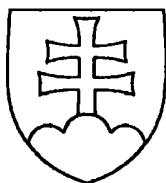


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 30.11.93

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 103 932

(32) Dátum priority: 30.11.92

(33) Krajina priority: IL

(43) Dátum zverejnenia: 09.08.1995 13. sept. 1995

(86) Číslo PCT: PCT/US93/11625, 30.11.93

(21) Číslo dokumentu:

708-95

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 C 232/20,
A 61 K 31/16

(71) Prihlasovateľ: Yissum Research Development of The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, IL;

(72) Pôvodca vynálezu: Mechoulam Raphael, Jerusalem, IL;
Beuer Aviva, Jerusalem, IL;
Hanus Lumir, Jerusalem, IL;
Devane William A., Chevy Chase, Maryland, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: Deriváty mastných kyselín a farmaceutické prípravky s ich obsahom

(57) Anotácia:

Amidy polynenasýtených mastných kyselín vzorca I, kde R je alkenylová skupina polynenasýtenej mastnej kyseliny so 16 až 28 uhlíkovými atómami, s 2 až 6 dvojitémi väzbami, prednostne všetkými v konfigurácii *cis*, pričom prvá dvojitá väzba je v polohe C-3, C-6, alebo C-9, počítané od nekarboxylovej časti molekuly, R'' je vodík, nižší alkyl, skupina -OH alebo -(CH₂)_n-OH, kde n je malé celé číslo, pričom ak je R'' vodík, je R' nižší alkyl alebo skupina -(CH₂)_m-OH, kde m je malé celé číslo, ak je R'' nižší alkyl, je R' skupina -(CH₂)_p-OH, kde p je malé celé číslo, ak je R'' skupina -OH, je R' skupina -(CH₂)_q-OH, kde q je malé celé číslo, alebo ako R', tak R'' je skupina -(CH₂)_n-OH, kde n je malé celé číslo, a ich adičné soli s kyselinami a komplexy sú schopné zastúpiť prirodzene sa vyskytujúce anandamidy v mozgu a viazať sa na kannabinoidový receptor. Zlúčeniny vykazujú fyziologickú aktivitu sú vhodné ako účinná zložka farmaceutických prípravkov na liečbu zápalov, migrén, spastickej činnosti, glaukómu a roztrúsenej sklerózy. Účinná zložka môže mať rádioaktívne označenú formu.

Deriváty mastných kyselín a farmaceutické prípravky s ich obsahom

Oblasť techniky

Vynález sa týka určitých polynenasýtených amidov mastných kyselín a ich derivátov. Časť z nich je prítomná v mozgu a časť sú syntetické produkty. Nové čisté zlúčeniny majú rôzne farmakologické vlastnosti. Inhibujú špecifickú väzbu kannabinoidovej sondy na synaptosomálne membrány. Zlúčeniny podľa vynálezu môžu byť v rádioaktívne značenej forme.

Doterajší stav techniky

Etanolamid arachidonovej kyseliny (anandamid) a podobné zlúčeniny sú stavebnými súčasťami mozgu. Anandamid a určité jemu podobné zlúčeniny sa viažu na kannabinoidový receptor. Väzba anandamidu na kannabinoidový receptor je podobná väzbe Δ^9 -tetrahydrokannabinolu. V tele existuje mnoho mediátorov, ktoré sú derivátmi arachidonovej kyseliny, ako sú prostaglandiny a leukotrieny, ktoré sú prítomné ako veľké skupiny príbuzných zlúčenín. Niektoré z nich sa neviažu na kannabinoidový receptor a jedným z cieľov vynálezu bolo nájsť a identifikovať zlúčeniny, ktoré majú fyziologické vlastnosti podobné vlastnostiam anandamidu.

Existencia receptora a vysoké štruktúrne požiadavky na kannabinoidovú aktivitu ukazujú na možnú prítomnosť špecifického endogénneho kannabinoidového ligandu.

Podstata vynálezu

Endogénne ligandy pre kannabinoidový receptor doposiaľ

neboli identifikované. Arachidonoyletanolamid, t.j. nový derivát arachidonovej kyseliny, nazývaný anandamid, bol izolovaný z bravčového mozgu. Jeho štruktúra bola stanovená hmotovou spektroskopiou a nukleárnou magnetickou rezonančnou spektroskopiou a potvrdená syntézou. Inhibuje špecifickú väzbu značenej kannabinoidovej sondy na synaptosomálne membrány spôsobom typickým pre konkurenčné ligandy a vyvoláva koncentračne závislú inhibíciu elektricky vyvolanej krčovej odpovede myšieho vas deferens, čo je charakteristický účinok psychotropných kannabinoidov. Boli syntetizované podobné zlúčeniny a skúmané ich farmakologické vlastnosti.

Δ^9 -Tetrahydrokannabinol (Δ^9 -THC), psychoaktívna zložka *Cannabis*, sa viaže na špecifický receptor v mozgu, kondenzovaný s G-proteínom. Bol síce klonovaný kannabinoidový receptor u človeka a u krysy, ale jeho fyziologická funkcia je neznáma. Spoľahlivo potvrdené behaviorálne účinky THC a hojnosť a anatomická lokalizácia receptora v mozgu naznačuje okrem iných funkcií rolu receptora pri kontrole pohybov, pamäte, emócií a modulácie bolesti.

Existencia receptora a vysoké štruktúrne požiadavky na kannabinoidovú aktivitu ukazujú na možnú prítomnosť špecifického endogénneho kannabinoidového ligandu.

Pri screeningu na endogénne kannabinoidové zlúčeniny boli testované frakcie odvodené z mozgu s použitím odstredivkového testu väzby rádioligandov. Ako sonda bol použitý trítiovaný HU-243 (11-hydroxyhexahydrokannabinol-3-dimetylheptylový homológ) s hodnotou K_D 45 pM v kryších synaptosomálnych membránach. Extrakty bravčového mozgu, rozpustné v organických rozpúšťadlách, boli najprv chromatografované štandardným postupom pre delené lipidy. Bravčové mozgy boli homogenizované v chloroforme a/alebo metanole a odstredované pri 13 000 x g. Organický extrakt bol po rozdelení hlavných skupín lipidov [C.C. Sweeley, Methods Enzymol. 14, 254 (1969); J.C. Dittmer

a M.A. Wells, tamtiež, str. 482] s použitím elučných schémata frakcionovaný na silikagéle [Kieselgel 60, 70-230 mesh]. Mnohé z pôvodných frakcií izolovaných z mozgu inhibovali väzbu [^3H]HU-243 na kannabinoidový receptor. Zvláštna pozornosť bola venovaná väzbe [^3H]HU-243 na mikrofugálne trubičky zo silikónovaného polypropylénu, v ktorých bol test uskutočňovaný. Obvykle ulpie na mikrofugálnej trubičke asi 15 až 20 % pridaného [^3H]HU-243 a toto množstvo sa mierne zvyšuje s tým, ako je rádioligand z receptoru vytesňovaný neznáčenými kannabinoidmi. Pri monitorovaní trojstrannej rovnováhy [^3H]HU-243 medzi synaptosomálnymi receptormi, roztokom a mikrofugálnou trubičkou sme pozorovali, že všetky surové mozgové frakcie, ktoré inhibovali väzbu [^3H]HU-243 na receptory, tiež inhibovali väzbu rádioligandu na mikrofugálnu trubičku. Niekoľko sľubných frakcií bolo prečistených s použitím nízkotlakovej i strednetlakovej stĺpcovej chromatografie a chromatografie na tenkej vrstve (TLC). Bola použitá kombinácia systému s normálnou a reverznou fázou. TLC: R_f 0,65 na analytickej dosťičke RP-18 (Merck), elúcia metanol - dichlórmetán 4 : 1, vyvíjanie dvakrát - čelo prvého rozpúšťadla: 3,1 cm, čelo druhého rozpúšťadla: 7,4 cm [W.A. Devane, L. Hanus, Mechoulam, Proceed. 5th Nordic Neuroscience Meet., publ. Univ. Kuopio Med., str. 198 (1991)]. Anandamid sa vymýva zo stĺpca silikagélu (Kieselgel 60, 40 - 63 μm , Merck) systémom metanol - chloroform 2 : 98. Z kolóny s reverznými fázami (RP-C, 40 - 63 μm , Sigma) sa vymýva systémom metanol - voda 88 : 12.

Bola získaná zlúčenina (0,6 mg zo 4,5 kg mozgu) o názve anandamid, ktorá vykazuje na TLC jednu škvrnu a pri plynovej chromatografii (GC) s použitím detekcie hmotovým spektrometrom sa vymýva prevažne ako jeden pik. Anandamid inhibuje špecifickú väzbu [^3H]HU-243 na synaptosomálne membrány spôsobom typickým pre konkurenčné ligandy s hodnotou K_D $52 \pm 1,8$ nM ($n = 3$) (obr. 1). V tomto systéme bola pre Δ^9 -THC hodnota K_D 46 ± 3 nM.

Výsledky predchádzajúcich experimentov, pri ktorých sme porovnávali inhibičný účinok 1,1-dimetylheptyl-homológov (+) a (-)-11-hydroxy-delta-8-tetrahydrokannabinolu na elektricky vyvolanú krčovú odpoveď myšieho vas deferens, ukazujú, že tento preparát je vhodný ako model pre hodnotenie funkcie psychotropných kannabinoidov. R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, D.B. Elrick, R. Mechoulam, A.D. Corbett, Brit. J. Pharmacol. 105, 980 (1972). Anandamid vyvolával koncentračne závislú inhibíciu krčovej odpovede (obr. 2). Inhibícia nebola rušená naloxonom (300 nM). Hodnoty inhibície sú porovnateľné s hodnotami väzby na receptor.

Štruktúra anandamidu bola určená hmotovou spektrometriou (MS) a nukleárnou magnetickou rezonančnou (NMR) spektroskopiou. Ďalšie údaje boli získane z merania GC-MS a CID na trimehtylsilylovom deriváte látky. Výsledky ukazujú, že anandamid je etanolamid tetraenovej C₂₀ mastnej kyseliny.

Podpora pre uvedenú štruktúru bola nájdená v chovaní anandamidu za podmienok GC-MS.

Tepelnou dehydratáciou vzniká elektrónovou ionizáciou (EI) ión m/z 329 M⁺ a pod Cl m/z 330 MH⁺. Ako m/z 330 MH⁺, tak m/z 329 M⁺ vznikajú za podmienok EI v zariadení s lapačom iónov (obr. 3). Fragmentačná schéma produktov dehydratácie bola v oblasti nízkych hmotností EI hmotového spektra podobná pre anandamid i palmitoyletanolamid: m/z 85 (ión z McLaffertyho prešmyku) a m/z 98 (produkt γ -štiepenia) (obr. 4). EI hmotové spektrum dehydratovaného palmitoyletanolamidu vykazuje ión m/z 112 zodpovedajúci fragmentu z δ -štiepenia. Absencia tohoto iónu v EI hmotovom spektre získanom GC-MS analýzou anandamidu ukazuje na prítomnosť prvej dvojitej väzby v tetraenovej kyseliny v polohe 5 (ako v arachidonoyletanolamide, u ktorého sa neočakáva produkt δ -štiepenia) (obr. 4).

Boli zaznamenané spektrá ¹H NMR. Piky prislúchajúce pro-

tónom dvojitej väzby (δ 5,30 - 5,45, mult) boli kombinované s pikami protónov, ktoré majú chemické posuny allylických dvojitych väzieb (δ 2,75 - 2,90, mult). Takéto dvojité allylické protóny sú typické pre početné prirodzene sa vyskytujúce *cis*-nekonjugované polynenasýtené mastné kyseliny, ako je linoleová a arachidonová kyselina. Medzi δ 2,01 - 2,27 boli pozorované tri páry protónov, ktoré sme priradili 2 allylickým metylénovým skupinám a 1 metylénovej skupine v polohe α ku karbonylovej skupine. Bola zistená len jedna metylová skupina (0,88, t). Piky nájdené pre 2 protóny pri 3,42 (N-CH, t), 2 protóny pri 3,72 (O-CH₂, t) a 2 protóny pri 2,20 (COCH₂, t) majú podobné chemické posuny a schémy spinových interakcií, aké sú pozorované v NMR spektre syntetického palmitoyletanolamidu. Boli kombinované piky pre N-CH₂ a O-CH₂.

Porovnanie uvedených analytických dát nás viedlo k záveru, že anandamid má štruktúru nového chemického individua arachidonoyletanolamidu, t.j. (Z)-N-2-hydroxyetyl-5,8,11,14-ikosatetraenamidu. Tento záver bol potvrdený syntézou. Arachidonoylchlorid, pripravený z arachidonovej kyseliny a oxalylchloridu (21) v metylénchloride bol pri 0 °C pridáný v dusíkovej atmosfére k etanolamínu (v 10-násobnom molárnom prebytku) v metylénchloride. Po 15 min bola reakčná zmes premytá vodou, vysušená a produkt (výťažok cca 90 %) bol prečistený chromatografiou na stĺpci silikagélu (elúcia 2% metanolom v chloroforme) na arachidonoyletanolamid ako olej v čistote 97 % (podľa GC-MS). Syntetický arachidonoyletanolamid bol identický s produktom získaným pomocou TLC (10), NMR (300 MHz) a GC-MS (retenčný čas a fragmentačná schéma) (obr. 3). Syntetický anandamid sa viaže na kannabinoidový receptor $K_i = 39 \pm 5,0$ nM ($n = 3$).

Zdá sa, že táto prečistená nová zlúčenina anandamid je prítomná ako súčasť mozgu. Je možné, že je táto zlúčenina prítomná vo forme komplexu s inou zlúčeninou alebo v akejkoľvek inej forme, ale podľa vynálezu bolo zistené, že zlúčení-

na, definovaná tu ako anandamid, je charakterizovaná tu uvedenými vlastnosťami. Tu definované podobné zlúčeniny sú charakterizované v podstate ekvivalentnými vlastnosťami a sú tiež súčasťou vynálezu.

Vynález sa tiež týka značenej formy týchto zlúčenín, ktorá sa dá využívať v rôznych výskumných projektoch a testoch.

Vynález sa ďalej týka farmaceutických prípravkov, obsahujúcich účinné množstvo jednej zo zlúčenín podľa vynálezu.

Syntetickou metódou, opísanou pre arachidonoyletanolamid, boli pripravené etanolamidy týchto nenasýtených mastných kyselín:

systematický názov	triviálny názov	Shortlandovo označenie
9,12-oktadecenová*	linoleová	18:2 (n-6)
6,9,12-oktadekatrienová	δ -linolenová	18:3 (n-6)
8,11,14-eikosatrienová	homo- δ -linolenová	20:3 (n-6)
4,7,10,13,16-dokosapentanová	-	20:5 (n-6)
9,12,15-oktadekatrienová	δ -linolenová	18:3 (n-3)
5,8,11,14,17-eikosapentaenová	-	20:5 (n-3)
4,7,10,13,16,19-dokosahexanová	-	22:6 (n-3)
5,8,11-eikosatrienová	-	20:3 (n-9)

* konfigurácia dvojnej väzby je vo všetkých prípadoch *cis*.

Tieto deriváty etanolamidu majú protizapalové, analgetické, antiglaukómové a antiemetické účinky (ako je uvedené ďalej). Pre získanie ^{14}C -značených zlúčenín, významných pre biologické štúdie, bol vyššie uvedený syntetický postup opakovaný s ^{14}C -značenou arachidonovou kyselinou a bolo získané 50 mCi/mmol ^{14}C -arachidonoyletanolamidu. S ^3H -arachidonovou

kyselinou sme získali 150 Ci/mmol 3H-arachidonoyletanolamidu. Pri použití ^{14}C -značeného etanolamidu sme získali 50 mCi/mmol ^{14}C -arachidonoyletanolamidu.

Biologické výsledky

Analgéza

Nové zlúčeniny boli testované štandardným testom s horúcou platňou. Reprezentatívne výsledky sú uvedené v tabuľke I.

Zlúčeniny boli rozpustené v zmesi detergentu (Emulphor), etanolu a fyziologického roztoku 5 : 5 : 90 a podávané injekčne intravenózne do chvostovej žily pri objeme injekcie 0,1 ml/10 g telesnej hmotnosti.

Antiemetická účinnosť

Zlúčeniny boli testované taktiež na holuboch proti emesii vyvolanej antineoplastikom (cisplatin) metódou opísanou Feigenbaumom a d., Eur. J. Pharmacol. 169, 159-165 (1989). Reprezentatívne výsledky sú uvedené v tabuľke I.

Zlúčeniny boli rozpustené rovnako ako pri analgetickom teste a podávané subkutánne. Objem injekcie bol 1,0 ml/kg telesnej hmotnosti.

Antiglaukómová účinnosť

Zlúčeniny boli tiež testované na antiglaukómovú účinnosť na králikoch so stabilným glaukómom, vyvolaným injekciou δ -chymotrypsínu do oka metódou podrobne opísanou R. Mechoulamom a d., On the therapeutic possibilities of some cannabino-

ids, v "The Therapeutic Potential of Marihuana" (ed. S. Cohen, R.C. Stillman), Plenum Press, New York, 1975, str. 35 - 48. Účinnosť zlúčenín bola porovnávaná s pilokarpínom (štandardné liečivo proti glaukómu), ktorý pri použití 0,01% vodného roztoku znižuje vnútroočný tlak (IOP) a zdržuje polčas návratu k pôvodnému (IOP) na asi 30 hodín.

Etanolamidy mastných kyselín podávané do oka v 0,1 % roztoku boli menej účinné než pilokarpíny a zdržovali polčas návratu k pôvodnému IOP na 2 až 10 hodín.

Zlúčeniny boli rozpustené rovnako ako pri analgetickom teste a pre dosiahnutie požadovanej koncentrácie ďalej zriedené fyziologickým roztokom.

Protizápalová účinnosť

Zlúčeniny boli testované metódou podľa W. Calhouna a d., Agents and Actions, 21, 306-309 (1987). Ortuť ako vytesňovacie prostredie bola nahradená vodou. Do chodidlovej plochy pravej zadnej labky samice myši (20 až 25 g) bol s.c. injekčne vpravený PAF (1,0 µg) alebo arachidonová kyselina (1,0 mg) v roztoku v 50 µl 5% etanolu vo fyziologickom roztoku. Myši boli počas tejto procedúry pod éterovou anestéziou. Pred ošetrením a 15 min po injekcii PAF alebo 30 min po injekcii arachidonovej kyseliny bol vytesnením vody meraný objem pravej labky do úrovni vonkajšieho členka. Pre každú myš bola vypočítaná zmena objemu labky. Výsledky pre dva z testovaných etanolamidov sú uvedené v tabuľke II.

Dávkovanie

Účinná dávka pre človeka je v prípade injekčného alebo orálneho podania 1 až 100 mg celkom za deň.

Tabuľka I

Analgéza a redukcia zvracania

zlúčenina	analgéza ED ₅₀ (mg/kg)*	redukcia zvracania (50 %) (mg/kg)**
arachidonoyletanolamid	4,2	2,5
5,8,11,14,17-eikosapentaenoyl- etanolamid	5,2	3,6
4,7,10,13,16,19-dokosahexaenoyl- etanolamid	6,1	4,8
5,8,11-eikosatrienoyletanolamid	7,6	6,2

* myši

** holubi

Tabuľka II

Inhibícia opuchu labky vyvolaného arachidonovou kyselinou***

davka ^b (mg/kg)	arachidonoyl- etanolamid	4,7,10,13,16,19- dokosahexaenoyl- etanolamid
0,010	56,2	-
0,025	58,4	-
0,050	74,2	52,4
0,100	98,0	66,8
0,250	100,0	72,0

*** Uvedené hodnoty predstavujú percento inhibície edému labky v porovnaní s kontrolami ošetrovanými vehikulom. Štatistická významnosť 95 % podľa ANOVA. 5 myší v skupine.

^b Kontrolným myšiam bol orálne (50 μ l) podaný podzemnicový olej. Nárast objemu labky 38 ± 4 μ l.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Vynález je bližšie vysvetlený v súvislosti s pripojenými výkresmi, kde:

obr. 1 znázorňuje kompetitívnu inhibíciu väzby [³H]HU-243 prirodzeným anandamidom,

obr. 2 ilustruje inhibíciu krčovej odpovede vas deferens prirodzeným anandamidom,

obr. 3 predstavuje GC-MS spektrum anandamidu,

obr. 4 znázorňuje štruktúru niektorých opisovaných zlúčenín,

obr. 5 predstavuje EI GC-MS spektra dehydratovaného *homo- γ* -linolenoyletanolamínu (5),

obr. 6 predstavuje EI GC-MS spektra dehydratovaného dokosatetraenoyletanolamínu (zlúčenina 6),

obr. 7 predstavuje EI GC-MS spektra *homo- δ* -linolenoyletanolamínu (5) a dokosatetraenoyletanolamínu (hore a dole),

obr. 8 znázorňuje kompetitívnu väzbu [³H]HU-243 zlúčeninou 5 (štvorce) a zlúčeninou 6 (trojuholníky),

obr. 9 je zoznam vzorcov niektorých zlúčenín podľa vynálezu.

Legenda

Obr. 1 - kompetitívna inhibícia väzby [^3H]HU 243 prirodzeným anandamidom. Synaptosomálne membrány boli pripravené z celých krysích mozgov bez mozgového kmeňa (samci Sprague-Dawley, 430 až 470 g). [^3H]HU 243 (45 až 55 pM) bol inkubovaný 90 min pri 30 °C so synaptosomálnymi membránami (obsah proteínov 3 až 4 μg) buď s anandamidom v uvedených koncentráciách alebo so samotným vehikulom (bovinný sérový albumín bez mastných kyselín, konečná koncentrácia 0,5 mg/ml). Naviazaný a voľný rádioligand bol oddelený centrifugáciou (podrobnosti testu vid'. odkaz 8). Dáta boli normalizované na 100 % špecifickej väzby, ktorá bola stanovená pomocou 50 nM neznačeného HU-243. Množstvo špecifických väzieb tvorilo 77 až 82 % celkovej rádioaktivity, naviazanej na membrány. Symboly hodnôt ($\square, \Delta$) predstavujú priemer z trojnásobného stanovenia z dvoch nezávislých experimentov. Hodnota K_i (stred $\pm$ SE, $n = 3$) bola stanovená pomocou programu Ligand; $K_i = 52 \pm 1,8$ nM.

Obr. 2 - inhibícia krčovej odpovede vas deferens prirodzeným anandamidom. Vasa deferentia, získaná z myši MFI, bola zaliata do 4 ml silikónovaných orgánových kúpeľov s počiatočnou tenziou 0,5 g. Kúpele obsahovali Krebsov roztok bez iónov Mg^{++} , ktorý bol uchovávaný pri 37 °C a prebublávaný 95 % O_2 a 5 % CO_2 . Tkanivá boli supramaximálne stimulované 0,5s radami po 3 pulzoch (frekvencia radov 0,1 Hz, trvanie pulzu 0,5 ms). Boli zaznamenané izometrické koncentrácie. Prírodný anandamid bol dispergovaný v Tweene 80 a fyziologickom roztoku (vid'. odkaz 12) a pridávaný v objemoch 40 μl . Tween 80 neinhiboval krčovú odpoveď pri maximálne použitej koncentrácii kúpeľa (0,63 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $n = 6$).

Obr. 3 - GC-MS spektrum anandamidu na zariadení s lapačom iónov. Anandamid podlieha za týchto podmienok tepelnému rozkladu a preto zobrazené spektrum patrí v skutočnosti iónu

M^+ zodpovedajúceho 2-oxazolínu.

Obr. 4 - Štruktúry anandamidu a palmitoyletanolamidu a dihydro- a tetrahydrooxazolových iónových fragmentov, vzniknutých z týchto etanolamidov mastných kyselín tepelnou dehydratáciou za podmienok GC-MS. Ión m/z 112 vzniká len z palmitoyletanolamidu.

Zlúčeniny izolované z mozgu a syntetizované

názov zlúčeniny	K_i
<i>cis</i> -7,10,13,16-dokosatetraenoyletanolamid	$34,4 \pm 3,2$ nM
anandamid	$39,0 \pm 5,0$ nM
<i>homo</i> - τ -linolenoyletanolamid	$53,4 \pm 5,5$ nM

Syntetické zlúčeniny, pripravené a testované

názov zlúčeniny	K_i
N-propyl-5,8,11,14-eikosatetraenoylamid	$11,7 \pm 2,6$ nM
N-etyl-5,8,11,14-eikosatetraenoylamid	$34,0 \pm 2,7$ nM
N-metyl-5,8,11,14-eikosatetraenoylamid	$60,0 \pm 7,4$ nM
arachidonoyl- β -dimetyletanolamid	$161,8 \pm 34,1$ nM

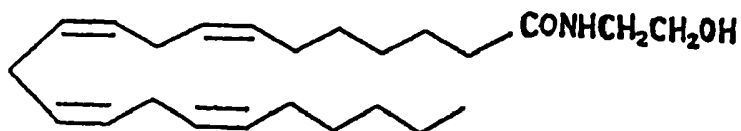
Analýza:

Zlúčenina 5: pre $C_{22}H_{39}NO_2$ (m.h. 349) vypočítané	C	75,59 %
	H	11,25 %
	N	4,01 %
nájdené	C	75,85 %
	H	11,01 %
	N	3,88 %

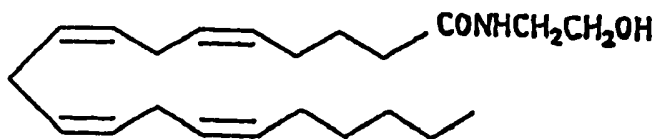
Zlúčenina 6: pre $C_{24}H_{41}NO_2$ (m.h. 375)	vypočítané	C 76,75 %
		H 11,00 %
		N 3,73 %
	nájdené	C 76,92 %
		H 11,34 %
		N 3,60 %

Účinné izolované a/alebo pripravené nenasýtené acyletanolamidy

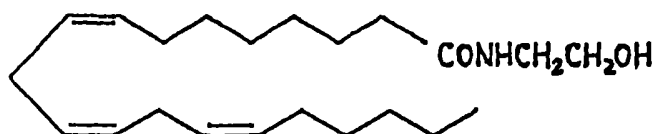
názov zlúčeniny	K_i (väzba na receptor)
<i>cis</i> -5,8,11,14-eikosatetraenoyl- etanolamid (anandamid) z kyseliny 20:4 (n-6), syntetický a z mozgu	$39,0 \pm 5$ nM



<i>cis</i> -7,10,13,16-dokosatetraenoyletanolamid z kyseliny 22:4 (n-6) syntetický a z mozgu	$34,4 \pm 3,2$ nM
--	-------------------



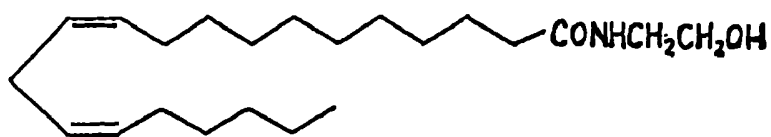
homo- γ -linolenoyletanolamid 53,4 $\pm$ 5,5 nM
 (cis-8,11,14-eikosatrienoyletanolamid)
 (z cis-8,11,14-eikosatrienové kyseliny) 20:3 (n-6)
 syntetický a z mozgu



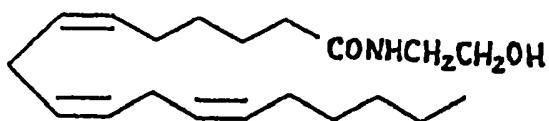
cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheptaenoyletanolamid 328,9 nM
 z kyseliny 22:3 (n-3)



cis-11,14-eikosadienoyletanolamid 1,5 μ M
 z kyseliny 20:2 (n-6)



γ -linolenoyletanolamid 4,6 $\pm$ 0,3 μ M
 (cis-6,9,12-oktadetrienoyletanolamid)
 (z cis-6,9,12-oktadetriénové kyseliny) 18:3 (n-6)



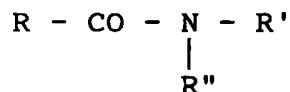
Farmaceutické prípravky obsahujúce ako účinnú zložku účinné množstvo zlúčenín podľa vynálezu majú rôzne farmakologické účinky. Napríklad je možné uviesť protizápalové, antiastmatické, analgetické, antiglaukómové, antimigrénové a antispastické účinky. Stimulujú tiež náladu a zlepšujú príznaky roztrúsenej sklerózy. Dávková forma závisí na konkrétnej zlúčenine a terapeutickej aplikácii a obvykle je v rozmedzí od asi 1 do asi 100 mg. Výhodné rozmedzie je medzi asi 5 a asi 25 mg na dávku.

Literatúra:

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

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. V podstate čisté zlúčeniny všeobecného vzorca



kde

R je alkenylová skupina polynenasýtenej mastnej kyseliny so 16 až 28 uhlíkovými atómami, s 2 až 6 dvojnými väzbami, prednostne všetkými v konfigurácii *cis*, pričom prvá dvojitá väzba je v polohe C-3, C-6 alebo C-9, počítané od nekarboxylovej časti molekuly,

R'' je vodík, nižší alkyl, skupina -OH alebo $-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$, kde *n* je malé celé číslo,

pričom,

ak je R'' vodík, je R' nižší alkyl alebo skupina $-(\text{CH}_2)_m\text{-OH}$, kde *m* je malé celé číslo,

ak je R'' nižší alkyl, je R' skupina $-(\text{CH}_2)_p\text{-OH}$, kde *p* je malé celé číslo,

ak je R'' skupina -OH, je R' skupina $-(\text{CH}_2)_q\text{-OH}$, kde *q* je malé celé číslo,

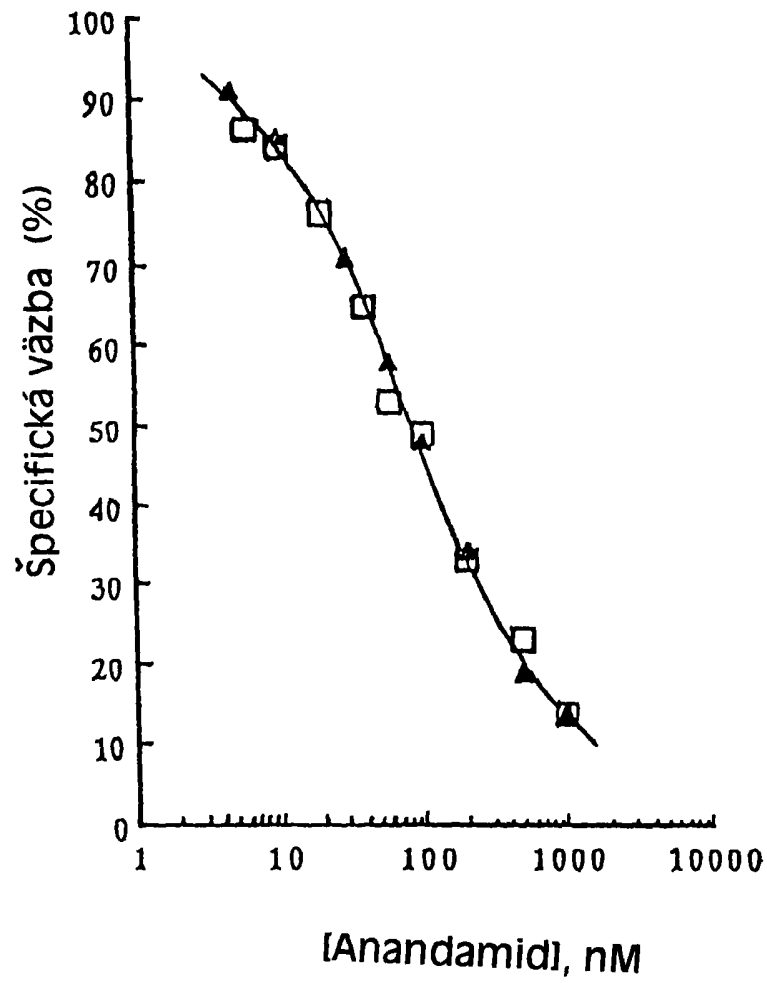
alebo

ako R', tak R'' je skupina $-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$, kde *n* je malé celé číslo,

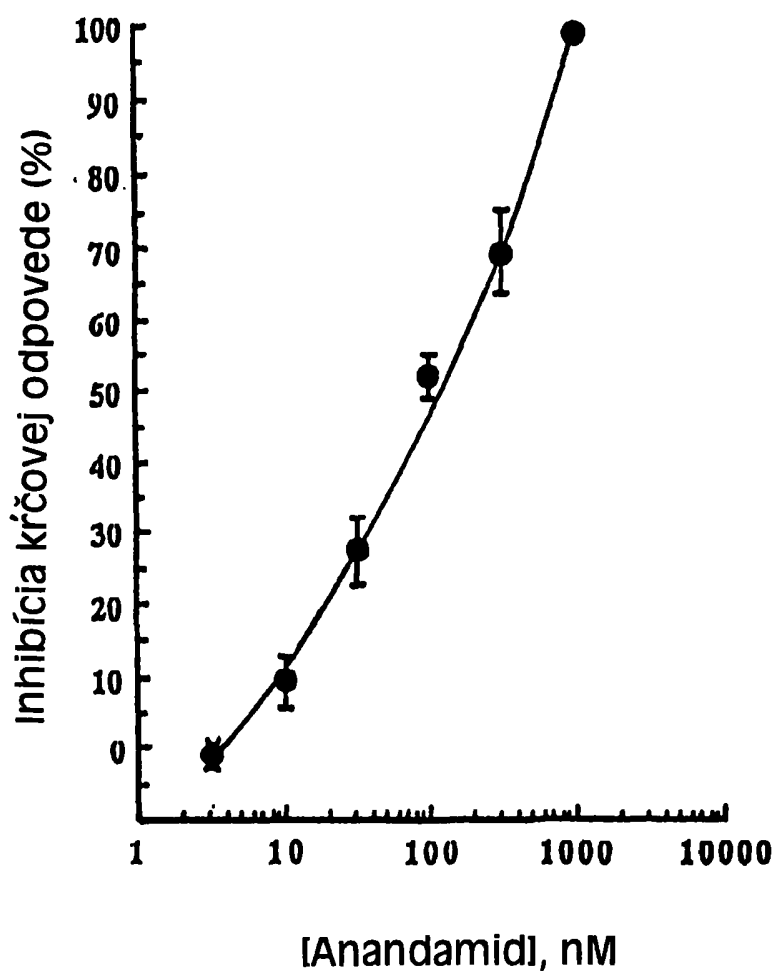
a ich adičné soli s kyselinami a komplexy.

2. Zlúčenina podľa nároku 1, kde alkenylovou skupinou je skupina oktadekadiénová, oktadekatriénová, eikosapentaénová, dokosahexaénová, eikosatriénová alebo eikosatetraénová.
3. Zlúčenina podľa nároku 1, vybraná zo súboru zahrňujúceho arachidonoyletanolamid, *cis*-7,10,13,16-dokosa-tetraenoyletanolamid, *homo*- δ -linolenoyletanolamid, N-propyl-5,8,11,14-eikosatetraenoylamid, N-etyl-5,8,11,14-eikosatetraenoylamid, N-metyl-5,8,11,14-eikosatetraenoylamid a arachidonoyl- β -dimetyletanolamid.
4. Protizápalový, antiastmatický, analgetický, antiemetický, protiglaukómový, protimigrénový, antispastický farmaceutický prípravok, zlepšujúci náladu a príznaky roztrúsenej sklerózy, vyznačujúci sa tým, že ako účinnú zložku obsahuje zlúčeninu podľa nároku 1, 2 alebo 3.
5. Prípravok podľa nároku 4, vyznačujúci sa tým, že ako účinnú zložku obsahuje zlúčeninu podľa nároku 3.
6. Prípravok podľa nároku 4 alebo 5, vyznačujúci sa tým, že dávková jednotka pre podanie človeku je asi 1 až asi 100 mg účinnej zlúčeniny.
7. Zlúčenina podľa nároku 1, 2 alebo 3 v rádioaktívne značenej forme.
8. Zlúčenina podľa nároku 7, značená ^3H alebo ^{14}C .

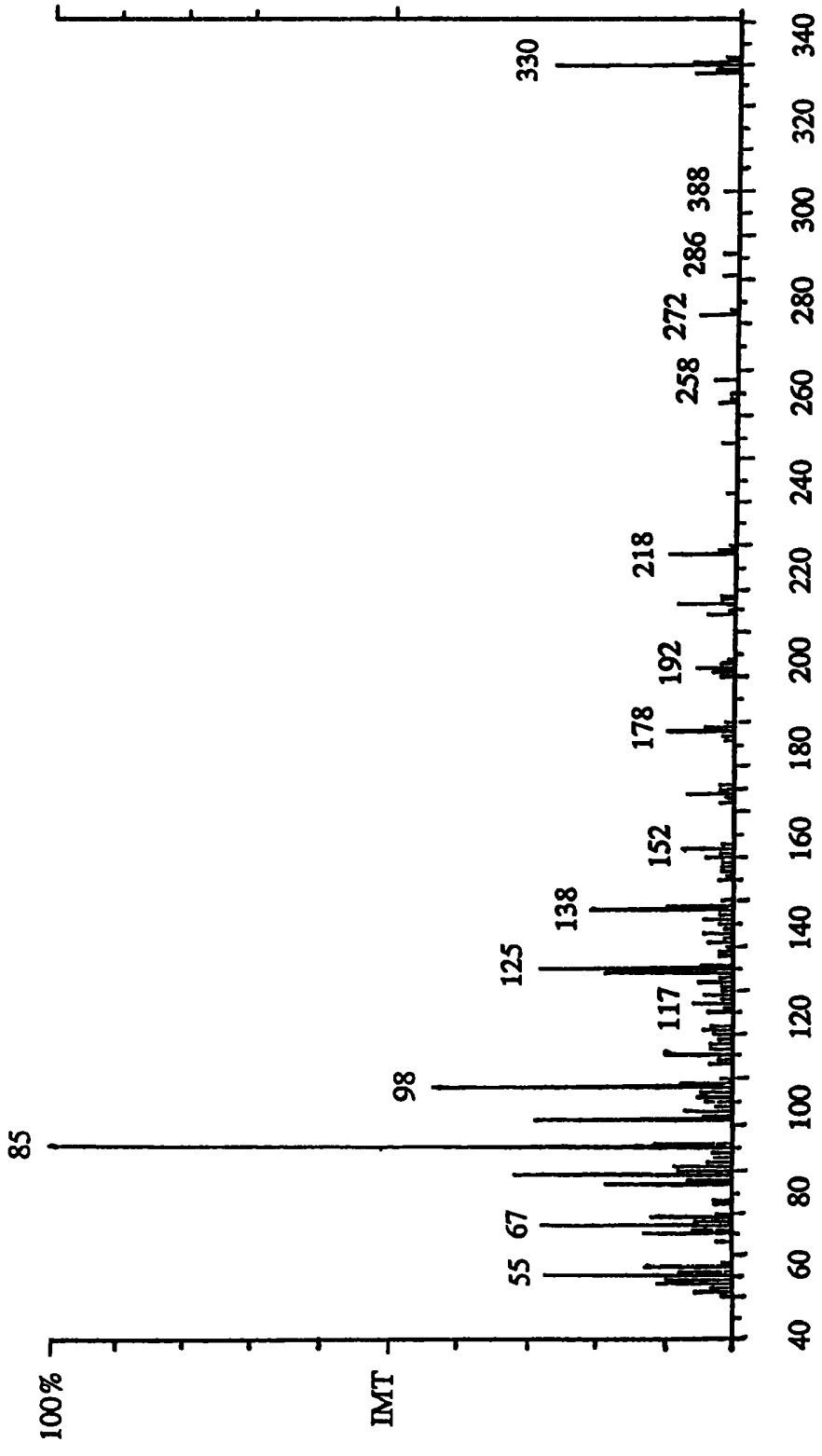
9. Prostriedok pre naviazanie na kannabinoidový receptor v mozgu, vyznačujúci sa tým, že obsahuje účinné množstvo zlúčeniny podľa nároku 1, 2 alebo 3.
- .
- .
- .
- .



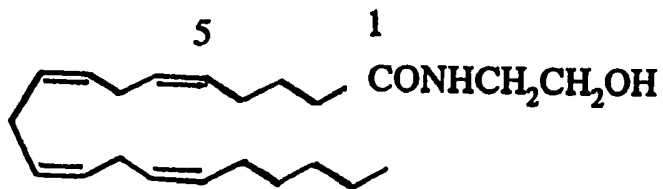
OBR. 1



OBR. 2



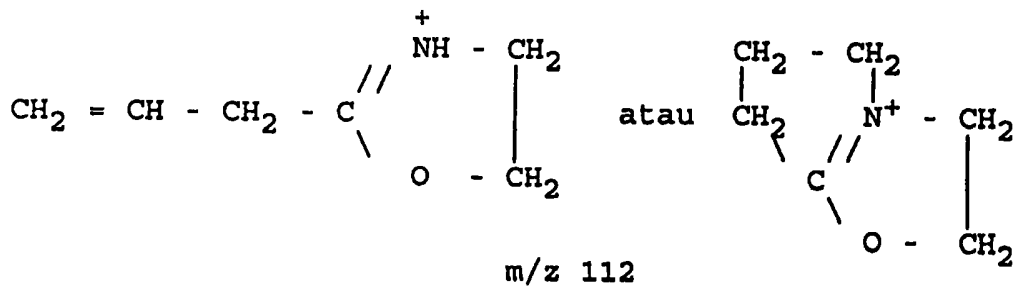
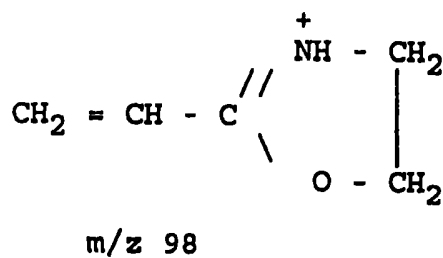
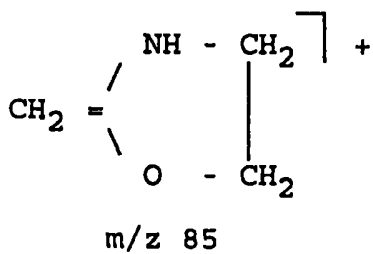
OBR. 3

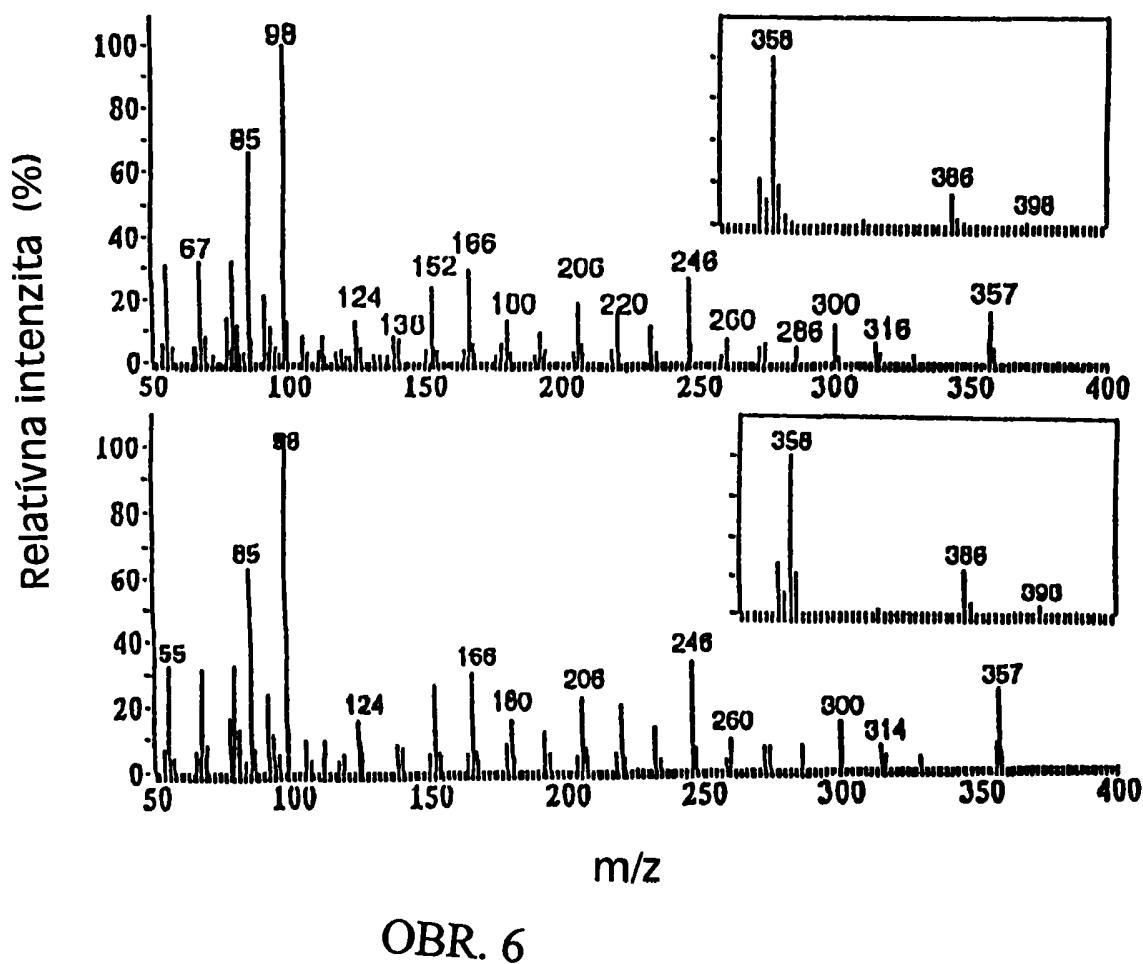
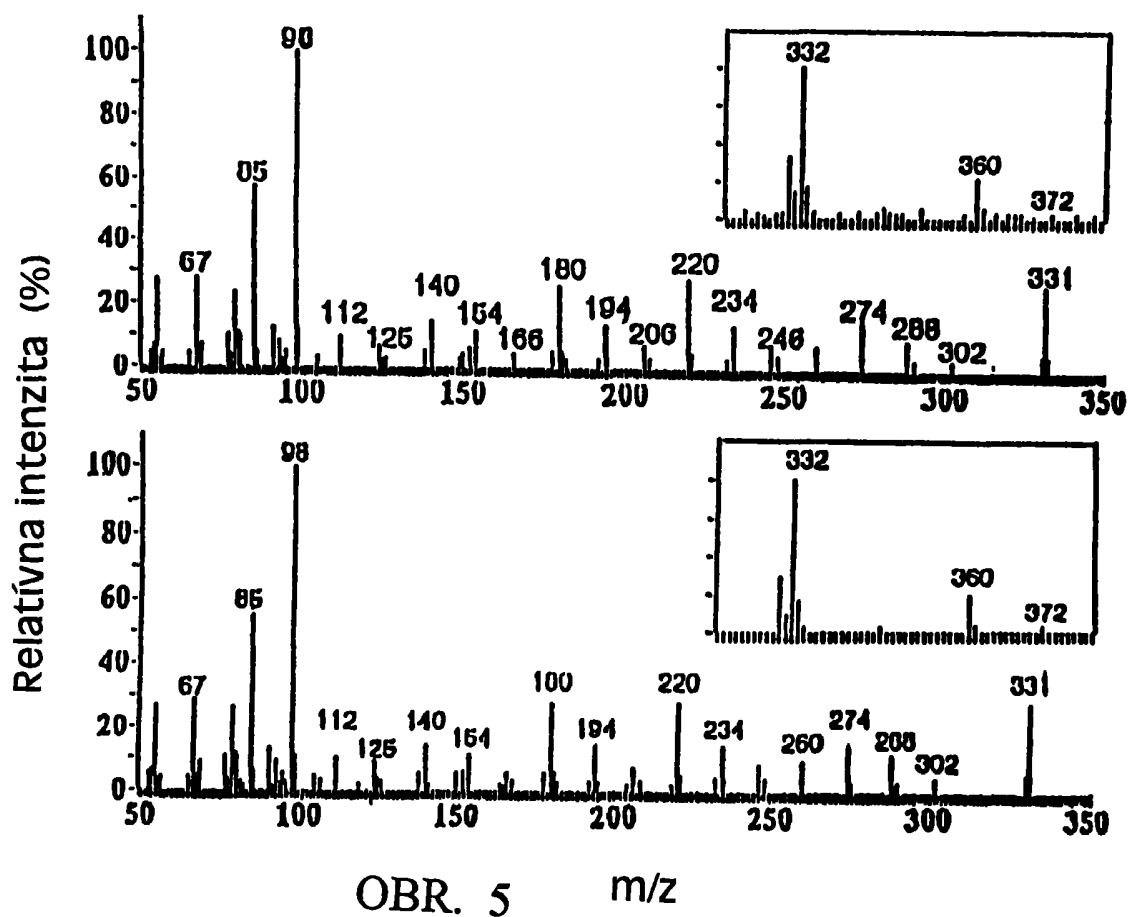


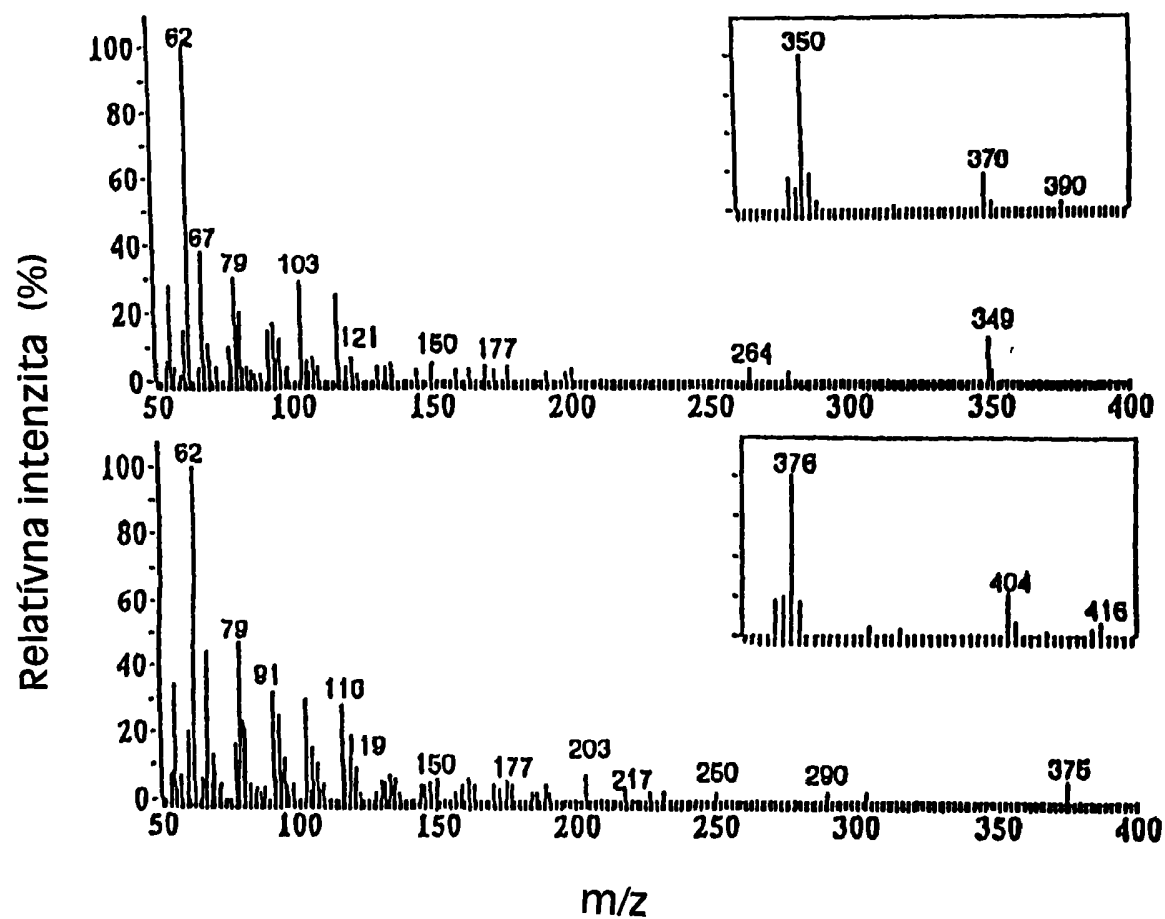
Arachidonylethanolamid (anandamid)



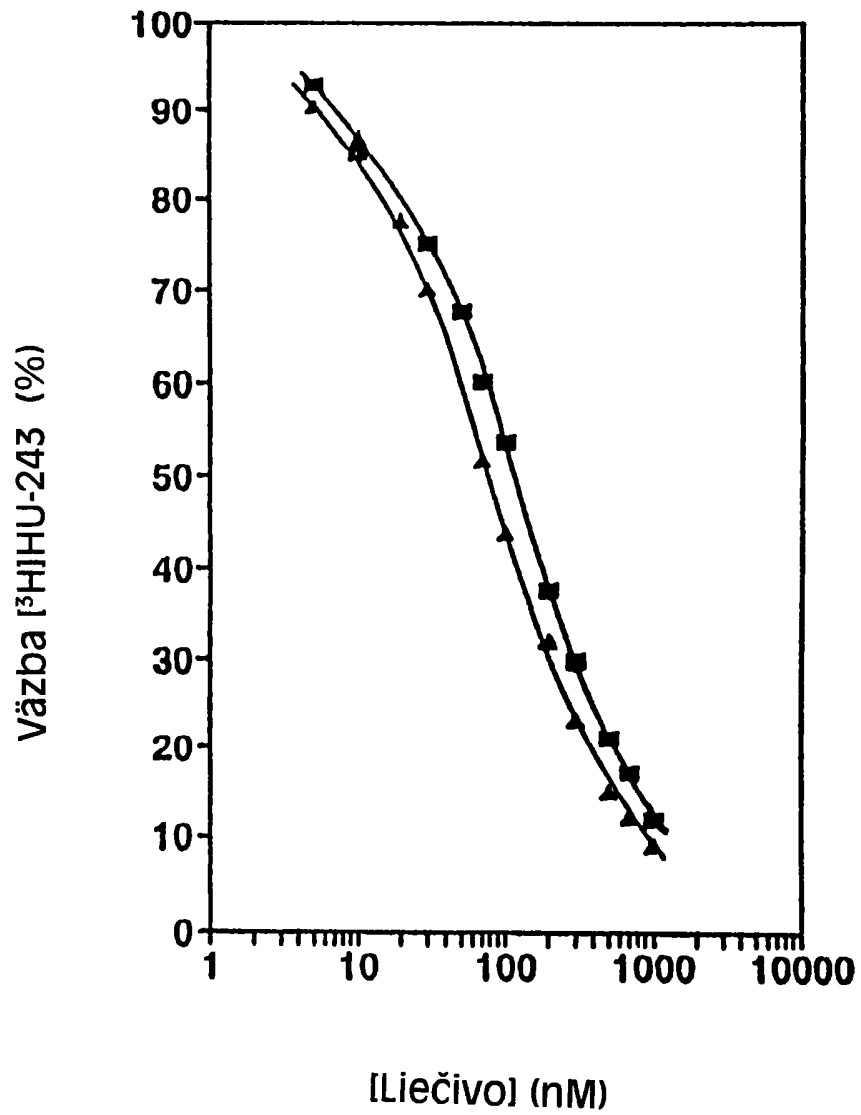
Palmitylethanolamid



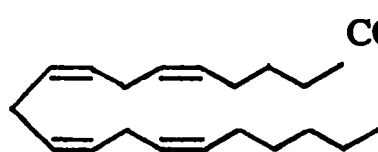




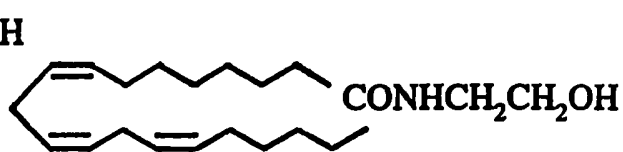
OBR. 7



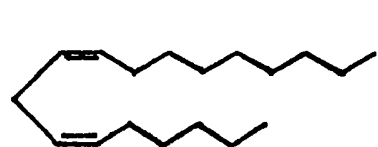
OBR. 8



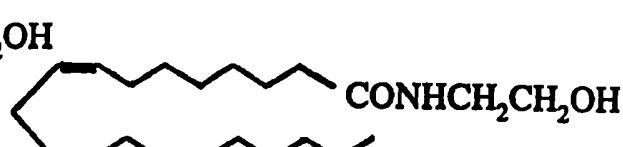
Anandamid
(1)



linolenylethanolamid
(4)



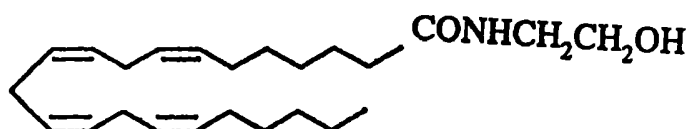
linolenylethanolamid
(3)



homo- γ -linolenylethanolamid
(5)



palmitylethanolamid
(2)



dokosatetraenylethanolamid
(6)