle nároku 1 o názvu 4-[N-(adamantan-1-yl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)formamido]butanová kyselina a struktura:

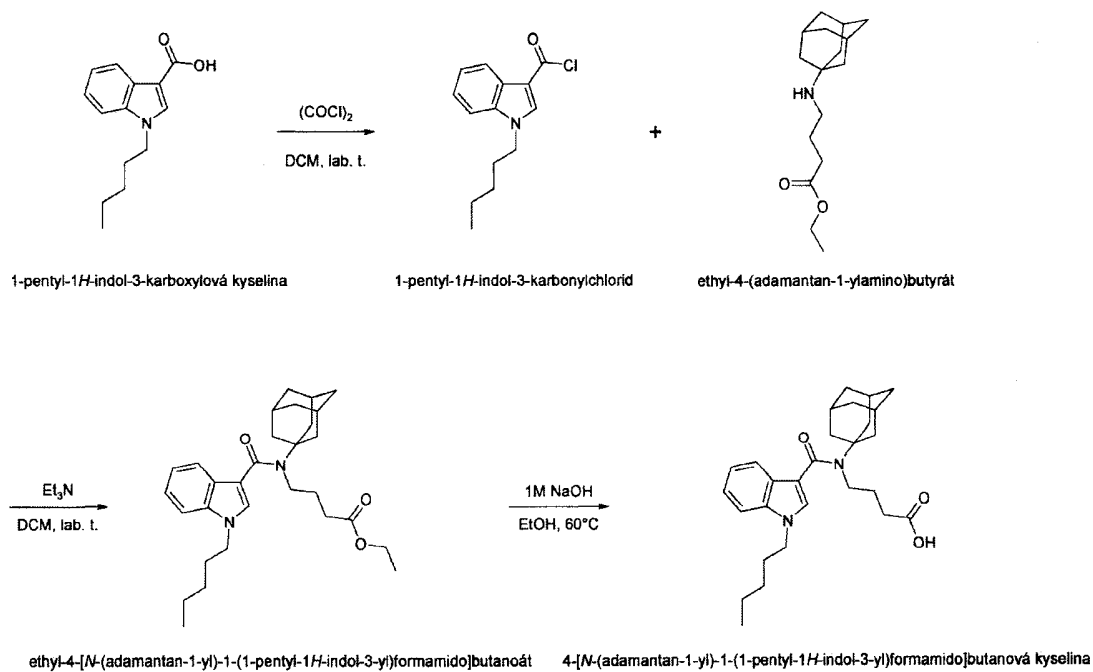


4. Způsob přípravy derivátu syntetického kanabinoidu podle nároku 1 až 3, **vyznačující se tím**, že výchozí adamantyl/naftylamin se podrobí *N*-alkylaci, kdy se přidá ethyl-ester ω -bromalkanové kyseliny, ke vzniklému sekundárnímu aminu se přidá chlorid 1-alkylindol-3-karboxylové kyseliny a provede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

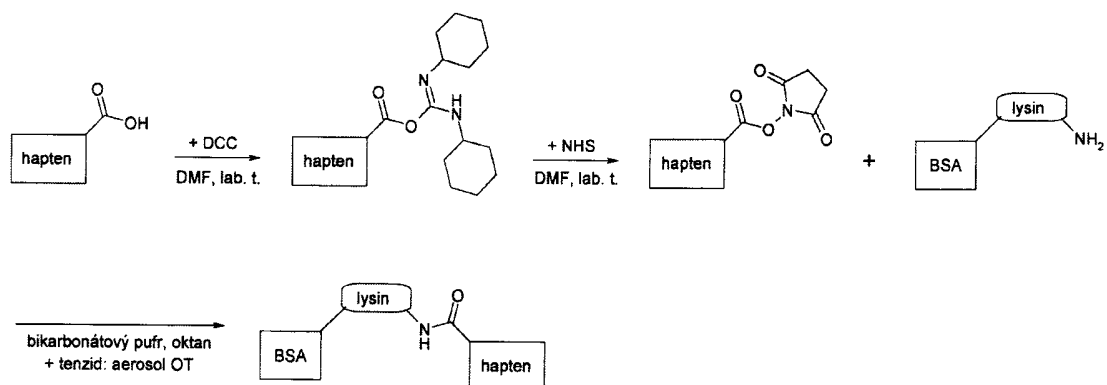
4 výkresy



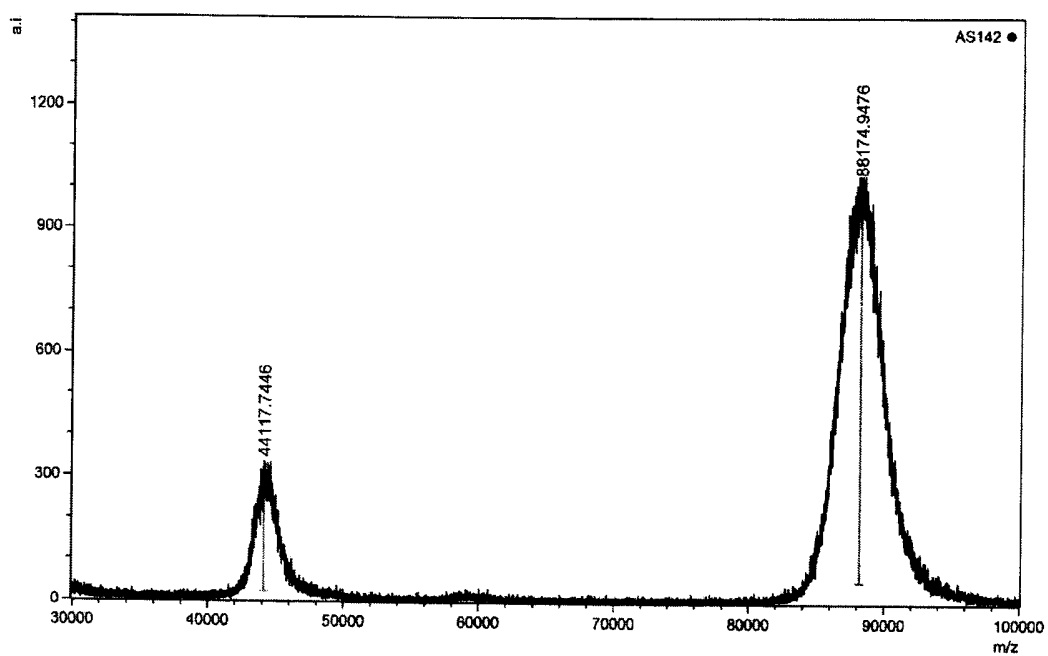
Obr. 1



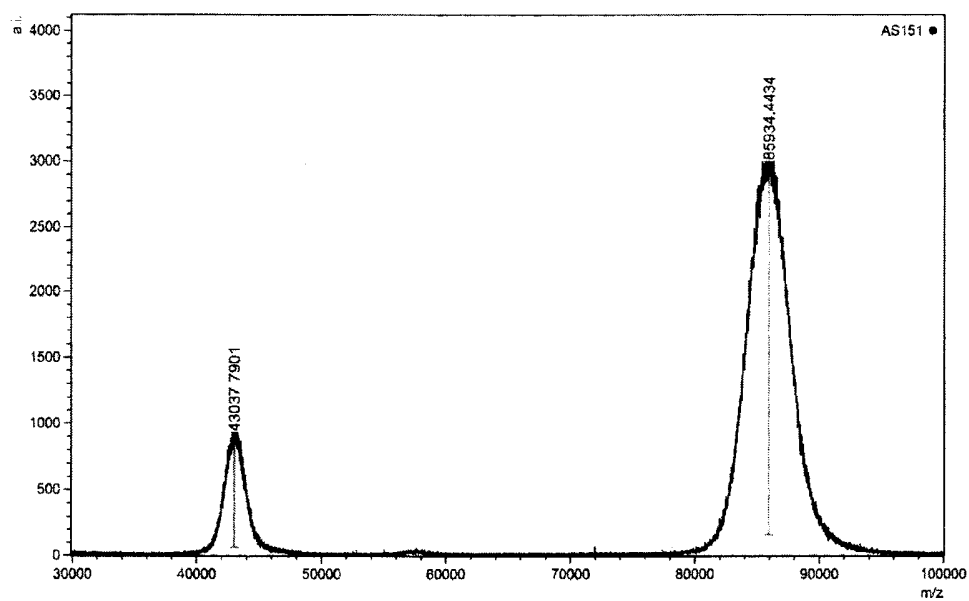
Obr. 2



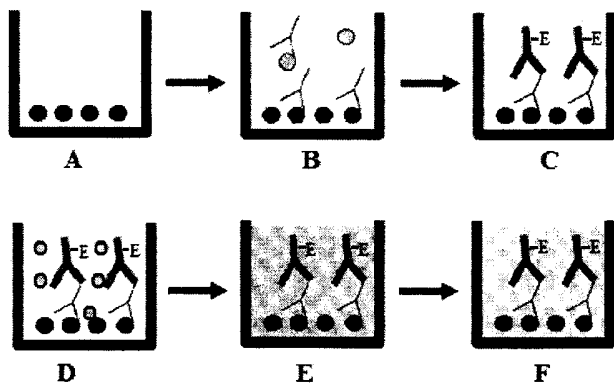
Obr. 3



Obr. 4



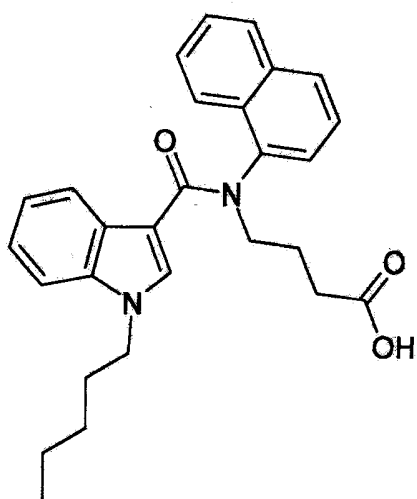
Obr. 5



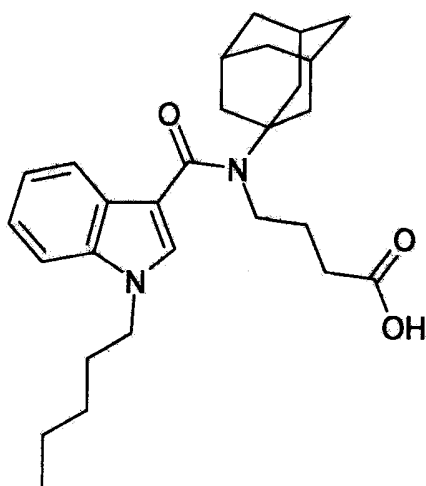
Obr. 6

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

Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9

Konec dokumentu
