مدينة الملك عبدالعزيز
للعلوم والتقنية KACST

[19] المملكة العربية السعودية SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] رقم البراءة: ٣٨٠٠
[45] تاريخ المنح: ١٤٣٦/٠٢/١٧ هـ
الموافـــق: ٢٠١٤/١٢/٠٩ م

[12] براءة اختراع

[72] اسم المخترع: روزا روديس سولانيس، نيفتالي جارشيا دومينجويز، بياتريز لوبيز اورتيجا، ميلشور الفاريز دي مون سوتو، انطونيو دي لا هيرا مارتينيز، آنا مونوز مونوز، فرانسيسكو ليدو جوميز

[73] مالك البراءة: فايس فارما، اس. ايه.

عنوانه: ماكسيمو اجويري، ١٤ أي - ٤٨٩٤٠ لامياكو (ليجونا)، فيزكايا، اسبانيا

جنسيته: اسبانية

[74] الوكيل: سليمان ابراهيم العمار

[21] رقم الطلب: ١١١٣٢٠٩٤٣

[22] تاريخ الإيداع: ١٤٣٢/١٢/٢٧ هـ
الموافق: ٢٠١١/١١/٢٣ م

[30] بيانات الأسبقية:

EP	١٠٣٨٢٣١٤,٢	٢٠١٠/١١/٢٣م

[51] التصنيف الدولي (IPC[8]):
C07C021/027, A61K031/137

[56] المراجع:

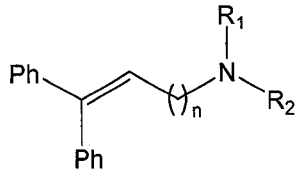
US	٧٣٢٠٩٩٣	٢٠٠٨/٠١/٢٢م

اسم الفاحص: خالد بن أحمد الحازمي

[54] اسم الاختراع: مشتقات داي فينيل - أمين: الاستخدامات، وعملية التصنيع والتركيبات الصيدلانية

Diphenyl-amine derivatives: uses, process of synthesis and pharmaceutical compositions

[57] الملخص: يتعلق الاختراع بمركبات لها ا لصيغة (I):



(I)

أو ملح مقبول صيدلانياً، أو ذوابة منه، طريقة تصنيع المركبات المذكورة، تركيبات صيدلانية تتضمنها واستخدامها في صورة دواء لمعالجة أمراض الالتهاب treating inflammatory diseases.

عدد عناصر الحماية (١٥)، عدد الأشكال (٨)

مشتقات داي فينيل - أمين: الاستخدامات، وعملية التصنيع والتركيبات الصيدلانية

Diphenyl-amine derivatives: uses, process of synthesis and pharmaceutical compositions

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بمشتقات diphenyl ، وطريقة تخليقها، وتركيبات تشتمل عليها واستخدامها في تحضير دواء لعلاج معدل للمناعة medicament for immune-modulatory therapy (على سبيل المثال، أمراض المناعة immune diseases أو أنواع محددة من السرطان certain types of cancer).

يعد الالتهاب بمثابة تفاعل معقد بالنظام المناعي خلقي في الأنسجة الوعائية vascularized tissues يتكون من تراكم وتنشيط الكريات البيضاء activation of leukocytes وبروتينات البلازما plasma proteins في موقع العدوى، والتعرض إلى السموم أو إصابة الخلية toxins or cell injury.

يبدء الالتهاب بتغييرات في الأوعية الدموية والتي تعزز توظيف الكرية البيضاء promote leukocyte recruitment.

يمكن للاستجابات المناعية التلاؤمية الموضعية محاكاة الالتهاب stimulate inflammation. على الرغم من أن لهذا تأثير واقي على التحكم في حالات العدوى وتحسين إصلاح الأنسجة، إلا أنه قد يتسبب أيضاً في إصابة النسيج والمرض tissue injury and disease.

يعد الالتهاب المناعي immune inflammation نتيجة للاستجابة المناعية التلاؤمية لمولد الضد adaptive immune response to the antigen. يمكن أن تحتوي رشيحة الخلية في موقع الالتهاب على خلايا النظام المناعي الخلقي can contain cells of the innate immune system ، مثل كثر الكريات البيض العدلة neutrophils والخلايا الملتهمة الكبيرة macrophages ، والتي يتم توظيفها

كنتيجة لتأثير cytokines المنتجة بواسطة الخلايا T.

cytokines هي مجموعة من البروتينات والتي تتوسط في العديد من الاستجابات المناعية الخلقية والتلاؤمية. يمكن إنتاج نفس cytokines بواسطة أنواع عديدة من الخلايا، ويقوم cytokine واحد ونفس cytokine بالتأثير في الغالب على أنواع الخلية المختلفة. يتم تصنيع cytokines على هيئة استجابة لمحفز التهابي أو محفز مولد للضد وتؤثر على نحو طبيعي موضعياً بطريقة الغدد الصماوية أو نظير الصماوي، وترتبط بالمستقبلات عالية ألفة الارتباط الموجودة في الخلايا المستهدفة. يمكن إنتاج cytokines محددة بكميات كافية للتدوير وإحداث تأثيرات الغدد الصماء. تقوم cytokines علاوة على ذلك بدور عوامل نمو للعديد من أنواع الخلية.

تتوسط cytokines في تأثيرها وذلك من خلال الارتباط عالي ألفة الارتباط بمستقبلات تنتمي إلى عدد محدود من العائلات البنائية. تستخدم cytokines المختلفة مسارات إرسال إشارة مخصصة، مثل مسار JAK/STAT.

يتم إنتاج cytokines التي تتوسط في حدوث المناعة الخلقية على نحو أساسي بواسطة الخلايا الملتهمة الكبيرة macrophages المنشطة وتشمل: TNF و IL-1 كوسطاء في التفاعلات الالتهابية الحادة للكائنات الحية الدقيقة؛ chemokines على هيئة موظفات كرية بيضاء في بؤر الالتهاب؛ cytokine IL-12 منشط محفز لإنتاج الخلية الملتهمة الكبيرة (IFN-gamma)؛ interferons من النوع I على هيئة cytokines مضادة للفيروسات، و IL-10 كمثبط للخلية الملتهمة الكبيرة.

يتم إنتاج cytokines التي تتوسط في حدوث وتُعدل أطوار التنشيط والمستجيب للمناعة التلاؤمية على نحو أساسي بواسطة الخلايا T التي تمت محاكتها بواسطة مولد الضد وتشمل: IL-2 على هيئة عامل نمو الخلية T الرئيسي؛ IL-4 على هيئة محاكي تصنيع IgE وتطوير الخلايا Th2 من الخلايا T العذراء المتعاونة؛ IL-5 على هيئة منشط eosinophil ؛ IFN-جاما على هيئة منشط

خلية ملتهمة كبيرة، وTGF-بيتا على هيئة تكاثر الخلية T ومثبط تنشيط الكرية البيضاء.يمكن تمييز الخلايا T المتعاونة مع CD4+ إلى خلايا مستجيب Th1 متخصصة، والتي تفرز IFN-جاما، والتي تفضل المناعة التي يتوسط في حدوثها خلية البلعم، أو إلى خلايا Th2، والتي تفرز IL-4 وIL-5، والتي تفضل IgE-، المناعة التي يتوسط في حدوثها eosinophil والخلية البدينة mastocyte .

بإيجاز، تؤدي cytokines وظائف عديدة والتي تكون شديدة الأهمية للدفاع عن العائل ضد مسببات المرض وتوفر رابطة للاتحاد المناعة الخلقية والتلاؤمية. تنظم cytokines أيضاً مقدار وطبيعة الاستجابات المناعية، التأثير على نمو الخلية الليمفاوية والتمييز. في النهاية، توفر cytokines تضخيم هام للآليات والتي تتيح لعدد ضئيل من الخلايا الليمفاوية lymphocytes الخاصة بأي مولد الضد لتنشيط آليات المستجيب المختلفة لإزالة مولد الضد. قد يكون للإنتاج الزائد أو تأثير cytokines نتائج مرضية.

أصبح إعطاء cytokines ، المستقبلات القابلة للذوبان أو مُثبطات cytokines ، في الوقت الحاضر، نهج مبتكر وفعال لتعديل الاستجابات البيولوجية المقترنة بكل من الأمراض المناعية الحادة والمزمنة والأمراض الالتهابية، وأيضاً في علاج أنواع عديدة من السرطان. منحت إمكانية معالجة المرضى المصابين بالسرطان باستخدام استراتيجيات مناعية الأمل لأطباء العلاج المناعي والاختصاصي البيولوجي للسرطان. يقوم السبب الرئيسي لهذا الاهتمام على حقيقة اعتماد العلاجات الحالية للسرطان على العقاقير والتي تدمر انقسام الخلايا أو تعوقه، ولهذه العلاجات تأثيرات خطيرة على التكاثر الطبيعي للخلايا في مرضى السرطان. يسبب علاج السرطان لذلك اعتلال ملحوظ ووفيات. على النقيض من هذه العلاجات، يتمتع العلاج المعدل للمناعة باحتمال كونه علاج له خصوصية عالية وأقل سمية يمكن تخيلها. ومع ذلك، يكون لجميع هذه الأدوات العلاجية افتراضياً

أصل بيولوجي وتكون محدة جداً لcytokine فردي. هذا يشتمل على سلسلة من مخاطر التحمل، ومخاطر توليد تفاعلات مناعية وتفاعلات حث تشتمل على عدم توازن يمكن تحمله في معقد النظام المناعي. تتمتع سلسلة المركبات المعروضة في الاختراع، إضافة إلى كونها جزيئات صغيرة وليست مركبات بيولوجية، بخاصية التأثير على نحو واضح على أكثر من cytokine واحد ذا صلة ولكن ليس على الآخرين، والتأثير المحتمل على على هيئة معدلات أكثر من مثبطات صارمة strict inhibitors، دون تعديل حيوية الخلية وفسيولوجيا الخلية الطبيعية، ولكن مع القدرة على تفضيل العودة إلى طبيعة الآليات المناعية الفعلية للعائل الذي يعاني من مرض التهابي حاد أو مزمن أو بعض أنواع السرطان.

تكشف Eur. J. Med. Chem. 2008, 43, 2404 عن:

benzyl-(4,4-diphenyl-but-3-enyl)-amine, 2-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-phenol, 3-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-phenol, 5-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-2-methoxy-phenol and 4-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-2,6-difluoro-phenol

في صورة مثبطات مستقبلات GABA فأرية. تكشف :

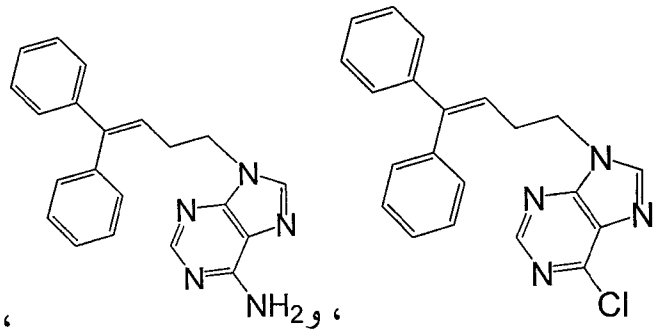
Eur. J. Med. Chem. 1993,28,555,727 وتكشف 783 عن benzyl-(4,4-diphenyl-but-3-enyl)-amine وتوسيع للأوعية في صورة تطبيق علاجي افتراضي للمركب المذكور. تكشف :

Org. Lett. 1999,1,849 عن: benzyl-(5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-ethyl-amine ولكن لم يتم تقرير أي نشاط حيوي للمركب. تكشف البراءة الأمريكية رقم ٥،٧٩٥،٧٥٦ عن :

6-Chloro-9-(4,4-diphenyl-but-3-enyl)-9*H*-purine and 9-(4,4-Diphenyl-but-3-enyl)-9H-

purin-6-ylamine

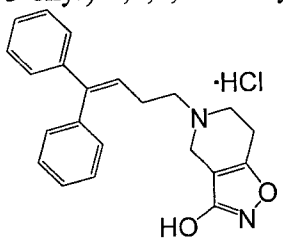
أي،



في صورة مثبطات adenil cyclase . أيضاً، يكشف :

عن Drug Dev. Res.,1990,21,169-188 في Falch, E. et al :

5-(4,4-Diphenyl-but-3-enyl)-4,5,6,7-tetrahydro-isoxazolo[4,5-c]pyridin-3-ol

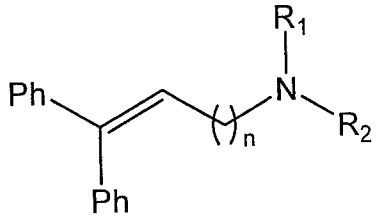


في صورة مثبط امتصاص GABA.

الوصف العام للاختراع

تبين لمبتكري الاختراع الحالي بشكل غير متوقع أن المركبات بالصيغة (I) تظهر نشاط مرغوب فيه لعلاج منظم للمناعة.

لذلك، وفقاً لسمة أولى، يتم توجيه الاختراع الحالي إلى مركب بالصيغة (I)، أو ملح، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه:



(I)

حيث :

تكون Ph عبارة عن phenyl ؛

تكون n عبارة عن ٢، ٣ أو ٤؛

يتم اختيار R_1 من المجموعة المكونة من hydrogen وC_1-C_6 alkyl ؛

تكون R_2 عبارة عن شق بالصيغة $-[[CH(R_3)]_m-R_4]$، حيث

تكون m عبارة عن ١؛

يتم اختيار R_3، متى كان مناسباً، من المجموعة المكونة من hydrogen ، phenyl و C_1-C_6 alkyl ؛

يتم اختيار R_4 من المجموعة المكونة من aryl غير متجانسة ليس بها استبدال، aryl غير متجانسة بها استبدال وشق aryl بها استبدال،

يتم اختيار مجموعات الاستبدال المذكورة من المجموعة المكونة من C_1-C_6 alkyl ، aryl C_7-C_{11} ، alkyl، phenyl ، ٥- أو ٦- ذرات aryl غير متجانسة، F، Cl، Br، I، trifluoromethyl ، cyano ، $-N(R_a)(R_b)$، $-OR_c$، $-SR_d$ أو $-C(O)R_e$؛ حيث R_a، R_b، R_c، R_d، وR_e تختار بشكل مستقل من hydrogen ، C_1-C_6 alkyl ، phenyl و trifluoromethyl ؛

أو

إذا كانت R_1 و/ أو R_3 تختلف عن hydrogen ، فإن R_4 يمكن أن تكون أيضاً عبارة عن phenyl ليس بها استبدال؛

أو

R_1 وR_2، سوياً مع ذرة nitrogen التي يرتبطا بها، من مجموعة aryl غير متجانسة بها أو ليس بها استبدال، حيث تكون مجموعات الاستبدال المذكورة كما تم تعريفها أعلاه؛

بشرط أن :

2-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-phenol,

3-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-phenol,

5-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-2-methoxy-phenol,

4-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-2,6-difluoro-phenol,

benzyl-(5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-ethyl-amine,

6-Chloro-9-(4,4-diphenyl-but-3-enyl)-9H-purine,

9-(4,4-Diphenyl-but-3-enyl)-9H-purin-6-ylamine, and

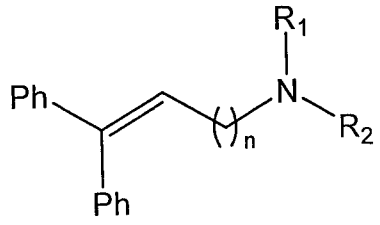
5-(4,4-Diphenyl-but-3-enyl)-4,5,6,7-tetrahydro-isoxazolo[4,5-c]pyridin-3-ol

لا تكون متضمنة في الصيغة (I).

وفقاً لسمة أخرى، يتم توجيه الاختراع الحالي إلى تركيبة صيدلانية تتضمن مركب بالصيغة (I) كما تم تعريفها أعلاه، أو ملح مقبول صيدلانياً، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه، ومادة حاملة carrier واحدة على الأقل مقبولة صيدلانياً.

تشير سمة أخرى من الاختراع إلى مركب بالصيغة (I) كما تم تعريفها أعلاه، أو ملح مقبول صيدلانياً، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه، للاستخدام في صورة دواء.

تشير سمة أخرى من الاختراع إلى المركبات بالصيغة (I)، أو ملح مقبول صيدلانياً، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه،



(I)

حيث :

تكون Ph عبارة عن phenyl ؛

تكون n عبارة عن ٢، ٣ أو ٤؛

يتم اختيار R_1 من المجموعة المكونة من hydrogen و C_1-C_6 alkyl ؛

تكون R_2 عبارة عن شق بالصيغة –[[$CH(R_3)]_m$-R_4]، حيث

تكون m عبارة عن عدد صحيح منتقى من المجموعة المكونة من ١، ٠ أو ٢؛

يتم اختيار كل R_3، متى كان مناسباً، من المجموعة المكونة من hydrogen و C_1-C_6alkyl؛

يتم اختيار R_4 من المجموعة المكونة من aryl غير متجانسة ليس بها استبدال، aryl غير

متجانسة بها استبدال، aryl ليس بها استبدال وشق aryl بها استبدال،

يتم اختيار مجموعات الاستبدال المذكورة من المجموعة المكونة من C_1-C_6alkyl، C_7-C_{11} aryl، alkyl، phenyl ، ٥- أو ٦- ذرات aryl غير متجانسة، F، Cl، Br، I، trifluoromethyl ، cyano ، $-N(R_a)(R_b)$، $-OR_c$، $-SR_d$ أو $-C(O)R_e$؛ حيث R_a، R_b، R_c، R_d، وR_e تختار بشكل مستقل من hydrogen ، C_1-C_6alkyl، phenyl و trifluoromethyl ؛

أو

R_1 وR_2، سوياً مع ذرة nitrogen التي يرتبطا بها، من مجموعة aryl غير متجانسة بها أو ليس بها استبدال، حيث تكون مجموعات الاستبدال المذكورة كما تم تعريفها أعلاه؛

للاستخدام في صورة دواء لمعالجة أمراض التهابية.

وفقاً لسمة أخرى، يتم توجيه الاختراع الحالي إلى استخدام مركب بالصيغة (I) أو ملح مقبول صيدلانياً، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه، في تحضير دواء لمعالجة أمراض التهابية. في سمة أخرى، يتم توجيه الاختراع إلى طريقة معالجة أمراض التهابية، تشتمل الطريقة المذكورة على إعطاء مريض بحاجة لتلك المعالجة كمية فعالة علاجياً من مركب واحد على الأقل بالصيغة (I) كما هي موصوفة أعلاه، أو ملح مقبول صيدلانياً، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه.

وفقاً لسمة أخرى، يتم توجيه الاختراع الحالي إلى عملية لتصنيع المركبات بالصيغة (I)، أو ملح مقبول صيدلانياً، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات

alcoholates منه.

شرح مختصر للرسومات

شكل رقم ١: تثبيط سرطان الدم بالخلية الليمفاوية المزمن chronic lymphocytic leukaemia (CLL) للمركب ٣ في نموذج حيوان طعم خارجي مقارنة بمجموعة مقارنة مُعالجة باستخدام مادة ناقلة vehicle .

شكل رقم ٢: تثبيط ورم ميلانيني متعدد multiple myeloma من المركب ٣ في نموذج حيوان طعم خارجي مقارنة بمجموعة مقارنة مُعالجة باستخدام مادة ناقلة vehicle .

شكل رقم ٣: حيوية الخلايا من المرضى المصابين بسرطان الدم بالخلية الليمفاوية المزمن.

شكل رقم ٤: تثبيط سرطان القولون colon cancer من المركب ٣ في نموذج طعم خيفي بحيوان. أ: صور توضح تأثير تضاؤل حجم الورم من المركب 3, 5-F uracil (٥-FU؛ غير نشط في الظروف التجريبية الخاضعة للاختبار) و Oxaliplatinum (OXA) مقارنة بمجموعة مقارنة مُعالجة باستخدام مادة ناقلة vehicle . ب: رسم بياني يوضح وزن ورم سرطاني بالقولون والمستقيم في البشر من فئران مُعالجة باستخدام المركب ٣ (NF)، Oxaliplatinum (OXA), 5-F) أوراسيل (٥-FU) وتوليفات منه.

شكل رقم ٥: تثبيط ورم ميلانيني Melanoma من المركب ٣ في نموذج حيوان طعم خيفي مقارنة بمجموعة مقارنة مُعالجة باستخدام مادة ناقلة vehicle . أ: صورة PET نشاط إنزيم luciferase لورم ميلانيني Melanoma في الكائن الحي. ب: ورم ميلانيني Melanoma خارج الكائن الحي من

الحيوانات في نهاية العلاج. ج: وزن ورم ميلانيني بعد العينة المقارنة أو العلاج بالمركب ٣ (ع=٤). د: وزن ورم ميلانيني بعد العينة المقارنة أو العلاج بالمركب ٣ (ع=٩).

شكل رقم ٦: تثبيط سرطان المبيض ovarian cancer من المركب ٣ في نموذج حيوان طعم خيفي مقارنة بمجموعة مقارنة مُعالجة باستخدام مادة ناقلة vehicle . أ: صورة PET لنشاط إنزيم luciferase لورم في الكائن الحي. ب: تحديد كمية إشارة إنزيم luciferase من العينة المقارنة والحيوانات المعالجة بالمركب ٣.

شكل رقم ٧: خلايا EHEB (سرطان الدم بالخلية الليمفاوية بالخلية B المزمن) مُعالجة باستخدام المركب ٣ (١٠ ميكرو مولار). أ: مدرجات إحصائية تعرض الموت الخلوي المبرمج المحفز في الخهلايا EHEB بواسطة المركب ٣. ب: التعبير عن البروتينات المختلفة في الخلايا EHEB المعالجة بالمركب ٣.

شكل رقم ٨: خلايا HCT-116 (سرطانة القولون colon carcinomas) مُعالجة باستخدام المركب ٣ (١٠ ميكرو مولار). أ: مدرجات إحصائية تعرض الموت الخلوي المبرمج المحفز في سرطان القولون colon cancer في البشر بسلالة الخلية HCT-116 بواسطة المركب ٣. ب: التعبير عن البروتينات المختلفة ذات الصلة بالموت الخلوي المبرمج أثناء العلاج بالمركب ٣.

<u>الوصف التفصيلي</u>

في سياق الاختراع الحالي، يكون للتعبير التالية المعاني المفصلة فيما يلي:

يشير التعبير "C_1-C_6alkyl" إلى شق سلسلة هيدروكربون مستقيمة أو متفرعة تتكون من ذرة كربون وhydrogen ، تتضمن عدم تشبّع داخلي، تحتوي على ما بين ١ و٦، يفضل بين ١ و٣ ("C_1-C_3alkyl")، ذرات كربون والتي يتم ربطها بباقي الجزيء بواسطة رابطة أحادية، با في ذلك على سبيل المثال وبتعبير غير مقيّد، methyl ، ethyl ، n-propyl ، i-propyl ، n-butyl ، t-butyl ، n-pentyl ،.. الخ.

يشير التعبير " aryl " إلى مجموعة عطرية تحتوي على، ما لم يشار لغير ذلك، بين ٦ و١٨، يفضل بين ٦ و١٠، يفضل أكثر أيضاً ٦ أو ١٠ ذرات كربون، تتضمن ١، ٢ أو ٣ أنوية عطرية، مرتبطة بواسطة رابطة كربون - كربون أو مندمجة، تتضمن على سبيل المثال وبتعبير غير مقيّد، phenyl, naphthyl, diphenyl, indenyl, phenanthryl ،.. الخ.يفضل أن يشير " aryl " إلى phenyl .

يشير "aryl غير متجانسة" إلى شق حلقة ٣- إلى ١٠- ذرات عطرية مستقلة، يفضل حلقة ٥- أو ٦- ذرات عطرية، حيث تتكون من ذرات كربون ومن واحد إلى خمس ذرات غير متجانسة تختار من المجموعة المكونة من nitrogen ، oxygen ، و كبريت. بالنسبة لأغراض ذلك الاختراع، يمكن أن تكون aryl غير المتجانسة عبارة عن نظام حلقي أحادي الحلقة، ثنائي الحلقة، أو ثلاثي الحلقة، حيث يمكن أن يشمل على أنظمة من حلقات مندمجة، كل منها يكون عبارة عن شق مستقر به ٣- إلى ١٠- ذرات حلقة عطرية، يفضل حلقة بها ٥- أو ٦- ذرات عطرية، حيث تتكون من ذرات كربون ومن واحد إلى خمس غير متجانس ذرة تختار من المجموعة المكونة من nitrogen ، oxygen ، وكبريت. يمكن أن تكون ذرة nitrogen ، الكربون أو الكبريت في شق aryl غير المتجانسة مؤكسدة اختيارياً؛ ويمكن أن تكون ذرة nitrogen اختيارياً رباعية. تشتمل أمثلة aryl غير المتجانسة هذه، بدون تقييد، على :

benzimidazole, benzothiazole, furan, pyrrole, thiophene, pyridine, pyrimidine,

isothiazole, imidazole, indole, purine, quinoline, thiadiazole

يفضل، "aryl" غير متجانسة " يشير إلى furan, thiophene, pyridine and benzimidazole.

يشير "Aralkyl " إلى مجموعة aryl متصلة بباقي الجزيء بواسطة مجموعة alkyl مثل benzyl و phenethyl . و يشير التعبير " halogen " إلى bromo, chloro, iodo or fluoro.

المركبات بالصيغة (I)

وفقاً لنموذج مفضل، يشير التعبير " بها استبدال " إلى شق منتقى من المجموعة المكونة من C_1-C_6alkyl، C_7-C_{11} aryl alkyl، phenyl ، ٥- أو ٦- ذرات aryl غير متجانسة، F، Br، I، trifluoromethyl ، cyano ، $N(R_a)(R_b)$-، OR_c-، SR_d- أو $C(O)R_e$-؛ حيث R_a، R_b، R_d، وR_e تختار بشكل مستقل من hydrogen ، C_1-C_6alkyl، phenyl و trifluoromethyl ؛ ويتم اختيار R_c من المجموعة المكونة من C_1-C_6alkyl، phenyl وtrifluoromethyl ، بشرط أن - $N(R_a)(R_b)$ لا تكون NH_2-. يمكن أن تكون الشقوق بها استبدال، على سبيل المثال، aryl أو aryl غير متجانسة، في أي من مواضعها الحرة. في نموذج من الاختراع، تكون الشقوق بها استبدال عبارة عن استبدال في ١، ٢، ٣ أو ٤ من مواقعها، يفضل في ١ أو ٢.

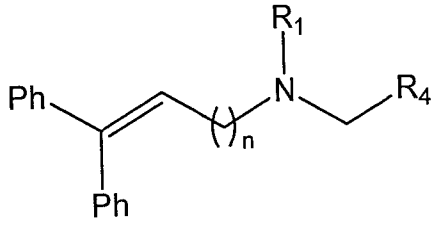
وفقاً لنموذج من الاختراع يتم اختيار مجموعات الاستبدال من المجموعة المكونة من :

methyl, isopropyl, phenylmethyl, phenyl, thiophene, pyridine, F, Br, I, trifluoromethyl,

cyano, amino, methoxi, trifluoromethoxi, and thiometoxi.

يتم توجيه نموذج من الاختراع إلى مركب بالصيغة (IA)، أو ملح، ester، أو إستر حامض أميني

amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه،



(IA)

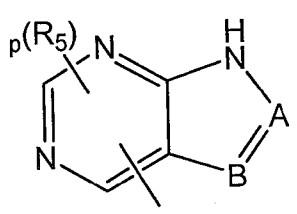
حيث Ph، n، R_1 وR_4 تكون كما تم تعريفها أعلاه.

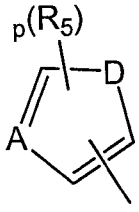
وفقاً لنموذج من الاختراع، تكون R_4 عبارة عن aryl غير متجانسة تختار من المجموعة المكونة من :

thienyl, furyl, pyridil, 1*H*-benzimidazol, 9*H*-Purine, 1*H*-Imidazole, and 1*H*-Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine

حيث يمكن أن تكون كل مجموعة بها استبدال كما تم تعريفها أعلاه.

يتمثل نموذج آخر من الاختراع في مركب بالصيغة (I) أو (IA) أو الأملاح، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه، حيث تكون R_4 عبارة عن مجموعة بالصيغة (V) أو (VI)





(V) (VI)

حيث،

A وB تختار بشكل مستقل من $-CH-$ و$-N-$؛

يتم اختيار D بشكل مستقل من المجموعة المكونة من -O-، $-S-$ و$-NH-$؛

تكون p عبارة عن عدد صحيح منتقى من المجموعة المكونة من ٠، ١، ٢ أو ٣؛

يتم اختيار كل R_5 من المجموعة المكونة من C_1-C_3alkyl، phenyl ، phenylmethyl ، ٥- أو ٦- ذرات aryl غير متجانسة، F، Cl، Br، I، trifluoromethyl ، $-N(R_a)(R_b)$، $-SR_d$ أو $-C(O)R_e$؛ حيث R_a، R_b، R_d، وR_e تختار بشكل مستقل من hydrogen ، C_1-C_3alkyl، phenyl وtrifluoromethyl ، بشرط أن في مركب بالصيغة (V) $-N(R_a)(R_b)$ لا تكون $-NH_2$؛

تكون المجموعة المذكورة بالصيغة (V) أو (VI) مرتبطة بباقي الجزيء من خلال أي من المواضع الحرة.

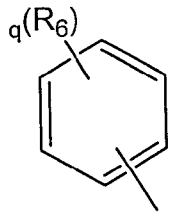
وفقاً لنموذج من الاختراع، يتم اختيار كل R_5، إن وجدت، بشكل مستقل من المجموعة المكونة من :

methyl, isopropyl, phenylmethyl, phenyl, thiophene, pyridine, F, Cl, Br, I,

trifluoromethyl, cyano, amino, methoxi, trifluoromethoxi, and thiometoxi.

وفقاً لنموذج آخر، تكون p هي ١ أو ٢.

وفقاً لنموذج من الاختراع تكون R_4 عبارة عن مجموعة بالصيغة (VII)



(VII)

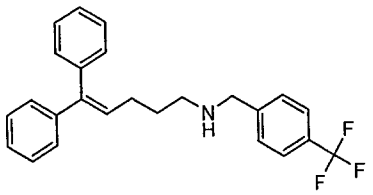
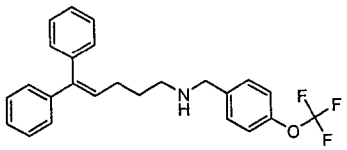
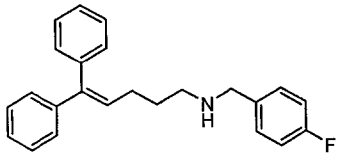
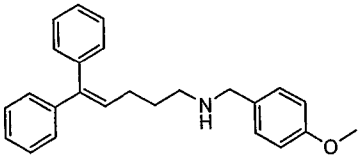
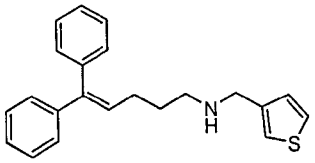
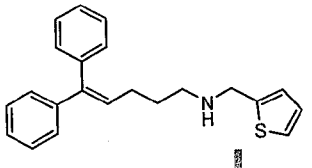
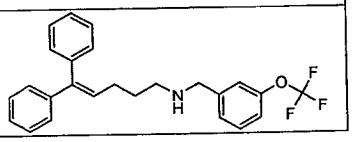
حيث يتم اختيار R_6 من المجموعة المكونة من $-OCF_3$، OC_1-C_3alkyl ، F، Cl، Br، I و-CN؛ وتكون q عبارة عن عدد صحيح منتقى من المجموعة المكونة من ٠، ١، ٢ أو ٣، ويتم ربط المجموعة المذكورة بالصيغة (VII) بباقي الجزيء من خلال أي من المواضع الحرة.

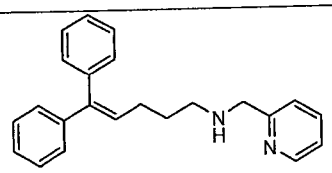
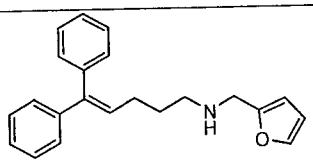
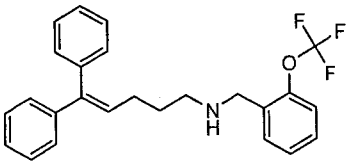
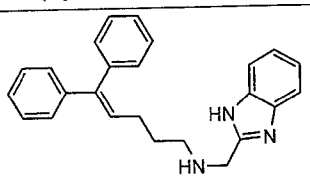
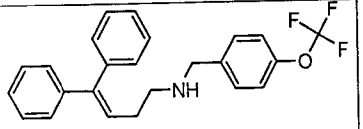
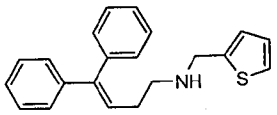
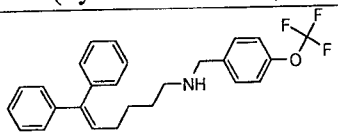
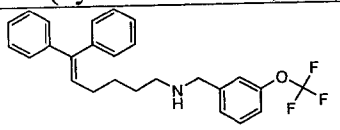
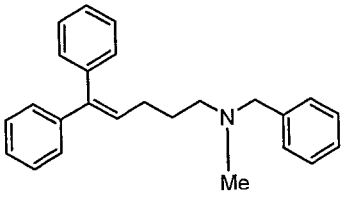
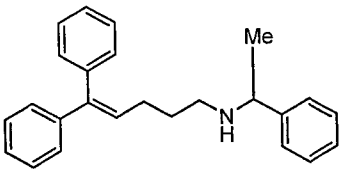
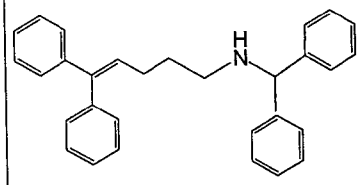
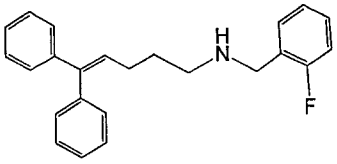
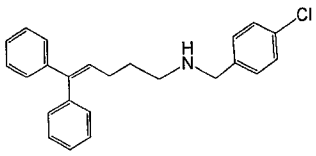
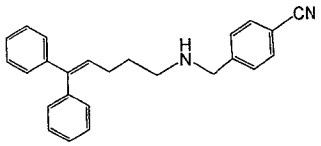
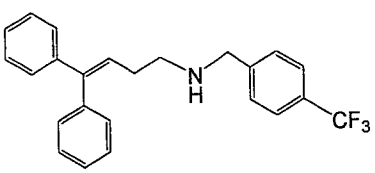
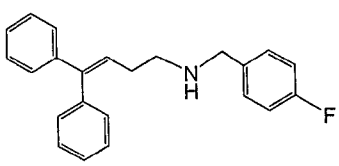
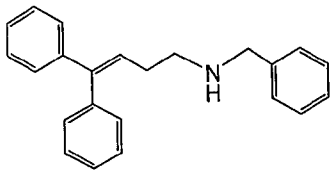
وفقاً لنموذج من الاختراع، R_1 وR_2، سوياً مع ذرة nitrogen التي يرتبطا بها، من شق تختار من المجموعة المكونة من :

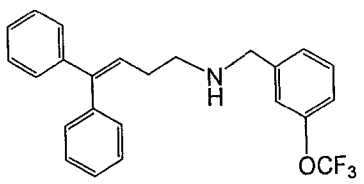
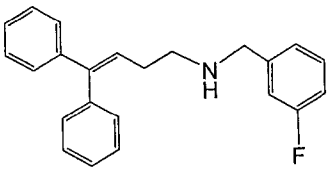
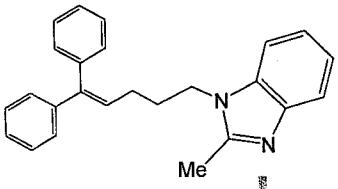
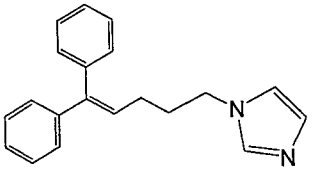
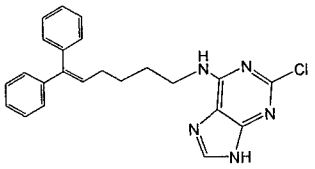
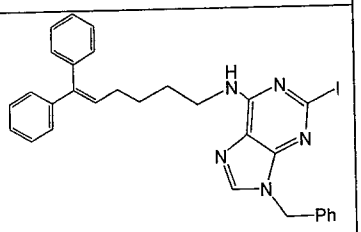
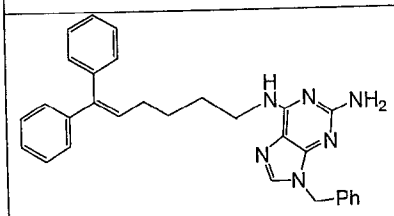
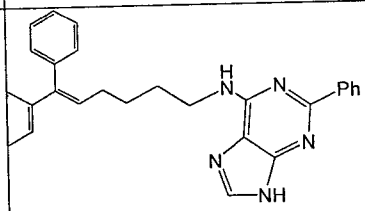
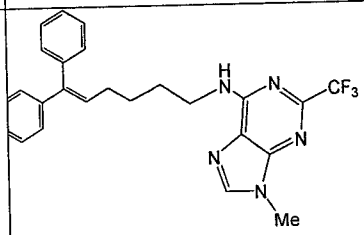
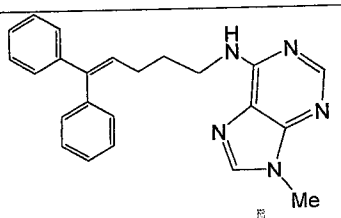
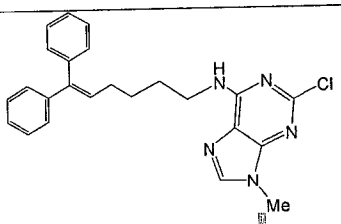
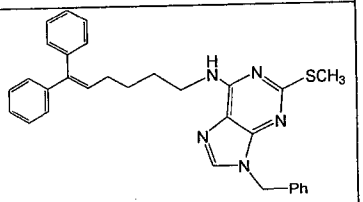
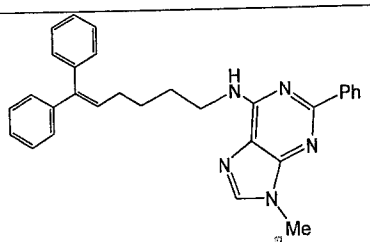
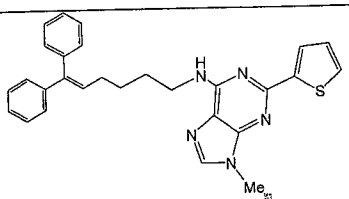
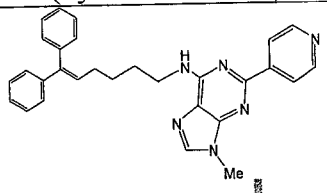
.1*H*-benzimidazol, 9*H*-Purine, 1*H*-Imidazole, and 1*H*-Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine

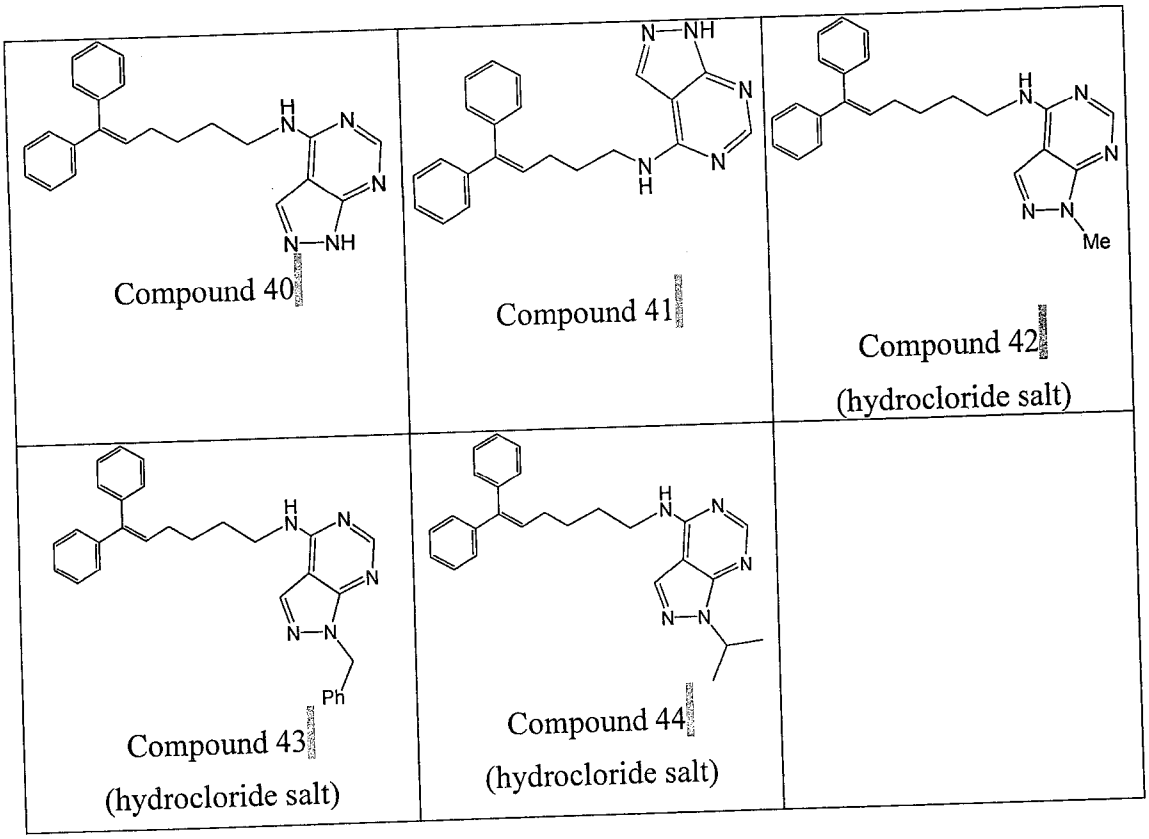
وفقاً لنموذج من الاختراع R_1 هي hydrogen أو methyl .

في نموذج من الاختراع، يتم اختيار مركبات بالصيغة (I) من المجموعة المكونة من :

 Compound 1 (hydrocloride salt)	 Compound 2 (hydrocloride salt)	 Compound 3 (hydrocloride salt)
 Compound 4 (hydrocloride salt)	 Compound 5 (hydrocloride salt)	 Compound 6 (hydrocloride salt)
		

 Compound 7 (hydrocloride salt)	 Compound 8 (hydrocloride salt)	Compound 9 (hydrocloride salt)
 Compound 10 (hydrocloride salt)	 Compound 11 (hydrocloride salt)	 Compound 12 (hydrocloride salt)
 Compound 13 (hydrocloride salt)	 Compound 14 (hydrocloride salt)	 Compound 15 (hydrocloride salt)
 Compound 16 (hydrocloride salt)	 Compound 17 (hydrocloride salt)	 Compound 18 (hydrocloride salt)
 Compound 19 (hydrocloride salt)	 Compound 20 (hydrocloride salt)	 Compound 21 (hydrocloride salt)
 Compound 22 (hydrocloride salt)	 Compound 23 (hydrocloride salt)	 Compound 24 (hydrocloride salt)

 Compound 25 (hydrocloride salt)	 Compound 26 (hydrocloride salt)	 Compound 27
 Compound 28	 Compound 29	 Compound 30 (hydrocloride salt)
 Compound 31	 Compound 32	 Compound 33
 Compound 34	 Compound 35	 Compound 36 (hydrocloride salt)
 Compound 37	 Compound 38	 Compound 39



أو ملح، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide و/ أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه.

٥ قد تكون المركبات التي لها الصيغة (I) في صورة أملاح، يفضل أملاح مقبولة صيدلانياً، في صورة هيدرات hydrates وكحولات alcoholates أو ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide . يتعلق التعبير "أملاح مقبولة صيدلانياً، هيدرات hydrates وكحولات alcoholates أو ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate ١٠ أو amide منها" بأملاح، هيدرات hydrates وكحولات alcoholates أو ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate

أو amide والتي، عند إعائها إلى المتلقي، يمكن أن توفر (على نحو مباشر أو غير مباشر) مركب كالموصوف في الطلب الحالي. ومع ذلك، يلاحظ أن الأملاح غير المقبولة صيدلانياً تقع أيضاً ضمن مجال الاختراع لأنها يمكن أن تكون مفيدة في تحضير أملاح مقبولة صيدلانياً. ويمكن تحضير الأملاح من خلال الطرق المعروفة في الحالة الراهنة للفن. وبشكل مفضل يتعلق الاصطلاح "مقبولة صيدلانياً" بكيانات وتركيبات جزيئية محتملة فسيولوجياً ولا تؤدي نمطياً إلى تفاعل حساسية أو تفاعل آخر غير مستحب، مثل الاضطرابات المعدية، الدوار وما شابه ذلك، حين يتم الإعطاء لإنسان أو حيوان. ويعني الاصطلاح "مقبولة صيدلانياً" أنها مجازة بواسطة جهة تشريعية في حكومة فيدرالية أو حكومة ولاية أو تكون ضمن دساتير الأدوية الأمريكية أو غير ذلك من دساتير الأدوية المتعارف عليها بشكل عام للاستخدام في الحيوانات، وبشكل أكثر تحديداً في البشر.

وينبغي فهم الاصطلاح "هيدرات hydrates وكحولات alcoholates" وفقاً للاختراع باعتباره يعني أية صورة من المركب الفعال وفقاً للاختراع بها جزيء آخر (على الأرجح مذيب قطبي polar solvent) مرتبط بها من خلال الارتباط غير التساهمي. تضم أمثلة مركبات الهيدرات ومركبات الكحولات، على سبيل المثال ميثانولات. وبشكل مفضل، تكون هيدرات hydrates وكحولات alcoholates عبارة عن هيدرات hydrates وكحولات alcoholates مقبولة صيدلانياً.

ويمكن أن يتم تحضير الأملاح وهيدرات hydrates وكحولات alcoholates بالطرق المعروفة في المجال. على سبيل المثال، يتم تصنيع الأملاح المقبولة صيدلانياً من المركبات الواردة في الطلب الحالي من المركب الأصلي، حيث تحتوي على شقوق قاعدية، بالطرق الكيميائية التقليدية. عموماً، يتم تحضير هذه الأملاح، على سبيل المثال، من خلال تفاعل صور القاعدة الحرة من هذه المركبات مع القاعدة أو الحمض الملائم في الماء أو في مذيب عضوي أو في خليط من الاثنين.

بشكل عام، يفضل الأوساط غير المائية مثل ether, ethyl acetate, ethanol, isopropanol or acetonitrile. تضم أمثلة أملاح إضافة الحمض أملاح إضافة حمض معدني مثل، على سبيل المثال، الأملاح الأحادية والثنائية من hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, sulphate, nitrate, phosphate ، وأملاح إضافة حمض عضوي مثل، على سبيل المثال،الأملاح الأحادية والثنائية من :

acetate, maleate, fumarate, citrate, oxalate, succinate, tartrate, malate, mandelate, methanesulphonate and p-toluenesulphonate.

. وفي نموذج مفضل، يكون الملح عبارة عن hydrocloride أو ملح fumarate .

إحدى الصور المقبولة صيدلانياً هي الصورة البلورية، بما في ذلك هذه الصورة في تركيبة صيدلانية. وفي حالة الأملاح وهيدرات hydrates وكحولات alcoholates لابد أيضاً أن تكون الشقوق الأيونية الإضافية وهيدرات hydrates وكحولات alcoholates غير سامة. ويمكن أن تقدم المركبات الواردة في الاختراع صوراً متعددة الأشكال، يضم الاختراع كافة هذه الصور.

يتضمن نطاق الاختراع الحالي أي مركب يكون عبارة عن ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide من مركب له الصيغة (I). يتم استخدام التعبير "ester"، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide " بمعناه الأرحب ويشتمل تلك المشتقات التي يتم تحويلها في الكائن الحي إلى المركبات من الاختراع. تكون أمثلة الطرق المعروفة جيداً لإنتاج ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide من مركب فعال معين لأولئك المهرة في الفن ويمكن العثور عليها على سبيل المثال، في :

Krogsgaard-Larsen et al., Textbook of Drug design and Discovery, Taylor & Francis (April 2002)

تظهر المشتقات المذكورة فعلياً لأولئك المهرة في الفن، وتشمل، بناء على المجموعات الوظيفية الموجودة في الجزيء ودون حصر، على مشتقات المركبات الحالية التالية:

esters, amino acid esters, phosphate esters, metal salts sulfonate esters, carbamates, and amides

كذلك تضم المركبات الواردة في الاختراع المركبات التي تختلف فقط في وجود واحدة أو أكثر من الذرات الثرية من حيث النظائر. على سبيل المثال، ويضم مجال الاختراع المركبات التي لها البنى الحالية فيما عدا استبدال hydrogen بواسطة deuterium أو tritium ، أو استبدال ذرة كربون بواسطة كربون ثري بـ ^{13}C أو ^{14}C أو ذرة nitrogen بواسطة nitrogen ثري بـ ^{15}N

ويمكن أن تضم المركبات الواردة في الاختراع الحالي والممثلة بالصيغة (I) المبينة أعلاه متشاكلات اعتماداً على وجود مراكز كيرالية أو أيزومرات اعتماداً على وجود روابط متعددة (على سبيل المثال E، Z). يضم مجال الاختراع الحالي الأيزومرات المفردة single isomers ، المتشاكلات enantiomers أو الأيزومرات الفراغية diastereoisomers وخلائطها.

استخدام مركبات لها الصيغة (I)

وفقاً لنموذج مفضل، يتم اختيار المرض الالتهابي من مرض التهاب الأمعاء Inflammatory Bowel Disease (IBD)، التهاب المفاصل الروماتويدي Rheumatoid Arthritis (RA) ، تضخم

البروستاتا الحميد benign prostatic hyperplasia ، مرض باريت Barrett، الربو asthma ، الهيكل العظمي وإصلاح الوتر skeletal muscle and tendon repair ، التهاب القولون التقرحي ulcerative colitis ، داء الليشمانيات leishmaniasis وأمراض المناعة الذاتية autoimmune diseases ، يفضل مرض Crohn. وفقاً لنموذج آخر، يكون المرض هو السرطان، على سبيل المثال، المنتقى من المجموعة المكونة من الورم النقيلي، سرطان الثدي breast cancer، سرطان المريء esophageal cancer ، سرطان القولون colon cancer ، سرطانة القولون colon carcinomas ، سرطان المعدة stomach cancer ، سرطانات الدم Leukemias ، ورم ميلانيني Melanoma ، سرطانة الرحم carcinomas of the uterus ، سرطان الرئة غير الخلية الصغيرة non-small cell lung cancer ، سرطان الرئة الخلية الصغيرة small cell lung cancer ، سرطان المبيض ovarian cancer ، سرطانة المبيض ovarian carcinomas، سرطان البروستاتا prostate cancer ، سرطان الكلى renal cancer ، سرطان الكبد liver cancer سرطانة البنكرياس carcinomas of the pancreas ، سرطان الكلى renal cancer ، سرطان المثانة، سرطان البروستاتا ،سرطان الخصية، سرطان العظام، سرطان الجلد skin cancer ، ساركومة، ساركومة Kaposi، أورام المخ brain tumours ، ساركومة عضلية myosarcomas ، أورام أرومية عصبية neuroblastomas ، أورام ليمفية limphomas وورم ميلانيني متعدد multiple myeloma .

يعني الاصطلاح "علاج" أو "يعالج" أو "معالجة" في سياق هذه المواصفة إعطاء مركب أو صيغة وفقاً للاختراع لمنع، تخفيف أو إزالة المرض أو واحد أو أكثر من الأعراض المرتبطة بالمرض المذكور. يضم "علاج" أيضاً منع، تخفيف أو إزالة التوابع الفسيولوجية للمرض.

وينبغي إدراك أن الاصطلاح "يخفف" في سياق الاختراع الحالي باعتباره يعني أي تحسن في موقف المريض المعالج – إما ذاتياً (بشكل يتمثل في شعور المريض) أو موضوعياً (بشكل يتمثل في

المتغيرات المقاسة).

تركيبات صيدلانية

وفقاً لسمة أخرى، يتم توجيه الاختراع الحالي إلى تركيبة صيدلانية تتضمن مركب بالصيغة (I) كما تم تعريفها أعلاه، أو ملح مقبول صيدلانياً، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه، ومادة حاملة carrier واحدة على الأقل مقبولة صيدلانياً.

يشير الاصطلاح "مادة حاملة carrier " إلى مادة مخفِّفة diluent ، مادة مساعدة adjuvant ، سواغ excipient ، أو مادة ناقلة vehicle يتم إعطاء المكون الفعال معها. ويمكن أن تكون هذه المواد الحاملة الصيدلانية عبارة عن سوائل معقمة، مثل الماء والزيوت، بما في ذلك تلك التي من أصل بترولي، حيواني، نباتي أو تخليقي، مثل زيت الفول السوداني، زيت فول الصويا، زيت معدني، زيت السمسم وما شابه ذلك. يتم بشكل مفضل استخدام الماء أو المحاليل الملحية من المحاليل المائية والديكستروز المائي ومحاليل glycerol كمواد حاملة، خصوصاً للمحاليل القابلة للحقن. يتم وصف المواد الحاملة الصيدلانية المناسبة في :

Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin, 21st Edition, 2005"؛ أو

Handbook of Pharmaceutical Excipients", Rowe C. R."؛ Paul J. S.؛ Marian E. Q., sixth Edition.

وبشكل مفضل، تكون المواد الحاملة الواردة في الاختراع مجازة بواسطة جهة تشريعية من حكومة فيدرالية أو حكومة ولاية أو مدرجة في دستور الأدوية الأمريكي أو غيره من دساتير الأدوية المعترف بها بشكل عام للاستخدام في الحيوانات، وبشكل أكثر تحديداً في البشر. وتعتمد المواد

الحاملة والمواد الثانوية اللازمة لتصنيع الصورة الصيدلانية المرغوب فيها لإعطاء التركيبة الصيدلانية الواردة في الاختراع، بين عوامل أخرى، على الصورة الصيدلانية المختارة للإعطاء. ويتم تصنيع الصور الصيدلانية المذكورة لإعطاء التركيبة الصيدلانية وفقاً للطرق التقليدية المعروفة لمن يتمتع بالمهارة في المجال. ويمكن الاطلاع على عرض لطرق إعطاء المكونات الفعالة المختلفة، السواغات التي يمكن استخدامها وعمليات إنتاجها في :

Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin, 21st Edition, 2005؛

أو :

Handbook of Pharmaceutical Excipients", Rowe C. R.; Paul J. S.; Marian E. Q., sixth "

Edition.

وتضم أمثلة التركيبات الصيدلانية أية تركيبات صلبة (أقراص، حبات، كبسولات، حبيبات إلخ.) أو سائلة (محاليل، معلقات أو مستحلبات) للإعطاء بطريق الفم، موضعياً أو بغير طريق الفم.

في نموذج مفضل تكون التركيبات الصيدلانية في صورة فموية. وقد تكون صور الجرعات المناسبة للإعطاء بطريق الفم عبارة عن أقراص وكبسولات ويمكن أن تحتوي على السواغات التقليدية المعروفة في المجال مثل عوامل الربط، على سبيل المثال الشراب، السنط، الجيلاتين، sorbitol ، كثيراء، أو polyvinylpyrrolidone ؛ المواد المالئة fillers ، على سبيل المثال lactose السكر، نشا الذرة، calcium phosphate ، sorbitol أو glycine ؛ المواد المزلّقة في تكوين الأقراص، على سبيل المثال magnesium stearate ؛ المواد المفكّكة disintegrants ، على سبيل المثال النشا، polyvinylpyrrolidone ، sodium starch glycolate أو السليولوز دقيق البلورات microcrystalline cellulose ؛ أو العوامل المرطّبة المقبولة صيدلانياً مثل sodium lauryl sulfate

ويمكن تحضير التركيبات الفموية الصلبة بالطرق التقليدية للتوليف، التعبئة أو تكوين الأقراص. ويمكن استخدام عمليات التوليف المتكرر لتوزيع العامل الفعال في كل التركيبات باستخدام كميات كبيرة من المواد المالئة fillers . وتعتبر هذه العمليات تقليدية في المجال. ويمكن تحضير الأقراص على سبيل المثال بالتحبب الرطب أو الجاف ويتم اختيارياً تغليفها وفقاً للطرق المعروفة جيداً في المجال الصيدلاني المعتاد، خصوصاً باستخدام غلاف معوي.

يمكن أيضاً تهيئة التركيبات الصيدلانية للإعطاء بغير طريق الفم، مثل المحاليل المعقمة، المعلقات أو المنتجات المجففة بالتجميد في صورة جرعة الوحدة الملائمة. ويمكن استخدام السواغات الكافية، مثل عوامل زيادة الحجم، العوامل المنظِّمة أو المواد الخافضة للتوتر السطحي.

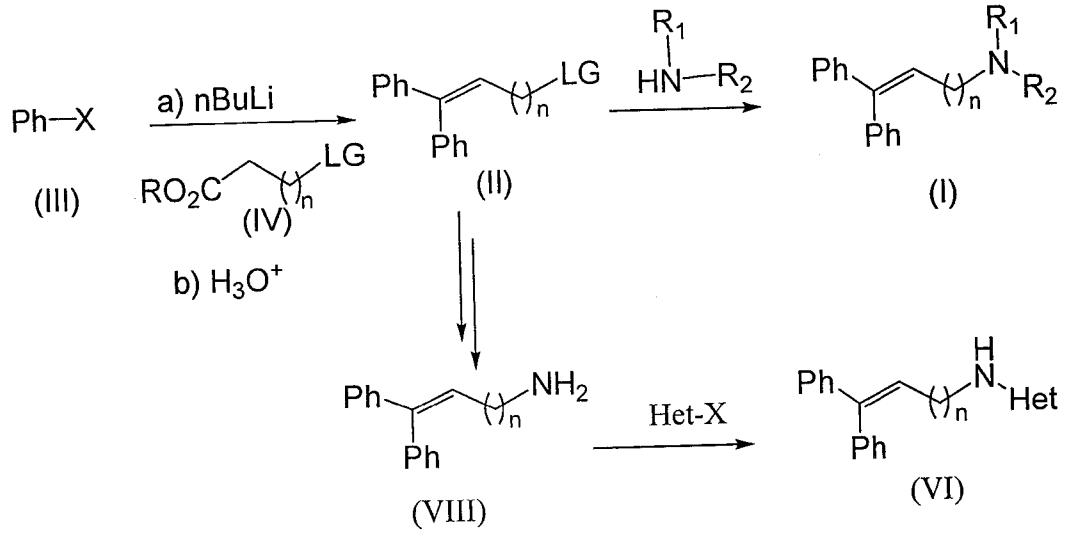
ويتم تحضير الصيغ المذكورة بالطرق العيارية مثل تلك المبينة أو المشار إليها دستوري الأدوية الأسباني والأمريكي وغير ذلك من النصوص المرجعية.

وبشكل عام تعتمد الكمية الفعالة المعطاة من مركب وارد في الاختراع على الفعالية النسبية للمركب المختار، شدة الاضطراب الجاري علاجه ووزن المصاب. ومع ذلك، يتم نمطياً إعطاء المركبات مرة واحدة أو أكثر في اليوم، على سبيل المثال ١، ٢، ٣ أو ٤ مرات في اليوم، بجرعات يومية إجمالية نمطية تتراوح بين ٠,٠١ و١٠٠٠ مجم/ كجم/ يوم. يمكن استخدام التركيبات الصيدلانية من الاختراع في توليفة مع مكونات فعالة أخرى، مثل المركبات الإضافية للاستخدام في علاج أمراض التهابية. يمكن استخدام التركيبات المذكورة، على هيئة تحضيرات من كل مكون (المركب وفقاً للصيغة (I) أو ملح مقبول صيدلانياً، ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه ومكون فعال إضافي)، لإعطائها بالتزامن، على نحو منفصل أو تتابعي.

تصنيع مركبات لها الصيغة (I)

يمكن تصنيع المركبات من الاختراع الحالي في تتابع متعدد الخطوات بواسطة إجراءات التصنيع المتوفرة. على سبيل المثال، يمكن تحضيرها بواسطة العملية الموجزة في المخطط العام ١ الموضح فيما يلي:

المخطط ١



في نموذج محدد، يمكن تحضير المركبات التي لها الصيغة (I) عن طريق تفاعل مستبدل من المشتق (II) باستخدام أمينات تحمل شقوق R_1 وR_2 في وجود قاعدة ومذيب عضوي ومذيب عضوي. وفقاً لنموذج مفضل، تم استخدام diisopropylethylamine أو potassium carbonate في صورة قاعدة. وفقاً لنموذج أخر مفضل، يكون المذيب العضوي هو acetonitrile أو ethanol المجموعة تاركة الحالية (LG) في المركبات (II) يفضل تختار من halide و sulfonate . يفضل أكثر، أن يكون bromide .

بالإضافة إلى ذلك، عندما يكون أمين أولي primary amine ($H = R_1$)، الناتج المركب (I) يمكن أيضاً ألكلتها بواسطة المعالجة باستخدام alkylated ($X-R_1$)؛ حيث تكون R_1 عبارة عن C_1-

C_6alkyl أو Aralkyl C_7-C_{15}) في وجود قاعدة. في نموذج محدد، يمكن تحضير المركبات التي لها الصيغة (II) بإضافة phenyl- lithium halide إلى ester له الصيغة (IV) وتجفيف التفاعل مرة أخرى. وفقاً لنموذج مفضل، تم تحضير مركب lithium العضوي بإضافة n-butyllithium إلى phenyl halide . وفقاً لنموذج أخر مفضل، يتم تنفيذ خطوة التجفيف في وجود حمض. في نموذج مفضل، يكون الحمض هو H_2SO_4. يفضل تصنيع المركبات (II) في وجود مذيب أثيري. يفضل أكثر، ان تختار من diethyl ether و tetrahydrofuran .

في نموذج محدد، المركبات التي لها الصيغة (VI)، أي، مركب له الصيغة (I) حيث R1 تكون hydrogen ، R_2 عبارة عن $-[[CH(R_3)]_m-R_4]$-، m هي صفر وR_4 بها استبدال أو ليس بها استبدال بـ aryl غير متجانس كما تم تعريفها في هذا الطلب، يمكن تحضيرها عن طريق تفاعل أمين له الصيغة (VIII) بحيث يكون المناظر به استبدال أو ليس به استبدال بشق aryl غير متجانس مهلجن (X–Het؛ X هي F، Br، Cl أو I) في وجود قاعدة ومذيب عضوي.

وفقاً لنموذج مفضل، تم استخدام diisopropylethylamine أو potassium carbonate في وجود قاعدة. وفقاً لنموذج أخر مفضل، يكون المذيب العضوي هو ethanol . وتعرف ظروف أخرى لألكلة الأمينات alkylation of amines للشخص الماهر في المجال.

في نموذج محدد، يمكن تحضير المركبات التي لها الصيغة (VIII) عن طريق تفاعل المركب (III) باستخدام sodium azide في DMF واختزال لاحق لهذه azides باستخدام :

triphenylphosphine في THF.

ويتم تفسير الاختراع الحالي بالإضافة إلى ذلك أدناه عن طريق الأمثلة. لا ينبغي تفسير الشرح بأي

حال من الحوال على أنه يقيد نطاق الاختراع على النحو المحدد في عناصر الحماية.

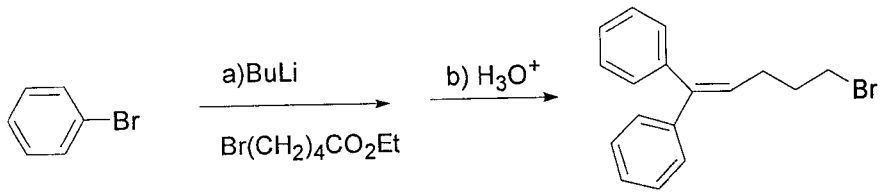
الأمثلة

تم تحضير المركبات التي لها الصيغة (I) وفقاً للاختراع الحالي بإتباع استراتيجية عامة مفصلة أدناه. ويرد وصف مفصل لتحضير بعض المركبات فيما بعد. وتكون جميع المواد المتفاعلة المستخدمة متاحة تجارياً.

مثال رقم ١: تصنيع :

(5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-(4-fluoro-benzyl)-amine hydrocloride (المركب ٣)

خطوة ١. تصنيع 5-bromo-1,1-bisphenylpentene



محلول من bromobenzene (٢٠,٨٦ مل، ٠,٢٢٥ مول) في Et_2O لا مائي (٦٠ مل) تمت إضافة، في جو من argon ، إلى خليط من ٢,٥ مولار n-butyllithium (١٠٠ مل، ٠,٢٥٠ مول) في لا مائي Et_2O (١٠٠ مل) مع الحفاظ على درجة الحرارة عند ٥-١٠ م. تم الاستمرار في التقليب عند ١٠° م لمدة ١٥ دقيقة أخرى قبل تبريد الخليط إلى -٧٠ م. تمت إضافة محلول من ethyl 5-bromovalerate (١٤,٥٤ مل، ٠,٠٩٠ مول) في لا مائي Et_2O (٦٠ مل) مع الحفاظ على درجة الحرارة أقل من -٦٥ م. عندما تم اكتمال الاضافة تم تقليب الخليط عند -٧٠ م لمدة ٢,٥ ساعة. ماء بارد (٧٥ مل) وتمت إضافة ١ ع HCl مائي بارد (٣٥ مل) على التوالي في حين تم الحفاظ على درجة الحرارة أقل من ٠ م.

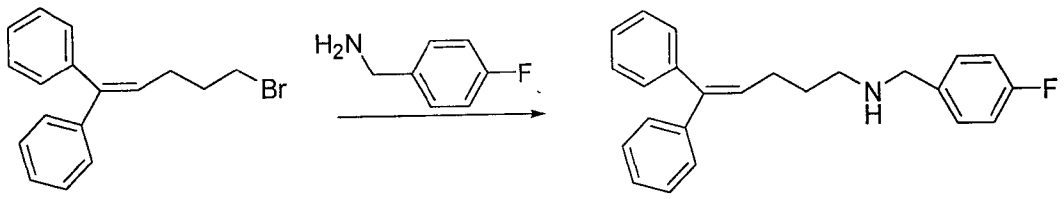
تم تقليب خليط التفاعل لمدة ١٥ دقيقة مع السماح لدرجات الحرارة في الارتفاع عند > صفر° م، وفصل الأطوار. تم استخلاص الطور المائي بواسطة Et_2O (٧٥ مل)، وغسل الأطوار العضوية organic phases المجمعة باستخدام ماء (٦٠ مل) ومحلول ملحي (٦٠ مل). تم تجفيف المحلول فوق كبريتات صوديوم لا مائية over anhydrous sodium sulphate وتم تبخير المذيب في وسط مفرغ للحصول على ٤٦,٥ جم من المادة الصلبة، الذي تمت إذابته في 2-propanol (٢٢٥ مل).

تمت إضافة ٢٠٪ محلول H_2SO_4 مائي (٢٥ مل)، وتم تقليب الخليط إلى الارجاع لمدة ساعة. تم تبخير المذيبات في وسط مفرغ للحصول على الباقي الذي تم تقسيمه بين CH_2Cl_2 (٤٠٠ مل) ومحلول $NaHCO_3$ مشبع (٧٥ مل). تم فصل الأطوار، واستخلاص الطور المائي مرة أخرى باستخدام CH_2Cl_2 (٧٥ مل). تم غسل الأطوار العضوية organic phases المجمعة باستخدام ماء (٧٥ مل)، محلول ملحي (٧٥ مل)، وتجفيفها فوق كبريتات صوديوم لا مائية over anhydrous sodium sulphate . تم تبخير المذيب في وسط مفرغ للحصول على 5-bromo-1-1-bisphenylpentene (٢٠,٠ جم، ٧٣,٧٪) في صورة زيت أصفر.

^1H NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 7.2-7.4 (m, 10 H); 6.2 (t, 1H); 3.3 (t, 2H); 2.3 (q, 2H); 1.9 (q, 2H).

المركبات الإضافية:

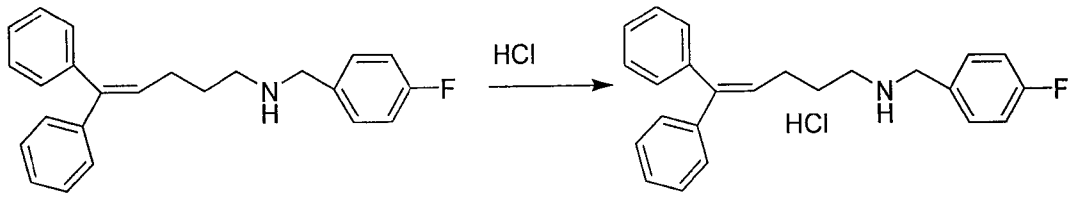
خطوة ٢. تصنيع (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-(4-fluoro-benzyl)-amine



تمت إضافة 4-fluoro-benzylamine (٠,٦٢ جم، ٥ ملي مول) وK_2CO_3 (٠,٧ جم، ٥ ملي مول) إلى محلول من 5-bromo-1-1-bisphenylpentene (٠,٧٥ جم، ٢,٥ ملي مول) في ٢٥ مل من أسيتو نيتريل. تم تسخين التفاعل إلى الإرجاع تحت التقليب لمدة ١٦ ساعة. تمت إزالة المذيب تحت ضغط منخفض، تمت إضافة ماء واستخلاص الخليط بواسطة CH_2Cl_2 (٣ × ٥٠ مل). تم تجفيف الطبقة العضوية فوق كبريتات صوديوم لا مائية over anhydrous sodium sulphate وتبخير المذيب في وسط مفرغ للحصول على زيت الذي تمت تنقيته بواسطة كروماتوجراف ومضي (TEA/ heptane /AcOEt ٤٥ :٥٥ :١) للحصول على ٠,٥٨ جم (حصيلة ٦٧,١٪) من (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-(4-fluoro-benzyl)-amine في صورة زيت أصفر.

^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 7.2-7.5 (m, 12H); 7.0-7.1 (m, 2H); 6.2 (t, 1H); 3.8 (s, 2H); 2.7 (t, 2H); 2.3 (c, 2H); 1.7 (q, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 163.2; 143.4; 141.9; 139.5; 132.5; 132.3; 129.6; 128.3; 128.1; 127.1; 126.6; 125.7; 116.3; 115.9; 49.6; 45.3; 26.7; 25.8.

خطوة ٣. تصنيع (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-(4-fluoro-benzyl)-amine hydrocloride (المركب ٣)



تمت إضافة محلول من HCl ١ مولار في Et_2O لا مائي (٣ مل، ٣ ملي مول) ضمن ١٠ دقيقة. إلى محلول من (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-(4-fluoro-benzyl)-amine (١ جم، ٣ ملي مول) في ١٠٠ مل من Et_2O لا مائي. تم تقليب التفاعل لمدة ٣٠ دقيقة. تم ترشيح المادة الصلبة، وتحويلها إلى طبق تبلر crystallising dish وتجفيفها عند ٥٠°م في فرن مفرغ (حصيلة ٠,٩ جم، ٨٤,٧٪). نقطة الانصهار = ١٢٨,٠-١٣٠,١ م.

^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 9.9 (bs, 2H); 7.6-7.5 (m, 2H); 7.3-7.0 (m, 12H); 5.9 (t, 1H); 4.0 (bs, 2H); 2.7 (t, 2H); 2.2-1.9 (m, 4H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 163.2; 143.4; 141.9; 139.5; 132.5; 132.3; 129.6; 128.3; 128.1; 127.1; 126.6; 125.7; 116.3; 115.9; 49.6; 45.3; 26.7; 25.8

تم الحصول على المركبات التالية بإتباع عملية التصنيع العام الموصوفة أعلاه للمركبات التي لها الصيغة (I)، بشكل محدد عن طريق تفاعل 5-bromo-1-1-bisphenylpentene مع arylbenzylamines المناظرة:

مثال رقم ٢: (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-(4-trifluoromethoxybenzyl) amine hydrochloride (المركب ٢)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.2 (m, 14H); 6.1 (t, 1H); 3.8 (s, 2H); 2.7 (t, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.7 (m, 2H)

مثـال رقـم ٣: (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-(4-trifluoromethylbenzyl)amine hydrochloride (المركب ١). نقطة الانصهار: ١٢١,٤-١٢٢,٧ م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 10.1 (s, 2H,); 7.7-7.6 (m, 4H); 7.0-6.8 (m, 10H); 5.9 (t, 2H,); 4.0 (s, 2H); 2.6 (bs 2H); 2.1-1.9 (m, 4H).

مثال رقم ٤: (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-(4-methoxybenzyl)amine hydrochloride (المركب ٤) نقطة الانصهار: ٦٩,٢-٧٣,٨ م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 9.7 (bs , 2H); 7.4 (d,2H); 7.3-7.0 (m, 10H); 6.8 (d, 2H); 5.9 (t, 1H); 3.9 (bs 2H); 3.7 (s, 3H); 2.6 (bs, 2H,); 2.1-1.9 (m, 4H).

مثال رقم ٥: (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-thiophen-3-ylmethylamine hydrochloride(المركب ٥). نقطة الانصهار: ١٠٨,٠-١٠٩,٧ م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 9.8 (bs, 2H); 7.5-7.4 (m, 1H); 7.3-7.0 (m, 12H); 5.9 (t, 1H); .4.0 (bs , 2H); 2.7 (bs, 2H); 2.1-1.9 (m, 4H)

مثال رقم ٦: (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-thiophen-2-ylmethyl-amine hydrochloride (المركب ٦). نقطة الانصهار: ١٦١,٠-١٦١,٦ م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.4-7.1 (m, 11H); 6.9 (m, 2H;); 6.1 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.7 (t, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.6 (m, 2H)

مثال رقم ٧: (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)pyridin-2-ylmethylamine hydrochloride (المركب ٧). نقطة الانصهار: ١٢٥,٠-١٢٦,٩ م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 8.5 (m, 1H); 7.8 (m, 2H); 7.4-7.0 (m, 11H); 5.9 (t,1H); 4.4 (s, 2H); 2.9 (t, 2H); 2.2-2.0 (m, 4H)

مثال رقم ٨: (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)furan-2-ylmethylamine hydrochloride (المركب ٨). نقطة الانصهار: ١٣٩,٠-١٤١,٣ م.

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ (ppm): 9.5 (bs, 2H); 7.7 (m, 1H); 7.5-7.0 (m, 10H); 6.6(m, 1H); 6.5 (m, 1H); 6.0 (t, 1H); 4.1 (bs, 2H); 2.8 (bs, 2H);); 2.1-2.0 (m, 2H); 1.8-1.7 (m, 2H)

مثال رقم ٩: (5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-(3-trifluoromethoxy-benzyl)amine hydrochloride (المركب ٩). نقطة الانصهار: ١٠٢,٤-١٠٤,٠ م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 10.0 (bs 2H); 7.6-7.0 (m, 14H); 5.9 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.7 (bs, 2H); 2.1-1.9 (m, 4H)

مثال رقم ١٠:

(5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-(2-trifluoromethoxybenzyl)amine hydrochloride (المركب ١٠). نقطة الانصهار: ١٠٩,٠-١١٠,٧ م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 10.0 (bs, 2H), 8.0 (m, 1H); 7.4-7.0 (m, 13H); 5.9 (t, 1H); 4.2 (s, 2H); 2.7 (bs, 2H); 2.1-2.0 (m, 4H)

مثال رقم ١١:

(1H-benzoimidazol-2-ylmethyl)-(5,5-diphenyl-pent-4-enyl)amine hydrochloride

(المركب ١١). نقطة الانصهار: ٢٥١,٠-٢٥٣,٨ م.

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ (ppm): 10.1 (bs, 2H); 7.8-7.1 (m, 14H); 6.2 (bs 2H,); 6.1 (t,1H); 4.6 (s, 2H); 3.0 (bs, 2H); 2.1-2.0 (m, 2H); 1.8-1.0 (m, 2H)

مثال رقم ١٢:

(4,4-diphenyl-but-3-enyl)-(4-trifluoromethoxybenzyl)amine hydrochloride

(المركب ١٢). نقطة الانصهار: ١٢٦-١٢٨. م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 10.1 (s, 1H); 6.1 (t, 1H); 7.5 (d, 2H); 7.3-7.0 (m, 12H); 3.9 (s, 2H); 2.8 (m, 2H); 2.6 (m, 2H)

مثال رقم ١٣: (4.4-diphenyl-but-3-enyl)-thiophen-2-ylmethyl-amine hydrochloride

(المركب ١٣). نقطة الانصهار: ١٦٣-١٦٥,٥ م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 2.3 (q, 2H); 2.8 (t, 2H); 4.0 (s, 2H); 6.1 (t, 1H); 6.9 (m, 2H); 7.0 (m, 8H); 7.4 (m, 3H)

مثال رقم ١٤: (6,6-diphenyl-hex-5-enyl)-(4-trifluoromethoxybenzyl)amine hydrochloride (المركب ١٤). نقطة الانصهار: ١٠٩-١١٠,٥ م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 10.0 (m, 2H); 7.6 (d, 2H); 7.4-7.0 (m, 14H); 6.0 (t, 1H); 3.9 (s, 2H); 2.7 (s, 2H); 2.1 (q, 2H); 1.8 (m, 2H); 1.5 (m, 2H)

مثال رقم ١٥: (6,6-diphenyl-hex-5-enyl)-(3-trifluoromethoxybenzyl)amine hydrochloride (المركب ١٥). نقطة الانصهار: ٩٦,٦-٩٨,٥ م.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 7.4-7.0 (m, 13H); 6.1 (t,1H); 3.8 (s, 2H); 2.6 (t, 2H), 2.2 (q, 2H); 1.6 (m, 4H)

مثال رقم ١٦: Benzyl-(5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-methyl-amine hydrochloride (المركب ١٦).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 12.5 (s, 1H); 7.0-7.6 (m, 15H); 5.9 (t, 1H); 4.1 (s, 2H); 2.9-2.6 (m, 2H); 2.6 (s, 3H); 2.2-1.8 (m, 4H)

مثال رقم ١٧: (5,5-Diphenyl-pent-4-enyl)-(1-phenyl-ethyl)-amine hydrochloride (المركب ١٧).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 10.1 (bs 1H); 9.8 (bs, 1H); 7.6-7.0 (m, 15 H); 5.9 (t, 1H);

4.16 (t, 1H); 2.6 (bs, 2H); 2.0 (m, 4H); 1.9 (d, 3H)

مثال رقم ١٨: Benzhydryl-(5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-amine hydrochloride (المركب ١٨).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 10.3 (bs, 2H); 7.6-7.0 (m, 20H); 5.8 (t, 1H); 5.1 (bs,1H); 2.5 (bs 2H); 1.9-1.7 (m, 4H)

مثال رقم ١٩: (5,5-Diphenyl-pent-4-enyl)-(2-fluorobenzyl)amine hydrochloride (المركب ١٩).

^{1}H- NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 10.0 (s, 2H); 7.4-6.9 (m, 15H); 6.0 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.7 (m, 2H); 2.2-2.0 (m, 4H)

مثال رقم ٢٠: (4-Chlorobenzyl)-(5,5-diphenyl-pent-4-enyl)amine hydrochloride (المركب ٢٠).

^{1}H- NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 1.7 (m, 2H); 2.2 (m,.2H); 2.7 (m, 2H); 4.0 (s, 2H); 6.1 (t, .1H); 7.5-7.0 (m, 14H); 10.0 (bs, 2H)

مثال رقم ٢١: 4-[(5,5-Diphenyl-pent-4-enylamino)-methyl]benzonitrile hydrochloride

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 10.2 (s, 2H); 7.8-7.6 (m,4H); 7.4-7.0 (m, 10H); 5.9 (t, 1H); 4.1 (s, 2H); 2.7 (m, 2H); 2.2 (m, 2H); 2.0 (m,2H)

مثال رقم ٢٢: (4,4-Diphenyl-but-3-enyl)-(4-trifluoromethylbenzyl)amine hydrochloride

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 11.0 (bs, 2H); 7.6 (m, 4H); 7.4-7.2 (m, 8H); 7.1(m, 2H); 6.1 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.9 (t, 2H); 2.6 (m, 2H)

مثال رقم ٢٣: (4,4-Diphenyl-but-3-enyl)-(4-fluor-benzyl-amine hydrochloride

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 10.0 (s, 2H); 7.6-7.4 (m, 10H); 7.0-6.8 (m, 4H); 6.1 (t, 1H); 3.9 (m, 2H); 2.8 (m, 2H); 2.5 (m,2H)

مثال رقم ٢٤: Benzyl-(4,4-diphenyl-but-3-enyl)amine hydrochloride

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 10.0 (bs, 2H); 7.5-7.2 (m, 13H); 7.0 (m, 2H); 6.1 (t, 1H); 3.9 (s 2H); 2.9 (m,2H); 2.6 (m, 2H)

مثال رقم ٢٥:

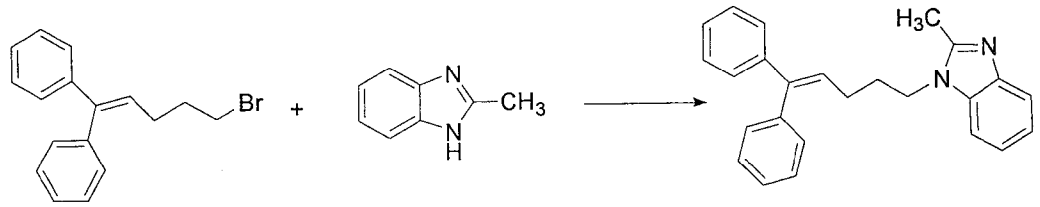
(4,4-Diphenyl-but-3-enyl)-(3-trifluoromethoxylbenzyl)amine hydrochloride

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, δ (ppm): 10.2 (bs, 2H); 7.8 (d, 1H); 7.6 (m, 2H); 7.5 (m, 1H); 7.7-7.4 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.9 (m, 2H); 2.6 (m, 2H)

مثال رقم ٢٦: (4,4-Diphenyl-but-3-enyl)-(3-fluorobenzyl)amine hydrochloride

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 10.0 (bs, 2H); 7.4-7.7 (m, 14H); 6,1 (t, 1H); 4.0 (s, 2H); 2.9 (m, 2H); 2.6 (m, 2H)

مثال رقم ٢٧: تصنيع (1-(5,5-Diphenyl-pent-4-enyl)-2-methyl-1H-benzoimidazole (المركب ٢٧).



[A]

تمت إضافة sodium hydride (٠,٢٤ جم، ٦٠٪ في زيت مشتت، ٦,٠ ملي مول) ببطء على أجزاء على محلول مبرد مسبقاً (ثلج/ حمام ماء مبرد) من 2-methyl-benzimidazole (٠,٦٦ جم، ٥,٠ ملي مول) في ٢٠ مل من DMF لا مائي. بعد ساعتين، تمت إضافة 5-bromo-1,1-bisphenylpentene (١,٥ جم، ٥,٠ ملي مول) على أجزاء، وتم تقليب الخليط الناتج لمدة ٢٠ ساعة. تم إخماد التفاعل بإضافة ميثانول (٣ مل)، حتى وقف تحول الغاز. تم تخفيفه باستخدام ماء (١٢٠ مل) واستخلاصه بواسطة ethyl acetate (٣ × ٢٥ مل). تم غسل ناتج الاستخلاص العضوي باستخدام محلول ملحي (١ × ٢٠ مل)، تجفيفه فوق كبريتات صوديوم لا مائية over anhydrous sodium sulphate وتم التخلص من المذيب تحت ضغط منخفض، للحصول على الباقي (١,٩ جم)، الذي تمت تنقيته بواسطة كروماتوجراف ومضي (DCM/ MeOH ٩٨: ٢) للحصول على ١,٥ جم (حصيلة ٤,٢ ملي مول، ٦٠٪) في صورة مادة صلبة صفراء.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.7 (m, 1H); 7.4-7.0 (m, 13H); 6.0 (t, 1H); 4.0 (t, 2H); 2.5 (s, 3H); 2.3 (q, 2H); 1.9 (m, 2H)

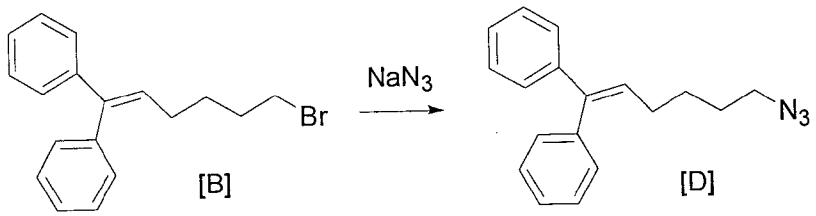
تم تحضير المركبات التالية بطريقة مشابهة:

مثال رقم ٢٨: 1-(5,5-Diphenyl-pent-4-enyl)-1*H*-imidazole (المركب ٢٨).

^{11}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.5-7.2 (m, 11H); 7.0 (s, 1H); 6.8 (s, 1H); 6.1(t, 1H); 3.9 (t, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.9 (m, 2H)

مثال رقم ٢٩: تصنيع (2-Chloro-9*H*-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)-amine (المركب ٢٩)

خطوة ١. تصنيع 6-azide-1,1-diphenyl-1-hexene Intermediate المركب الوسيط [D]



تم تقليب خليط من 6-bromo-1,1-diphenyl-1-hexene (٥٠,٠ جم، ١٥٨ ملي مول) و sodium azide (٣١,٠ جم، ٤٧٦ ملي مول) DMF (٢٥٠ مل) عند درجة حرارة الجو لمدة ١٦ ساعة. تم تخفيف خليط التفاعل باستخدام ethyl acetate (٤٠٠ مل) وغسله باستخدام محلول مائي مشبع من NH_4Cl (٣ × ١٠٠ مل). تم غسل ناتج الاستخلاص العضوي باستخدام محلول ملحي (١ × ٦٠ مل)، تجفيفه فوق كبريتات صوديوم لا مائية over anhydrous sodium sulphate وتمت إزالة المذيب عند ضغط منخفض، للحصول على ٤١ جم (١٤٨ ملي مول، ٩٦,٦٨٪) من زيت عديم اللون، محددة في صورة 6-azide-1,1-diphenyl-1-hexene.

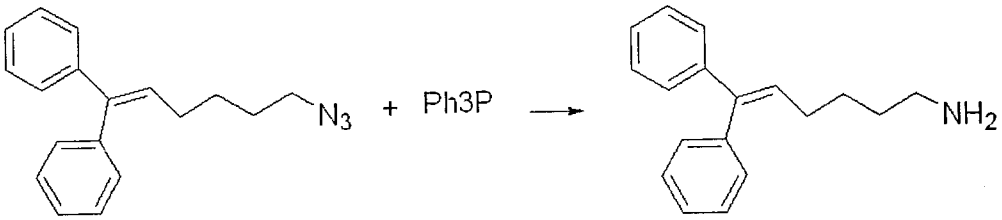
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.4-7.1 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 3.2 (t, 2H); 2.1 (m, 2H); 1.5 (m, 4H)

تم تحضير المركب الوسيط التالي عن طريق تفاعل المركب الوسيط [A] (انظر مثال رقم ٢٧) باستخدام sodium azide بطريقة مشابهة:

المركب الوسيط [E] 5-azide-1,1-diphenyl-1-pentene

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.4-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 3.3 (t, 2H); 2.1 (m, 2H); 1.6 (m, 2H)

خطوة ٢. تصنيع 6,6-Diphenyl-hex-5-enylamine. المركب الوسيط [F]



[D] [F]

تم تقليب خليط من 6-azide-1,1-diphenyl-1-hexene (٢,٧ جم، ٩,٧ ملي مول) و triphenylphosphine (٣,١ جم، ١٢ ملي مول) في THF (٥٠ مل) وماء (٢,٥ مل)، عند درجة حرارة الجو لمدة ٢٠ ساعة. تمت إزالة المذيب تحت ضغط منخفض للحصول على زيت، حيث تمت تنقيته بواسطة كروماتوجراف ومضي (DCM/MeOH/Et_3N ٩٥: ٥: ٥) للحصول على 6,6-diphenyl-hex-5-enylamine في صورة زيت أصفر (حصيلة ٢,٤ جم، ٩٨٪)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 1.4 (m, 4H); 7.3 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 2.6 (m, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.6 (s, 2H)

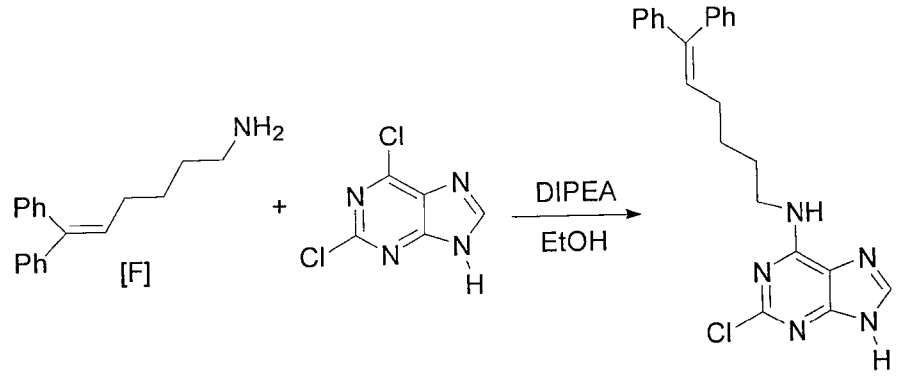
تم تحضير المركب الوسيط التالي بطريقة مشابهة:

المركب الوسيط [G] 5,5-Diphenyl-pent-4-enylamine

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.4-7.2 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 2.7 (t, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.9 (s,

2H); 1.6 (m,2H)

خطوة ٣. (2-Chloro-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)-amine



إلى محلول من 6,6-diphenyl-hex-5-enylamine (٢٥,٦ جم، ١٠٣ ملي مول) في ethanol (٥٠٠ مل)، تمت إضافة بورين (١٧,٠ جم، ٩٠ ملي مول) وDIPEA (١٥,٧ مل، ٩٠ ملي مول). تم تسخين الخليط الناتج إلى الإرجاع لمدة ٣ ساعات. بمجرد انقضاء تلك الفترة، تمت إزالة المذيب عند ضغط منخفض، تمت إضافة ماء (١٥٠ مل) وتم ترشيح الراسب وغسله باستخدام ميثانول للحصول على (2-Chloro-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)-amine (٣١,٧٦g، (٧٨,٦ ملي مول، ٨٧,٣٪ حصيلة) في صورة مادة صلبة بيضاء (نقطة الانصهار: ٢٠٥,٧-٢٠٧,٠°م).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 8.1 (s, 2H); 7.5-7.0 (m, 10H); 6.1 (t,1H); 2.5 (m, 2H); 2.1 (m, 2H); 1.7-1.4 (m, 4H)

تم تحضير المركبات التالية بطريقة مشابهة، عن طريق تفاعل 6,6-diphenyl-hex-5-enylamine باستخدام المشتقات التجارية المقابلة من 6-chloropurine أو مشتقات 4-chloro-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine. تم تحضير المركبات غير التجارية بواسطة طرق معروفة بالفن مثل تلك الموصوفة في :

US6936713; Eur. J. Med. Chem, 2003, 38, 199-214; WO2005/009348; Synthesis, 1994, 1401; J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 784-790; J. Med. Chem. 2005, 6887; J. Med. Chem. .2006, 1549; and/or Eur. J. Med. Chem, 2004, 939

مثال رقم ٣٠: ملح :

٥ (9-Benzyl-2-iodo-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)amine hydrochloric (المركب ٣٠).

تم التفاعل باستخدام 6-chloro-2-iodo-9H-purine للحصول على المركب المذكور بالعنوان.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.5 (s, 1H); 7.4-7.0 (m, 15H); 6.1 (t, 1H); 5.7 (s,1H); 5.3 (s, 2H); 3.6 (s, 2H); 2.1 (q, 2H); 1.6 (m, 5H)

١٠ مثال رقم ٣١: 9-Benzyl-N-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)-9H-purine-2,6-diamine (المركب ٣١)

تم التفاعل باستخدام 9-benzyl-6-chloro-9H-purin-2-ylamine للحصول على المركب المذكور بالعنوان.

١٥ ^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7,4-7.1 (m, 15H), 6.1 (t, 1H), 5.5 (m, 1H, NH); 5.2 (s, 2H); 4.7 (s, 2H, NH_2); 3.5 (m, 2H); 2.2 (m, 2H); 1.6 (m, 4H)

مثال رقم ٣٢: (6,6-Diphenyl-hex-5-enyl)-(2-phenyl-9H-purin-6-yl)amine (المركب ٣٢)

تم التفاعل باستخدام 6-chloro-2-phenyl-9H-purine للحصول على المركب المذكور بالعنوان.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$+ DMSO-d_6), δ(ppm): 8.2 (m, 2H); 7.7 (s, 1H); 7.4-7.0 (m, 14H); 6.9 (bs, 1H); 6.0 (t, 1H); 3.6 (m, 2H); 2.1 (q, 2H); 1.8- 1.4 (m, 4H)

مثال رقم ٣٣:

(6,6-Diphenyl-hex-5-enyl)-(9-methyl-2-trifluoromethyl-9H-purin-6-yl)amine

(المركب ٣٣)

تم التفاعل باستخدام 6-chloro-9-methyl-2-trifluoromethyl-9H-purine للحصول على المركب المذكور بالعنوان.

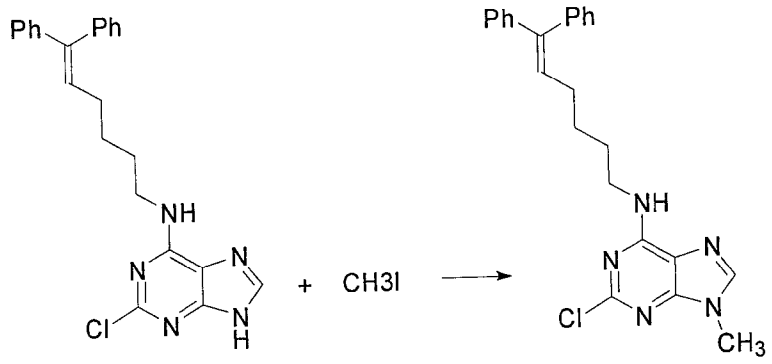
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.8 (s,1H); 7.4-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 5.8 (bs, 1H); 3.9 (s, 3H); 3.6 (bs, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.8-1.5 (m, 4H)

مثال رقم ٣٤: (5,5-Diphenyl-pent-4-enyl)-(9-methyl-9H-purin-6-yl)amine (المركب ٣٤)

تم التفاعل باستخدام 6-chloro-9-methyl-9H-purine للحصول على المركب المذكور بالعنوان.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 8.4 (s, 1H); 7.7 (s, 1H); 7.4-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 5.7 (s, 1H, NH); 3.9 (s, 3H); 3.6 (m, 2H); 2.3 (q, 2H); 1.9 (m, 2H)

مثال رقم ٣٥ : تصنيع (2-Chloro-9-methyl-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)amine(المركب ٣٥)



إلى محلول من (2-chloro-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)-amine (٢,٠ جم، ٥,٠ ملي مول) في DMF (٥٠ مل)، potassium carbonate (١,٤ جم، ١٠ ملي مول) تمت إضافة، وتمت معالجة المعلق الناتج باستخدام methyl iodide (٠,٥ مل، ٧,٩٢ ملي مول). تم تقليب خليط التفاعل عند درجة حرارة الجو لمدة ٧٢ ساعة. تمت إضافة ماء (٢٥٠ مل) واستخلاص الخليط الناتج بواسطة ethyl acetate (٣ × ٥٠ مل). تم غسل ناتج الاستخلاص العضوي باستخدام محلول ملحي (١ × ٢٥ مل)، وتجفيفه فوق كبريتات صوديوم لا مائية over anhydrous sodium sulphate وتمت إزالة المذيب عند ضغط منخفض، للحصول على مادة متبقية صلبة (٢,٣٠ جم)، حيث تمت تنقيتها بواسطة كروماتوجراف ومضي (heptane/EtOAc ٦٠ : ٣٠) للحصول على :

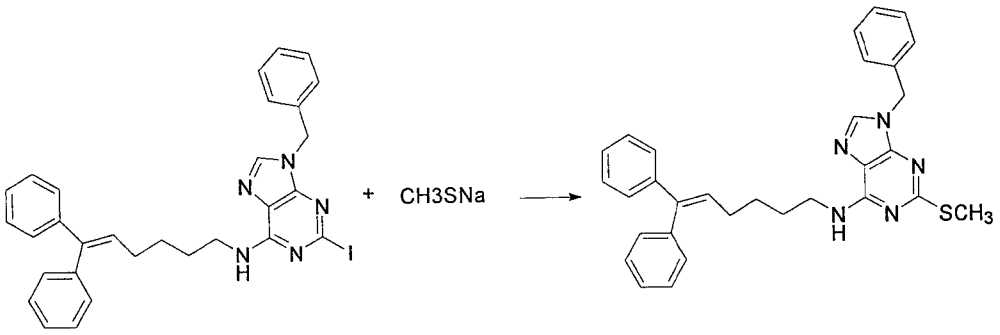
2-chloro-9-methyl-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)amine (حصيلة ١,٤٥ جم، ٧٠ ٪) في صورة مادة صلبة بيضاء

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.7 (s, 1H); 7.4-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 5.9 (bs,1H); 3.8 (s, 3H); 3.6 (bs, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.7-1.5 (2q, 4H)

مثال رقم ٣٦ : تصنيع :

(9-Benzyl-2-methylsulfanyl-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)amine (المركب

(٣٦



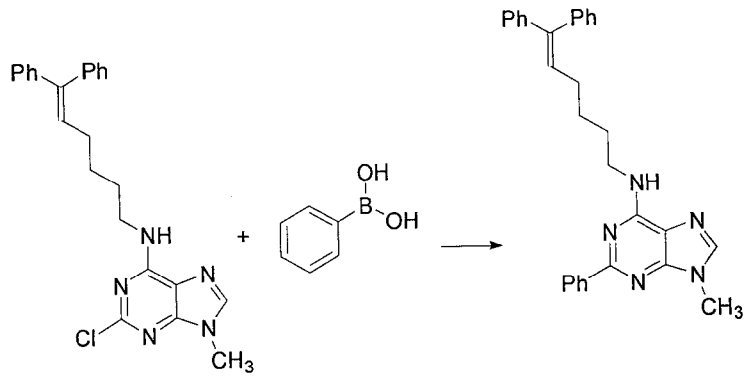
في ٢٥٠ مل مفاعل ضغط مرتفع، تمت معالجة محلول من :

(9-benzyl-2-iodo-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)-amine (المركب ٣٠) (٢,٤ جم، ٤,١ ملي مول في خليط من ethanol (٣٠ مل) وماء (٣٠ مل)، باستخدام sodium thiomethoxide (١,٤ جم، ٢٠,٥ ملي مول). تم اغلاق وعاء المفاعل وتسخين الخليط عند ١٣٠° م لمدة ٦ ساعات. (الحد الاقصى من الضغط الداخلي: ٢ بار.) بمجرد انقضاء هذه الفترة الزمنية، تمت إزالة المذيب عند ضغط منخفض، تمت إضافة ماء (١٢٠ مل) واستخلاص الخليط الناتج بواسطة ethyl acetate (٣ × ٥٠ مل). تم تجفيف الطبقة العضوية فوق كبريتات صوديوم لا مائية over anhydrous sodium sulphate وتبخير المذيب في وسط مفرغ للحصول على الباقي، الذي تمت تنقيته بواسطة كروماتوجراف ومضي (heptane /EtOAc ١ : ١) للحصول على (9-benzyl-2-methylsulfanyl-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)amine (١,٦٨ جم، ٣,٣ ملي مول، ٨١٪) في صورة مادة صلبة صفراء.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.55 (s, 1H); 7.45-7.12 (m, 15H); 6.07 (1H, t); 5.65 (bs, 1H); 5.29 (s, 2H); 3.58 (bs, 2H); 2.55 (s, 3H); 2.16 (q, 2H); 1.79-1.51 (m, 4H)

مثال رقم ٣٧: (6,6-Diphenyl-hex-5-enyl)-(9-methyl-2-phenyl-9H-purin-6-yl)amine

(المركب ٣٧)



تم تقليب معلق من 2-chloro-9-methyl-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)amine (٣,٠ جم، ٧,٠ ملي مول)، sodium carbonate (١,٣ جم، ١٢,٢٨ ملي مول)، حمض phenyl boronic acids (١,٠٥ جم، ٨,٦ ملي مول) و tetrakis(triphenylphosphine palladium (0) (١,٢١ جم، ١,٠٥ ملي مول، ١٥ ٪ مول) في DME (٥٠ مل) عند ١٠٠ م لمدة ٤٠ ساعة تحت argon .

بمجرد انقضاء هذه الفترة الزمنية، تمت إزالة المذيب عند ضغط منخفض وإضافة ماء (٣٤ مل). تم تقليب الخليط الناتج لمدة ١٠ دقائق. تم ترشيح الراسب وغسله باستخدام ماء (٢ x ٢٠ مل) وإيثر (٢ x ٢٠ مل). تم تجفيف المادة التي تم الحصول عليها تحت التفريغ لتنتج :

2-chloro-9-methyl-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)amine (حصيلة ٢,٦ جم، ٥,٧ ملي مول، ٨١ ٪) في صورة مادة صلبة صفراء.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 8.5 (d, 2H); 7.7 (s, 1H); 7.5-7.1 (m, 13H); 6.1 (t, 1H); 5.7 (m, 1H, NH); 3.9 (s, 3H); 3.7 (m, 2H); 2.3 (q, 2H); 1.8 (m, 2H); 1,6 (q, 2H)

تم تحضير المركبات التالية بطريقة مشابهة، عن طريق تفاعل :

2-chloro-9-methyl-9H-purin-6-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)amine باستخدام :

مشتقات حمض aryl الغير متجانسة boronic acids المناظرة:

مثال رقم ٣٨: (6,6-Diphenyl-hex-5-enyl)-(9-methyl-2-thiophen-2-yl-9H-purin-6-yl)amine

(المركب ٣٨)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ(ppm): 7.7-7.5 (m, 2H); 7.5-7.0 (m, 11H); 6.1 (t, 1H); 5.4 (bs, 1H); 3.7 (s, 3H); 3.6 (bs, 2H); 2.1(q, 2H); 1.8-1.5 (2q, 4H)

مثال رقم ٣٩: (6,6-Diphenyl-hex-5-enyl)-(9-methyl-2-pyridin-4-yl-9H-purin-6-yl)amine

(المركب ٣٩)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, δ(ppm): 8.7 (d, 2H); 8.3 (d, 2H); 7.7 (s, 1H); 7.3-7.0 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 5,5 (bs, 1H); 3.9 (s, 3H); 3.7 (bs, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.8-1.5 (2q, 4H)

مثال رقم ٤٠: (6,6-Diphenyl-hex-5-enyl)-(1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)amine

(المركب ٤٠)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, DMSO-d_6), δ (ppm): 12.81 (bs, 1H); 8.22 (s, 1H); 7.92 (s, 1H); 7.02-7.26 (m, 10H); 6.80 (bs, 1H); 5.95 (t, 1H); 3.41-3.45 (m, 2H); 2.45-2.58 (m, 2H); 2.03-2.10 (m, 2H); 1.42-1.62 (m, 4H)

مثال رقم ٤١: (5,5-Diphenyl-pent-4-enyl)-(1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)amine

(المركب ٤١)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ (ppm): 13.35 (bs, 1H); 8.11 (bs, 1H); 8.04 (s, 1H); 7.05-7.33 (m, 10H); 6.16 (t, 1H); 3.42-3.49 (m, 2H); 2.08-2.15 (m, 2H); 1.72-1.77 (m, 2H);

تم تحضير المركبات التالية بطريقة مشابهة للمركب ٣٥، عن طريق تفاعل المركب ٤١ باستخدام مشتقات benzyl halides المناظرة.

مثال رقم ٤٢: ملح :

(6,6-Diphenyl-hex-5-enyl)-(1-methyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)amine hydrochloric

(المركب ٤٢)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 8.35 (bs, 1H); 7.83 (s, 1H);. 7.14-7.39 (m, 10H); 6.07 (t, 1H); 4.04 (s, 3H); 3.5-3.6 (m, 2H); 2.19 (q, 2H); 1.67-1.75 (m, 2H); 1.56-1.63 (m, 2H).

مثال رقم ٤٣: ملح :

(1-Benzyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)-(6,6-diphenyl-hex-5-enyl)amine hydrochloric

(المركب ٤٣)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$), δ (ppm): 8.4 (bs, 1H); 7.9 (s, 1H); 7.4-7.2 (m, 16H); 6.1 (t, 1H); 5.6 (s, 2H); 3.6-3.5 (m, 2H); 2.2 (q, 2H); 1.9-1.8 (m, 2H); 1.6-1.5 (m, 2H)

مثال رقم ٤٤: ملح :

(6,6-Diphenyl-hex-5-enyl)-(1-isopropyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)amine hydrochloric

(المركب ٤٤)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ (ppm): 11.0 (bs, 1H); 8.8 (s, 1H); 8.4 (s, 1H); 7.3-7.1 (m, 10H); 6.1 (t, 1H); 5.0 (hept, 1H); 3.7-3.4 (m, 2H); 2.1-1.9 (m, 2H); 1.7-1.6 (m, 2H); 1.6-1.40 (m, 2H); 1.39 (d, 6H)

التجارب الحيوية

توليد ناقلات العدوى.

تشتمل جميع ناقلات العدوى transfectants على قاعد خلوية مشتركة خالية من تلك المستقبلات الرئيسية للمسارات الخاضعة للدراسة. تم استخدام إنزيم phosphatase sPase المفرز كمرسل نظراً لقدرته على معالجة الركائز المتألقة أو اللونية من الاستنبات القائمة في تحلل الركائز بالماء والمشابهة كيميائياً nitrophenol phosphate . تم تطوير خمس عمليات توليد لناقلات العدوى وفقاً للموصوف فيما يلي:

١. IL-4R. تم نقل العدوى إلى سلاسل من النوع II IL-4r، والتي تكون شائعة ضمن الخلايا غير

المكونة للدم، فضلاً عن STAT6 والذي يكون عبارة عن الجزيء الرئيسي في مسار إرسالة إشارة نووية بواسطة IL-4r، وأخيراً تم تقديم جين مرسل لقياس الاستجابة إلى STAT6. على نحو باطني النمو، اشتملت الخلايا على Janus Associated Kinase 1 (JAK1) والذي كان معروف باقترانه من ذي قبل بـ STAT6 عن طريق p62/aPKC.

٢. IL-6R. تم نقل العدوى لسلاسل Chains of IL-6R وتم تقديم جين مرسل يتمكن من قياس الاستجابة إلى STAT3. وفقاً لما هو معروف جيداً، يكون STAT3 هو جزيء تنبيغ وعامل نووي تم إنتاجه فسيولوجياً في الاستجابات القياسية IL-6/IL-6R.

٣. TNF-R. في هذه الحالة، تم تقديم جين مرسل يتمكن من قياس الاستجابة إلى NF-kB، لأن هذا هو جزيء تنبيغ وعامل نووي تم إنتاجه فسيولوجياً استجابة لـ TNF-ألفا. لم تستجب ناقلات العدوى TNF-ألفا إلى المنشطات الفاعلة لـ NFkB مثل LPS.

٤. معقد LPS-مستقبل تم التعبير عنه بواسطة TLR4/MD2/CD14. تم استخدام جينات مرسلة مع عوامل الاستجابة إلى NFkB كما في الحالة السابقة، ولكن تحققت الانتقائية بواسطة النقل المشترك للعدوى إلى مكونات معقد LPS-R.

تم التقاط LPS من المصل من خلال الاتحاد ببروتين بلازما واحد معروف باسم LBP، والذي ينقل LPS إلى بروتين الغشاء CD14. يفسر تضمين LBP الزيادة ١٠٠٠ ضعف في الحساسية مقابل الوسط أو المستنبتات الخالية من LBP. الجزيء CD14 ليس LPS-مستقبل ولكنه جزيء لمعقد المستقبل الذي يلتقط LBP، ويسمح بنقل LPS في السطح الخلوي إلى MD2. لا يشتمل CD14 على ذيل cytoplasmic ولا يتمكن من التحول إلى محول طاقة إشارة ولكنه يعمل بدرجة كبيرة على زيادة حساسية النظام.

بطريقة مشابهة، MD2 ليس محول طاقة إشارة ولكن تسمح توليفة CD14 و MD2 بزيادة الحساسية ١٠٠٠٠ ضعف.

٥. IL-1R. تم استخدام جينات مرسلة مع عوامل الاستجابة إلى NFkB كما في الحالة السابقة،

ولكن الانتقائية تحققت بواسطة التعبير عن المكونات التي تنتمي إلى معقد المستقبل IL-1R. ينتمي IL-1R إلى فصيلة المستقبلات التي تستخدم مجالات تنبيغ TIR (شبيه IL-1R Toll). من المعروف أن مسار IL-1R ينشط إنزيم kinases بروتين منشط mitogen (MAPK) من النوع JNK والذي يعمل بدوره على تكوين عوامل نووية نشطة محورة وراثياً مثل AP-1. يشتمل الجين المرسل على مواقع NFkB و AP-1 المسلسلة كي يمكن محاكاة الحالة الفسيولوجية. ٥

المركب	النتائج
المركب ٢٨	تثبيط TNFr ٢٥٪ تثبيط IL6r هبوط - منخفض (*) تثبيط 75 IL4r٪
المركب ٢٧	تثبيط TNFr إجمالي تثبيط IL6r منخفض-٧٥٪ تثبيط IL4r إجمالي
المركب ١٣	تثبيط TNFr إجمالي تثبيط IL6r إجمالي تثبيط IL4r إجمالي
المركب ١١	تثبيط TNFr إجمالي تثبيط IL6r إجمالي تثبيط IL4r إجمالي
المركب ١٠	تثبيط TNFr ارتفاع ٣٠٪ تثبيط IL6r هبوط ٥٪ تثبيط IL4r إجمالي
المركب ٨	تثبيط TNFr إجمالي تثبيط IL6r إجمالي تثبيط IL4r إجمالي
المركب ٦	تثبيط TNFr إجمالي تثبيط IL6r إجمالي تثبيط IL4r إجمالي

وجود الزيفان الداخلي في الدم في الفئران: نشاط المركب ١١ والمركب ٨ على مستويات مصل الدم

لـ TNF-α.

المادة والطرق: تم استخدام فئران CD1 ذكور، تزن بين ٣٠ و٣٥ جم وتم الاحتفاظ بها تحت ظروف قياسية خاضعة للتحكم. صامت هذه الحيوانات (لمدة ١٤-١٦ ساعة؛ ١٢ لكل مجموعة؛ ٦ لكل قفص ≅ ٥٠٠ سم^{٢})، باستخدام محلول مغذي مصنوع من saccharose (٨ ٪) وNaCl (٠,٢ ٪)، حسب الرغبة. تم إعطاء علاجات الاختبار عن طريق الفم في معلقات (مادة ناقلة vehicle : Tween 80 ٠,١ ٪ – NaCl ٠,٩ ٪)، في نسبة وزنية ١٠ مل/كجم. بعد مرور ساعة، تم تحفيز وجود الزيفان الداخلي في الدم في الفئران بواسطة الحقن في الغشاء البريتوني لعديد السكاريد الدهني من Escherichia coli نوع مصلي B5:٠٥٥ (Sigma L-2880)، عند جرعة ١ مجم/كجم وفي نسبة وزنية ١٠ مل/كجم، مذاب في محلول ملحي معقم. بعد تسعين دقيقة من حقن LPS (في الغشاء البريتوني)، تحت التخدير isoflurane ، تم استخلاص ٠,٥-٠,٨ مل من الدم بواسطة قطع في القلب؛ تم طرد عينة الدم مركزياً (٦٠٠٠ لفة في الدقيقة؛ ١٠ دقيقة؛ ٤ درجة مئوية) والحصول على عينتين من المصل والاحتفاظ بها مجمدة عند -٧٠درجة مئوية حتى تم تركيزات TNF-α في المصل (EIA: فأر TNF/TNFSF1A Quantikine من نظم R&D).

أظهرت المركبات ١١ و٨، المعطاة عن طريق الفم عند جرعات ١٠٠ مجم/كجم/١٠ مل، نشاط في هذا النموذج التجريبي من LPS (في الغشاء البريتوني) من E.coli لتحفيز وجود الزيفان الداخلي في الدم في الفئران؛ انخفضت ٣٥,٤٢٪ و٣٧,٧٪ على التوالي، بطريقة ملحوظة إحصائياً، مستويات مصل الدم من TNF-α، في إطار الصلة بمجموعة مادة ناقلة vehicle .

مستويات مصل الدم لـ IL6 في الفئران المعالجة باستخدام هرمون الغدة الدرقية. نشاط المركب ١٥.

المادة والطرق: تم استخدام فئران CD1 ذكور، بين ٥ و٧ أسبوع وتم الاحتفاظ بها تحت الظروف القياسية الخاضعة للتحكم. صامت هذه الحيواناتا (لمدة ١٤-١٦ ساعة؛ ١٢ لكل مجموعة؛ ٦ لكل قفص ≅ ١١٠٠ سم^{٢})، باستخدام طعام صلب وسائل حسب الرغبة.

خلال ٥ أيام، تمت معالجة الحيوانات باستخدام ٨ جرعات في الغشاء البريتوني لـ pTH-rp (١-٣٤، بشر) ١٥ ميكرو جرام/٠,١ مل/حقن.

تم إعطاء علاجات الاختبار عن طريق الفم في معلقات (مادة ناقلة vehicle : Tween 80 0.1٪ - NaCl ٠,٩ ٪)، في نسبة وزنية ١٠ مل/كجم بعد مرور ساعة من حقن pTH.

بعد ساعتين من آخر إعطاء pTH وتحت التخدير isoflurane ، تم استخلاص ٠,٥-٠,٨ مل من الدم بواسطة قطع في القلب؛ تم طرد عينة الدم مركزياً (٦٠٠٠ لفة في الدقيقة؛ ١٠ دقيقة؛ ٤ درجة مئوية) وتم الحصول على عينتين من المصل والاحتفاظ بهما مجمدتين عند -٧٠درجة مئوية حتى قياس تركيزات المصل IL6 (EIA: رقم مرجعي ٥٥٥٢٤٠. BD Bioscience).

أظهرت المركبات ١٥، المعطاة عن طريق الفم عند جرعات ٢٥ مجم/كجم/١٠ مل، نشاط في هذا النموذج التجريبي؛ وأدت إلى خفض ٦٤,٥٨٪، بطريقة ملحوظة إحصائياً، مستويات مصل الدم لـ IL6، فيما يتعلق بمجموعة مادة ناقلة vehicle .

النشاط المضاد للورم antitumoral activity .

سلالة الخلية NCI PANNEL (فحص أولي)

تم الحصول على سلالات الخلية المميزة من البشر المستخدمة في هذه الدراسة من American Type Culture Collection، وتم استنباتها في وسط RPMI-1640 يحتوي على ١٠٪ (حجم/حجم) مصل بقري جنيني منشط بالحرارة، ٢ ملي مولار L-GLUTAMINE ، ١٠٠ وحدة / مل penicillin ، و١٠٠ ميكرو جرام / مل streptomycin عند ٣٧ درجة مئوية في هواء رطب ٩٥٪ و٥٪ CO_2.

تم استنبات كميات ملحوظة من سلالات الخلية من البشر النامية أُسياً في ٩٦ طبق عيار دقيق مسطح القاعدة بحجم نهائي يبلغ ١٠٠ ميكرو لتر، والحضانة عند ٣٧ درجة مئوية في مناخ رطب من ٥٪ CO_2/٩٥٪ لمدة ٢٤ ساعة لترك الخلايا تلتصق بالأطباق. بعد ذلك، تمت حضانة الخلايا باستخدام تركيزات مختلفة من المركب الخاضع للتجربة عند ٣٧ درجة مئوية تحت مناخ هواء ٥٪ CO_2/٩٥٪ لمدة ٧٢ ساعة. تم تحديد كمية تكاثر الخلية باستخدام :

XTT (3'-[1-(phenylamino)carbonyl]-3,4-tetrazolium-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid sodium salt hydrate)

طقم تكاثر الخلية (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) طبقاً لتعليمات المُصنع. بإيجاز، تمت إضافة محلول خليط محضر جديد (٥٠ ميكرو لتر) من مادة متفاعلة مرمزة XTT ومادة متفاعلة لإقران إلكترون (N-methyldibenzopyrazine methyl sulfate) PMS إلى كل عين. تمت حضانة الخلائط الناتجة علاوة على ذلك لمدة ٤ ساعة في مناخ رطب (٣٧ درجة مئوية، ٥٪ CO2)، وتم قياس امتصاص منتج formazan المتولد باستخدام قارئة طبق عيار دقيق عند طول موجي للاختبار يبلغ ٤٩٠ نانو مولار وطول موجي مرجعي يبلغ ٦٥٥ نانو مولار. بعد ذلك تم حساب IC_{50} (٥٠٪ تركيز مثبط) على هيئة تركيز العقار المسبب لـ ٥٠٪ تثبيط تكاثر الخلية. يتم عرض البيانات على هيئة متوسط القيم (± S.D.) لأربع تجارب مستقلة تم إجراء كل

منها من ثلاث نسخ. يوضح جدول ١ بعض تركيزات IC_{50} للمركبات الخاضعة للاختبار الفحص في كل من ٣ و ٦٠ لوح سلاسلة خلية.

جدول ١. IC50 (ميكرو مولار) في فحص سلالات الخلية

سلالة الخلية	نسيج	IC50 (مولار)	
		المركب3	المركب6
BT-549	الثدي	١,٦ ± ٠,٠١ E-05	٢,١ ± ٠,١٦ E-05
HS 578T	الثدي	١,١ ± ٠,٠٨ E-05	١,٥ ± ٠,١٢ E-05
MCF-7	الثدي	١,٣ ± ٠,٠٨ E-05	٢,١ ± ٠,٥٨ E-05
MDA-MB-231	الثدي	١,٣ ± ٠,١١ E-05	٢,١ ± ٠,٠٩ E-05
MDA-MB-435	الثدي	١,٥ ± ٠,٤١ E-05	٥,٨ ± ٠,٦٣ E-06
MDA-MB-468	الثدي	٨,٧ ± ٠,٠١ E-06	١,٤ ± ٠,٠٤ E-05
NCI/ADR-RES	الثدي	١,٤ ± ٠,٠٨ E-05	١,٩ ± ٠,٠٥ E-05
SK-BR-3	الثدي	١,٢ ± ٠,٢٥ E-05	١,٣ ± ٠,١١ E-05
T-47D	الثدي	١,١ ± ٠,٢٩ E-05	١,٤ ± ٠,٠٨ E-05
SF-268	CNS	٨,٩ ± ٠,٤٢ E-06	٢,٩ ± ٠,٢٧ E-05
SF-295	CNS	٨,١ ± ٠,١٥ E-06	١,٥ ± ٠,٢٥ E-05
SF-539	CNS	٦,٦ ± ٠,٣٢ E-06	١,٣ ± ٠,١٨ E-05
SNB-19	CNS	١,٥ ± ٠,٠٥ E-05	١,٥ ± ٠,٠١ E-05
SNB-75	CNS	١,٥ ± ٠,٠٨ E-05	١,٥ ± ٠,٠٥ E-05
U251	CNS	١,٦ ± ٠,٠١ E-05	١,٦ ± ٠,٠١ E-05
COLO-205	القولون	١,٣ ± ٠,١١ E-05	١,٤ ± ٠,٠٥ E-05
HCT-15	القولون	٤,٨ ± ٢,١٠ E-06	١,٣ ± ٠,١١ E-05
HCT-116	القولون	٦,٠ ± ١,١٠ E-06	٨,١ ± ١,٦٠ E-06
HT-29	القولون	١,٥ ± ٠,١٢ E-05	٢,٧ ± ٠,٥٢ E-05
KM12	القولون	١,٦ ± ٠,٠٥ E-05	١,٥ ± ٠,٠٤ E-05
SW-620	القولون	٨,٨ ± ٠,٧٤ E-06	١,٣ ± ٠,٢١ E-05

CCRF-CEM	سرطان الدم	٦,١ ± ٠,٠٤ E-06	١,٨ ± ١,١ E-05
HL-60	سرطان الدم	١,٢ ± ٠,٠٥ E-05	١,٤ ± ٠,٢٨ E-05
K-562	سرطان الدم	٤,٦ ± ١,٦٠ E-06	١,٤ ± ٠,٢٤ E-05
MOLT-4	سرطان الدم	١,٥ ± ٠,٠٧ E-05	١,٧ ± ٠,٣٤ E-05
LOX IMVI	ميلانيني	١,١ ± ٠,٠٤ E-05	٨,٧ ± ٠,٣٣ E-06
M14	ميلانيني	٧,٥ ± ٠,٣٠ E-06	٧,٠ ± ٠,١٨ E-06
MALME-3M	ميلانيني	٨,٧ ± ٠,٣٣ E-06	١,٣ ± ٠,٢٠ E-05
SK-MEL-2	ميلانيني	١,٤ ± ٠,٠٤ E-05	١,٦ ± ٠,٠١ E-05
SK-MEL-5	ميلانيني	١,٤ ± ٠,٢٠ E-05	١,٦ ± ٠,٠٥ E-05
SK-MEL-28	ميلانيني	١,٢ ± ٠,١١ E-05	١,٥ ± ٠,٠٨ E-05
UACC-62	ميلانيني	١,٦ ± ٠,٠٥ E-05	١,٦ ± ٠,٠٤ E-05
UACC-257	ميلانيني	٣,٧ ± ٠,٠٧ E-06	٦,١ ± ٠,١٤ E-06
RPMI-8226	MM	٥,٩ ± ٠,٦٧ E-06	٢,٩ ± ٠,١٩ E-06
A549	سرطان غير الخلية الصغيرة	١,٣ ± ٠,١٨ E-05	٢,٠ ± ٠,٤١ E-05
EKVX	سرطان غير الخلية الصغيرة	١,٦ ± ٠,٠٤ E-05	١,٧ ± ٠,٠٨ E-05
HOP-62	سرطان غير الخلية الصغيرة	١,٣ ± ٠,١١ E-05	١,٦ ± ٠,٠٥ E-05
HOP-92	سرطان غير الخلية الصغيرة	٦,٢ ± ٠,٥٥ E-06	١,٥ ± ٠,٠٤ E-05
NCI-H23	سرطان غير الخلية الصغيرة	٨,٨ ± ٠,٥٦ E-06	١,٤ ± ٠,٠٧ E-05
NCI-H322M	سرطان غير الخلية الصغيرة	١,١ ± ٠,٠٤ E-05	٢,٩ ± ٠,١٨ E-05
NCI-H226	سرطان غير الخلية الصغيرة	٨,٧ ± ٠,٢٧ E-06	١,٧ ± ٠,٠٥ E-05
NCI-H460	سرطان غير الخلية	١,٣ ± ٠,١٥ E-05	١,٧ ± ٠,٣٢ E-05

		الصغيرة	
E-05 ٠,١٧ ± ١,٥	E-05 ٠,٠٨ ± ١,١	سرطان غير الخلية الصغيرة	NCI-H522
E-05 ٠,٠٤ ± ١,١	E-06 ٠,١٩ ± ٦,٢	مبيض	IGR-OV1
E-05 ٠,٢١ ± ١,٨	E-05 ٠,١٧ ± ١,٢	مبيض	OVCAR-3
E-06 ٠,٢٠ ± ٨,٢	E-06 ٠,٢٧ ± ٦,٥	مبيض	OVCAR-5
E-05 ٠,١٨ ± ١,٦	E-05 ٠,٠٨ ± ١,٥	مبيض	OVCAR-8
E-05 ٠,١٦ ± ١,٨	E-05 ٠,١٢ ± ١,٢	مبيض	SK-OV-3
E-05 ٠,١١ ± ٢,٩	E-05 ٠,١٦ ± ١,٣	بروستاتا	DU-145
E-05 ٠,٠٥ ± ١,٦	E-05 ٠,٠٨ ± ١,٤	بروستاتا	PC-3
E-05 ٠,١٢ ± ١,٧	E-05 ٠,٢٢ ± ٢,٦	الكلى	786-0
E-05 ٠,١٨ ± ٣,١	E-05 ٠,١١ ± ٣,٣	الكلى	A498
E-05 ٠,٠ ± ٣,٥	E-05 ٠,٠١ ± ١,٥	الكلى	ACHN
E-05 ٠,١٩ ± ٣,٣	E-05 ٠,١٢ ± ١,٢	الكلى	CAKI-1
E-05 ٠,٠٨ ± ١,١	E-06 ٠,١٧ ± ٦,٧	الكلى	SN12C
E-05 ٠,٠٧ ± ١,٤	E-05 ٠,٠٤ ± ١,٥	الكلى	TK-10
E-05 ٠,٠٥ ± ١,٦	E-05 ٠,١٥ ± ١,٣	الكلى	UO-31
E-06 ٠,٤٩ ± ٨,٨	E-05 ٠,١٣ ± ١,٥	سرطان الخلية الصغيرة	DMS 114
E-05 ٠,١٩ ± ١,٣	E-06 ٠,٨٨ ± ٨,١	سرطان الخلية الصغيرة	SHP-77

سمية الخلايا في المعمل للمركبات ٦، ٨، ٤٠، ٤١ و٤٤ في سرطان سلالات خلية ميلانينية (B16-F1، MALM-3M)، القولون (HCT-116, SW260)، الكبد (HepG2)، ورم أرومي دبقي (SF268) و LUNG (NCI-H460).

٥

تم تطبيق طريقة :

SRB (Wieland,V.,et al. Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. : Chemosensitivity, volume 1, In Vitro Assays. Methods in Molecular Medicine. Edited by Rosalyn D. Blumenthal. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005.

تم استنبات الخلايا في أطباق دقيقة بها ٩٦ عين. في كل عين، طبقاً لنوع الخلية، تم غرس عدد محدد من الخلايا في ٢٠٠ ميكرو لتر. في هذه الظروف، تم استنبات الخلايا لمدة ٣ أيام، بهدف الوصول إلى طور أُسي من النمو لها لاختبار سمية خلايا المنتج. تم تحضير تركيز المنتج في يوم العلاجات، بعد تجفيف المحاليل المخزنة بالتجميد (١٠ ملي مولار). بعد تجميع الطبق الدقيق مع الخلايا المستنبتة لمدة ٣ أيام، تم التخلص من وسط المزرعة واستبدالها بـ ١٥٠ ميكرو لتر وسط جديد في كل عين. تلى ذلك تسجيل إضافة ٥٠ ميكرو لتر من تخفيف المنتج المناظر بحيث يبلغ التركيز النهائي في الحجم النهائي ٢٠٠ ميكرو لتر في كل عين. تلامست المنتجات، عند التركيزات الخاضعة للاختبار، مع الطبقة الأحادية لنمو الخلية لمدة ٧٢ ساعة والحضانة عند ٣٧ درجة مئوية، ٥٪ CO_2. أخيراً، تم إيقاف نمو الخلايا بإضافة ٥٠ ميكرو لتر من TCA بارد (trichloroacetic acid) ٥٠٪، (تركيز نهائي يبلغ ١٠٪ في العين). بعد ذلك تم الاحتفاظ بطبق دقيق عند ٤ درجة مئوية لما يزيد على ٦٠ دقيقة لإصلاح بروتينات الخلية حتى بداية الغسيل والتبقيع باستخدام SRB. حيوية الخلية (٪) = (مجموعة الخلية بالعين الخاضعة للعلاج / أقصى مجموعة خلية بالمنحنى قياسي) × ١٠٠. تم حساب متوسط قيم الحيوية لكل تركيز من القيم التي تم الحصول عليها لكل عين والتي فيها تم إجراء الاختبار على هذا التركيز. تتضح تركيزات IC_{50} للمركبات الخاضعة للاختبار في أنواع الخلية السبع المختلفة في جدول ٢.

جدول ٢. IC_{50} (ميكرو مولار) في فحص سلالات الخلية

سلالات الخلية	المركب ٨	المركب ٦	المركب ٤٠	المركب ٤٤	المركب ٤١

B16-F1	IC_{50}=١٤ ميكرو مولار	IC_{50}=١٦ ميكرو مولار	IC_{50}=٩ ميكرو مولار	IC_{50}=٨ ميكرو مولار	IC_{50}=٦ ميكرو مولار
HepG2	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}> ٥ M	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار
Malm-3M	IC_{50}=١٦ ميكرو مولار	IC_{50}=١٣ ميكرو مولار	IC_{50}=٣٠ ميكرو مولار	IC_{50}=٤٠ ميكرو مولار	IC_{50}=٤٤ ميكرو مولار
SF268	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار	IC_{50}=٢٩ ميكرو مولار	IC_{50}=٣٣ ميكرو مولار	IC_{50}=٣١ ميكرو مولار	IC_{50}=١٧ ميكرو مولار
SW260	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار	IC_{50}=١٣ ميكرو مولار	IC_{50}>٥٠ ميكرو مولار	IC_{50}<٥٠ ميكرو مولار	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار
HCT116	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار	IC_{50}=٨,١ ميكرو مولار	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار
NCI-H460	٥٠ ميكرو مولار>IC_{50}>٥ ميكرو مولار	IC_{50}=١٧ ميكرو مولار	IC_{50}=٨،١ ميكرو مولار	IC_{50}=٩،٤ ميكرو مولار	IC_{50}=٢ ميكرو مولار

الخلايا غير الورمية من البشر (فحص ثانوي)

تمت دراسة سمية الخلايا للمركبات في الخلايا غير الورمية من البشر في الأورمات الليفية، خلايا HUVEC واسترخاء PBLs (الخلايا الليمفاوية lymphocytes بالدم المحيطي).

تظهر المركبات الخاضعة للاختبار سمية خلايا محددة ضد HUVEC والأورمات الليفية في مدى من ١٠-٥ مولار. بشأن PBLs الأخرى، بالكاد تؤثر المركبات على PBLs حتى عند ١٠-٤ مولار. لأن المركبات تحفز الموت المبمج للخلايا في سلالات خلية سرطان مبحث الدم عند مدى تركيز ١٠-٥-١٠-٦ مولار، توضح هذه البيانات نافذة علاجية لسرطانات مبحث الدم مقارنة بخلايا الدم الطبيعية.

تم الحصول على خلايا HUVEC بواسطة علاج الحبال البشرية باستخدام إنزيم كولاجينيز من النوع I، ٠١ ٪ في وسط Hank والحضانة لمدة ٢٠ دقيقة عند ٣٧ درجة مئوية. تم تجميع الخلايا بعد ذلك وزراعتها في وسط M199 باستخدام مكملات من ٢٠ ٪ P/S٪FBS, 1 و٢٥ مجم/٥٠٠ مل من الوسط ECGF، تم استنبات الخلايا على ٠,٢ ٪ منظومة جيلاتين.

تم استنبات كميات ملحوظة من الخلايا المستنبتة أسياً في ٩٦ طبق عيار دقيق مسطح القاعدة بحجم نهائي يبلغ ١٠٠ ميكرو لتر في ٩٦ طبق عيار دقيق مسطح القاعدة، والحضانة عند ٣٧ درجة مئوية في مناخ رطب من ٥٪ CO_2/٩٥٪ هواء لمدة ٢٤ ساعة لترك الخلايا تلتصق بالأطباق. بعد ذلك، تمت حضانة الخلايا باستخدام تركيزات مختلفة من المركب الخاضع للتجربة عند ٣٧ درجة مئوية تحت ٥٪ CO_2/٩٥٪ مناخ هواء لمدة ٧٢ ساعة. تم تحديد كمية تكاثر الخلية باستخدام طقم تكاثر الخلية XTT (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) طبقاً لتعليمات المُصنع. بإيجاز، تم إضافة محلول خليط محضر جديد (٥٠ ميكرو لتر) من مادة متفاعلة مرمزة XTT ومادة متفاعلة لإقران إلكترون PMS (methyl-N داي بنزو بيرازين methyl سولفات) إلى كل عين. تمت حضانة الخلائط الناتجة علاوة على ذلك لمدة ٤ ساعات في مناخ رطب (٣٧ درجة مئوية، ٥٪ CO_2)، وتم قياس امتصاص منتج الformazan المتولد باستخدام قارئة طبق عيار دقيق عند طول موجي للاختبار يبلغ ٤٩٠ نانو مولار وطول موجي مرجعي ٦٥٥

نانو مولار. ثم تم حساب IC_{50} (تركيز مثبط ٥٠٪) على هيئة تركيز العقار المسبب لـ ٥٠٪ تثبيط تكاثر الخلية. تم عرض البيانات على هيئة متوسط قيم أربع تجارب مستقلة تم إجرائها من ثلاث نسخ. يتم عرض النتائج في جدول ٣.

جدول ٣. IC_{50} للخلايا غير الورمية من البشر

٥

المركب	IC_{50} (M)	
	HUVEC	أرومات ليفية
المركب ٣	$١,٦ \pm ٠,١ \times ١٠^{-٥}$	$١,٩ \pm ٠,٣ \times ١٠^{-٥}$
المركب ٤٠	$٣,٦ \pm ٠,٣ \times ١٠^{-٥}$	---
المركب ٤٤	$٥٥ \pm ٠,٤ \times ١٠^{-٥}$	---
المركب ٤١	$٥٢ \pm ٠,١ \times ١٠^{-٥}$	---
المركب ٦	$٢,٧ \pm ٠,١ \times ١٠^{-٥}$	$٢,٤ \pm ٠,٣ \times ١٠^{-٥}$
Doxorubucin	$٢,٣ \pm ٠,١ \times ١٠^{-٧}$	---
تاكسول	$٤,٧ \pm ٠,٧ \times ١٠^{-١٠}$	$٧,٥ \pm ٠,٥ \times ١٠^{-١٠}$

لعزل الخلايا الليمفاوية lymphocytes بالدم المحيطي الطبيعية (PBLs)، تم الحصول على الخلايا أحادية النواة من الدم المحيطي الجديد من البشر من متطوعين أصحاء بواسطة الطرد المركزي

على تدرجات كثافة Ficoll-Hypaque، والغسيل باستخدام محلول ملحي منظم بالفوسفات peripheral blood lymphocytes (PBLs)، وإعادة التعليق في وسط RPMI-1640 يحتوي على ١٠٪ (حجم/حجم) FBS مثبط بالحرارة، ٢ ملي مولار L-glutamine ، ١٠٠ وحدة / مل penicillin ، و١٠٠ ميكرو جرام / مل streptomycin وفقاً للموصوف (Cabaner et al. Br. J. Pharmacol 127:813-825.1999).

تم استنفاذ وحيدات الخلايا بواسطة الالتصاق بطبق مزرعة بعد الحضانة على مدار الليل.

تم غسيل اخلايا غير الملتصقة (الخلايا الليمفاوية lymphocytes) باستخدام PBS وتجميعها. كانت تحضيرات PBL نمطياً ٧٠-٧٥٪ CD3+، ٢٤-٢٩٪ CD19+، وأقل من ٠,٤٪ CD14+.

جدول ٤. تأثير المركبات ٣ و٦ على PBLs من البشر.

	٪ الموت المبرمج للخلايا PBLs	
المركب	$١٠^{-٤}$ مولار	$١٠^{-٥}$ مولار
المركب ٣	٧,٥	١,٣
المركب ٦	٧,٢	٤,١
Doxorubucin	٢١,٧	١٣,٢

بالكاد تؤثر المركبات ٣ و٦، على PBLs حتى عند $١٠^{-٤}$ مولار مما يوضح مرة ثانية سمية خلايا أقل من Doxorubucin. لأن هذه المركبات تحفز موت الخلايا في سلالات خلية سرطان مبحث

الدم عند مدى تركيز ١٠$^{-٦}$ مولار، توضح هذه البيانات نافذة علاجية لسرطانات سرطان مبحث الدم مقارنة بخلايا الدم الطبيعية.

النشاط المضاد للورم antitumoral activity في الكائن الحي للمركب ٣ في نموذج حيوان طعم خارجي سرطان الدم بالخلية الليمفاوية المزمن.

تم استنبات سرطان الدم بالخلية الليمفاوية المزمن chronic lymphocytic leukaemia (CLL) سلالة الخلية EHEB في وسط RPMI-1640 يحتوي على ١٠٪ (حجم/حجم) مصل بقري جنيني منشط بالحرارة، ٢ ملي مولار L-glutamine ، ١٠٠وحدة / مل penicillin ، و١٠٠ ميكرو جرام / مل streptomycin عند ٣٧ درجة مئوية في ٩٥٪ هواء رطب و٥٪ CO2. تم اختبار الخلايا دورياً للعثور على عدوى المفطورةوتم اكتشاف أنها سالبة. تم الإبقاء على فئران CB17 ذات نقص المناعة الحاد (SCID) (Charles River laboratories, Lyon, France)، والتعامل معها طبقاً للتوجيهات المؤسسية، والالتزام بالتشريع الأسباني تحت دورة ١٢/١٢ ساعة ضوء/إظلام عند درجة حرارة تبلغ ٢٢ درجة مئوية، وتلقت حمية غذائية قياسية وماء حمضي حسب الرغبة. تم تلقيح فئران CB17-SCID تحت الجلد في الظهر السفلي باستخدام خلايا ١,٥ × ١٠ ^{٧} EHEB في ١٠٠ ميكرو مولار PBS و١٠٠ ميكرو مولار منظومة غشاء قاعدة Matrigel (Becton Dickinson). عندما انتفخت الأورام، تم تخصيص الفئران عشوائياً في مجموعات تتكون كل منها من ١٠ فئران، تتلقى إعطاء في الوريد (٣ مرات / الأسبوع) من المركب في الذيل. بلغ الحجم المستخدم لكل إعطاء في الوريد ٢٠٠ ميكرو مولار، ليصل تركيز العقار النهائي ٢,٥ مجم/كجم (وزن الجسم). تم حقن الفئران في الوريد بحجم مكافئ من مادة ناقلة vehicle وإجراء ذلك على التوازي. تم قياس أطول وأقصر قطر للورم باستخدام فرجار، وتم حساب حجم الورم (١٠-٣ سم٣) باستخدام الصيغة القياسية التالية: (أقصر قطر)٢ × (أطول قطر) × ٠,٥. تم قتل الحيوانات، طبقاً للتوجيهات المؤسسية، عندما بلغ

قطر ورمها ٣ سم أو عند ملاحظة سمية ملحوظة. وزن جسم الحيوان وتمت مراقبة أي مؤشر على المرض. دام العلاج بالعقار ٤١ يوماً. بعد ذلك، تم عزل طعوم الورم، قياسها ووزنها، وتحليل الصفة التشريحية التي تشتمل على الأورام وتمت إزالة الأعضاء الواضحة. تم التعبير عن جميع القيم على هيئة متوسطات ± SD. تم تقييم الفروق الإحصائية بين المجموعات باستخدام اختبار Mann-Whitney أو اختبار t لـ Student. تعتبر قيمة p الأقل من ٠,٠٥ ملحوظة إحصائياً. تم تصوير النتائج في شكل ١. ثبط المركب ٣ على نحو ملحوظ (**، p <٠,٠١) نمو ورم CLL مقارنة بالمجموعة المقارنة (المعالجة باستخدام مادة ناقلة vehicle). بعد اكتمال التجربة في الكائن الحي، تم قتل الفئران المعالجة بالمركب المقارن والمركب ٣، تم عزل الطعوم الخارجية للورم وقياس وزن الورم وحجمه، مما يظهر انخفاض ملحوظ وواضح (p < ٠,٠١) في حجم الورم ووزنه في الفئران المعالجة بالمركب ٣ مقارنة بفئران العينة المقارنة غير المعالجة.

	طعم خارجي CLL		
	مقارن	المركب ٣	تثبيط (٪)
حجم الورم (سم^3)	١,٩٣٩	٠,٤٨٧	**٧٤,٨٨
وزن الورم (جم)	١,٨٩	٠,٩٣٢	**٥٠,٦٩

** p<٠,٠١ (اختبار Student)

بمجرد قتل الحيوانات، تم إجراء تحليل تشريحي يشمل الأورام والأعضاء الواضحة. لم يتم الكشف عن أحداث ملحوظة أو تغييرات في الأعضاء الواضحة الخاضعة للتحليل بعد التحليل التشريحي.

تشابه وزن الفئران في كل من العينة المقارنة غير المعالجة والفئران المعالجة. تقترح هذه البيانات الافتقار إلى الآثار الجانبية الملحوظة في علاج الفئران باستخدام المركب ٣. أظهرت الأورام التي تم عزلها من الفئران المعالجة بالمركب ٣ تكوين أوعية دموية ضئيل مقارنة بالفئران من العينة المقارنة الحالمة لأورام خالية من العقار، مما يشير إلى أن المركب ٣ يمكن أن يشتمل على أنشطة مضادة لتصنيع الأوعية يمكنها تعزيز أنشطتها السامة السامة للخلايا المضادة للورم. تشير هذه النتائج إلى أن المركب ٣ يظهر نشاط ملحوظ وفعال مضاد للورم في الكائن الحي في نموذج فأر طعم خارجي CLL. إضافة إلى ذلك، تم تحمل العلاج بكل من نوعي العقار جيداً ولم يتم كشف أية سمية واضحة في دراسات التشريح.

بالنسبة لجميع أيام القياس، كان فرق المركب ٣ على العينة المقارنة ملحوظ إحصائياً ($p<0,05$).

النشاط المضاد للورم antitumoral activity للمركب ٣ في الكائن الحي في نموذج حيوان طعم خارجي ورم ميلانيني متعدد multiple myeloma .

تم استنبات سلالة خلية ورم ميلانيني متعدد multiple myeloma MM1S (MM) في وسط RPMI-1640 يحتوي على ١٠٪ (حجم/حجم) مصل بقري جنيني منشط بالحرارة، ٢ ملي مولار L-glutamine ، ١٠٠ وحدة / مل penicillin ، و١٠٠ ميكرو جرام / مل streptomycin عند ٣٧ درجة مئوية في هواء رطب ٩٥٪ و٥٪ CO2. تم اختبار الخلايا دورياً للعثور على عدوى المفطورة وكان الاختبار سلبياً. تم الاحتفاظ بفئران مصابة بعجز المناعة المدمج الحاد CB17(SCID) (Charles River laboratories, Lyon, France)، والتعامل معها طبقاً للتعليمات المؤسسية، طبقاً للتشريع الأسباني تحت دورة ١٢/١٢ ساعة ضوء/ظلام عند درجة حرارة تبلغ ٢٢ درجة مئوية، وحصلت على حمية غذائية قياسية وماء حمضي حسب الرغبة. تم تلقيح فئران CB17-SCID تحت الجلد في أسفل الظهر باستخدام ٣ × ١٠ ^{٧} خلايا MM1S في ١٠٠ ميكرو لتر PBS و١٠٠

ميكرو لتر منظومة غشاء قاعدة Matrigel (Becton Dickinson). عند انتفاخ الأورام، تم تخصيص الفئران عشوائياً إلى مجموعات تتكون من ١٠ فئران في كل منها، تحصل على إعطاء في الوريد (٣ مرات / الأسبوع) للمركب في الذيل. يبلغ الحجم المستخدم في كل من الإعطاء في الوريد يبلغ ٢٠٠ ميكرو لتر، مما يجعل التركيز النهائي للعقار يبلغ ٢,٥ مجم/كجم (وزن الجسم). تم إعطاء الفئران في الوريد حجم مكافئ من مادة ناقلة vehicle على التوازي. تم قياس أطول وأقصر قطر للورم باستخدام فرجار، وحساب حجم الورم (١٠-٣ سم^{٣}) باستخدام الصيغة القياسية التالية: (أقصر قطر)٢ × (أطول قطر) × ٠,٥. تم قتل الحيوانات، طبقاً للتوجيهات المؤسسية، عندما بلغ قكر الورم لديها ٣ سم أو عند ملاحظة سمية ملحوظة. تمت مراقبة وزن جسم الحيوان وأي مؤشر على المرض. استمر العلاج بالعقار لمدة ١ شهر. بعد ذلك، تم عزل الأورام، قياسها ووزنها، وتم إجراء تحليل تشريحي يشتمل على الأورام والأعضاء الواضحة.

بالنسبة لجميع أيام القياس، كان فرق المركب ٣ عن ذلك المقارن ملحوظ إحصائياً (p<٠,٠٥). يتم عرض النتائج في الشكل رقم ٢. يوضح الجدول التالي بيانات الورم خارج الكائن الحي في نهاية العلاج.

	طعم خارجي من فأر MM1S		
	مقارن	المركب ٣	تثبيط (٪)
حجم الورم (سم٣)	٣,٧٢٢	٠,٢٨٨	**٩٢,٢٦

وزن الورم (جم)	٤,٥٦٩	٠,٦٤٧	*٨٥,٨٤

* p<٠,٠٥ ، ** p<٠,٠١ (اختبار Student)

النشاط المضاد للورم antitumoral activity المركب ٣ على خلايا سرطان الدم بالخلية الليمفاوية المزمن chronic lymphocytic leukaemia cells من المرضى.

تم اختيار مجموعة من الخلايا من ٦ مرضى من البشر مصابين بسرطان الدم بالخلية الليمفاوية المزمن تظهر أنماط مختلفة من من التعبير عن ZAP70 (انظر التغييرات بالصبغيات الملحوظة في جدول ٥). تمت حضانة الخلايا في وجود المركب ٣. تم تصوير نتائج الدراسة، والتي توضح الحيوية في الشكل رقم ٣.

٥

جدول ٥

شفرة المريض	العمر التشخيصي	النوع	Estadio	CD19/ CD5٪	ZAP70٪	تعديلات الصبغيات

(FISH)						
طبيعي	٧٠	٩٥	B/C	M	٦٩	CLL 07/86
حذف 13q	٢٠ <	٩٤	B/C	F	٤٦	CLL 07/133
طبيعي	١٩	٩٥	A	M	٥٤	CLL 07/151

كان الانخفاض في الحيوية ملحوظاً بدرجة أكبر في الخلية التي لها تعبير منخفض عن ZAP70، بطريقة تابعة للجرعة.

النشاط المضاد للورم antitumoral activity في الكائن الحي للمركب ٣ في نموذج حيوان سوي الموضع لسرطان القولون colon cancer KRAS مطفر.

٥ باستخدام نموذج حيوان قائم على خلايا سرطان القولون والمستقيم colorectal cancer من المرضى المشتملون على طفرة Kras، المنغرسة في فئران في منطقة القولون :

Yao, M. Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. Br. J. Cancer, 2004 Feb 9;90(3):712-9

١٠ تم اختبار تأثيرات المركب ٣. تظهر الصور في الشكل ٤أ تأثير انخفاض ملحوظ بحجم الورم بسرطان القولون colon cancer والمستقيم في البشر. يتم عرض التأثير المقارن المباشر للمركب ٣ واثنين من العقاقير المضادة للورم المختلفة المستخدمة على نطاق واسع لسرطان القولون: ٥-FU و Oxaliplatinum (OXA).

يتم عرض وزن ورم سرطان القولون في البشر من الفئران المعالجة المسخدم من الفئران المعالجة باستخدام المركب 3 (NF), Oxaliplatinum (OXA), 5-F uracil (5-FU) وتوليفات منها في شكل ٤ب.

النشاط المضاد للورم antitumoral activity في الكائن الحي للمركب ٣ في نموذج حيوان سوي الموضع لورم ميلانيني Melanoma .

باستخدام نموذج حيوان بناء على خلايا ورم ميلانيني B16 من فأر :

Szende, B., et al, Effect of a novel somatostatin analogue combined with cytotoxic drugs on human tumour xenografts and metastasis of B16 melanoma. British Journal of Cancer (2003) 88, 132 – 136

ظهر المركب ٣ نشاط مضاد للورم فعال في الكائن الحي في نموذج حيوان ورم ميلانيني Melanoma سوي الموضع. بلغت جرعة المركب ٣ ٣٠ مجم/كجم في الغشاء البريتوني في جميع هذه التجارب. يعرض شكل ٥ النتائج.

يمثل شكل ٥أ صورة PET لنشاط إنزيم luciferase لورم ميلانيني في الكائن الحي. تكون قوة الإشارة أعلى في الأورام ذات الخلايا المتكاثرة بصورة أكبر. يعرض شكل ٥ب الأورام الميلانينية خارج الكائن الحي من الحيوانات عند نهاية العلاج. الشكل ٥ج عبارة عن رسم بياني يعرض وزن الورم الميلانيني بعد العلاج بالمركب المقارن أو المركب ٣. تم إجراء ٤ تجارب مختلفة ومستقلة باستخدام ع =٤ حيوانات لكل مجموعة. الشكل ٥د عبارة عن رسم بياني يعرض تجربة فردية لنموذج ورم ميلانيني B16 Melanoma في الكائن الحي مع ع=٩ حيوانات لكل مجموعة.

النشاط المضاد للورم antitumoral activity في الكائن الحي للمركب ٣ في نموذج حيوان سوي الموضع لورم بالمبيض.

أظهر المركب ٣ نشاط فعال مضاد للورم في الكائن الحي يقلص من مساحة الورم. تم إجراء التجارب باستخدام خلايا MOSEC ID8 (الخلايا الظهارية بسطح المبيض في الفئران) مع مرسل إنزيم luciferase مستنسخ والخلايا المنغرسة في منطقة المبيض بالفئران :

Yu-Hung Huang et al, Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis. 3426–3430 PNAS 2009. vol. 106, no. 9

يعضد شكل ٦ النتائج.

يوضح الشكل رقم ٦أ صورة Pet لنشاط luciferase في الورم في الكائن الحي (المركب رقم ٣، الفئران التي تمت معالجتها : ٣٠ مجم/كجم في البريتون، ٥ أيام في كل أسبوع أثناء الأسبوعين).

يوضح الشكل رقم ٦ب الحساب الكمي لإشارة luciferase من عينة المقارنة والمركب ٣ في الحيوانات التي تمت معالجتها.

التأثير الآلي

سلالات خلية السرطان المتعلقة بالدم

ينتج عن حضانة المركب رقم ٣ مع سلالات خلية السرطان الدموية المشتملة على MM، CLL ، وخلية T الحادة وسلالات خلية سرطان الدم النشواني، حص موت الخلية كما تم اختبار ذلك من خلال مظهر الخلية مع محتوى DNA الذي يكون أقل من G1 والذي يكون مميزاً للتلاشي المبكر للخلية (القمة الفرعية G1 ، بعد المعالجة من ٦-٩ ساعات). تم حث أكثر من ٢٠٪ من تلاشي الخلية بعد ٢٤ ساعة من المعالجة باستخدام ١٠ ميكرو مولار من المركب ٣ باستخدام EHEB (سرطان الدم الحاد في الخلية T) و الخلايا HL-60 (سرطان الدم النشواني الحاد acute myeloid leukaemia) chronic lymphocytic leukaemia (CLL) ، RPMI-8226 (MM)، Jurkat.

يتم دعم الحث الخاص بموت الخلايا أيضاً من خلال الانشطار السريع الخاص بـPARP ، مع ركيزة تحتية من caspase -٣ وأيضاً من خلال تنشيط caspase -٣. عندما تتم معالجة الخلايا

EHEB باستخدام المركب ٣، فإن caspase -٩ تم تنشيطه أيضاً، مع اقتراح تضمين نقل الإشارة الذي تتوسطه المتقدرات في تأثير العقار. ينتج عن تنشيط caspase -٤ وجود التضمين المفترضة على ضغط الغشاء الإندوبلازمي. وعلى نحو فيد فإن الحث السريع والفعال للملتهمة الذاتية قد تمت ملاحظته بعد المعالجة بالمركب رقم ٣ كما تم اختباره عن طريق التكوين الصلب ببروتين مرتبط بأنبوب صبغي ١ من السلسلة الخفيفة ٣ (LC3-II) في زمن الحضانة.

حث تلاشي الخلية في خلايا EHEB من خلال المركب رقم ٣ : (الشكل رقم ٧أ):

تمت حضانة خلايا EHEB في الوقت الموضح باستخدام ١٠ ميكرو مولار من المركب ٣، وتم الحساب الكمي لتلاشي الخلية في شكل نسبة مئوية من الخلايا في المنطقة الفرعية sub-G_1 في تحليل دورة الخلية من خلال قياس التدفق الدموي. إن موضع القمة الفرعية لـ sub-G1 (نقص الضعفانية) الذي يتم تكامله من خلال الخلايا الميتة وأيضاً في شكل قمم G0/G1 و G2/M التي تم توضيحها من خلال الأسهم. تمت معالجة عينات المقارنة غير المعالجة على نحو مواز. كانت النسبة المئوية باستخدام محتوى DNA أقل من G1 (sub-G1) والتي تم حثها في كل من المخطط. تم توضيح مخطط التجربة في مخططات ثلاثة. وعلى نحو مختصر، يتم الطرد المركزي للخلايا (٥ × ١٠ ^{٥}) ويتم تثبيتها طوال الليل في ٧٠٪ من ethanol عند ٤ درجات مئوية. تم غسل الخلايا ثلاث مرات باستخدام PBS ، وتمت حضانتها لمدة ساعة باستخدام ١ مجم/مل من RNaseA و٢٠ ميكرو جرام/مل من propidium iodide عند درجة حرارة الغرفة وبعد ذلك تم التحليل في الخلية الورمية باستخدام Becton Dickinson FACS Calibur مقياس التدفق الخلوي (San Jose, CA). تم حساب الخلايا التي تم تلاشيها على نحو كمي في شكل نسبة مئوية من الخلايا في منطقة G_1 (جسم مضاد ضعفاني hypodiploidy) في تحليل دورة الخلية cell cycle analysis.

التعبير عن البروتينات المختلفة في خلايا EHEB التي تمت معالجتها بالمركب رقم ٣ (الشكل رقم ٧ب)

تمت معالجة الخلايا باستخدام ١٠ ميكرو مولار من المركب ٣ في الأزمنة الموضعة وتم التحليل من خلال التبقيع المناعي باستخدام أجسام مضادة معينة للبروتينات التي تم توضيحها. تم توضيح مواضع الانتقال الخاصة بالأجسام المضادة المختلفة. تم استخدام أكتين β في شكل عينة مقارنة خاصة بالتحميل. البيانات الموضحة بمثابة بيانات توضيحية للثلاث تجارب التي تم إجراؤها.

خلايا الورم السرطاني للقولون colon carcinoma cells

تشير النتائج التي تم الحصول عليها أن المركب ٣ يحفز تلاشي الخلايا في سلالات الخلية للورم السرطاني للقولون البشري (SW620, HCT-116)، طبقا لتقييمه بظهور القمة الفرعية G1 (نقص الضعفانيةhypodiploidy) في تحليل دورة الخلايا وبتنشيط إنزيم caspase . يقترح اشتراك مفترض لإرسال إشارة تلاشي الخلايا المتأصل الذي يتوسط فيه الحبيبيات الخيطية في تلاشي الخلايا الذي يحفزه المركب ٣ من خلال حفز إنزيم caspase -٩. علاوة على ما سبق، يحفز المركب ٣ التعبير عن ناتج الجين الأقصر المجدل بشكل بديل لمرض leukaemia -١ للخلية النخاعية (Mcl-1)، الذي يطلق عليه Mcl-1S (اختصاراً)، والذي يكون معززا لتلاشي الخلايا. وتمت أيضا زيادة مستوى البروتين p53 بمعالجة من المركب ٣. باختصار، تشير هذه البيانات إلى أن المركب ٣ يعزز الزيادة المتحكم فيها لـ Mcl-1S و p53 ، والتي يمكن أن تكون مشتركة في قتل خلايا سرطان القولون colon cancer .

حفز تلاشي الخلايا في سلالة خلية HCT-116 لسرطان القولون البشري بواسطة المركب ٣

(الشكل ٨ أ). تم تحديد مقدار حفز تلاشي الخلايا في صورة نسبة مئوية في المنطقة الفرعية G1

(نقص الضعفانية) لتحليل دورة الخلية. بإيجاز، تم تعريض الخلايا (٥ × ١٠ ٥) للطرد المركزي وتم تثبيتها طوال الليل في ٧٠ ٪ ethanol عند ٤ درجة مئوية. وتم غسل الخلايا ٣ مرات بـ PBS، وتمت حضانتها لمدة ساعة بـ ١ مجم / مل RNaseA و٢٠ ميكرو جرام/ مل يود بروبيديوم عند درجة حرارة الغرفة، وبعد ذلك تم تحليلها لدورة الخلية باستخدام مقياس تدفق الخلايا Becton Dickinson FACSCalibur من (San Jose, CA). تمت حضانة الخلايا HCT-116 للأوقات المبينة مع ١٠ ميكرو مولار من المركب ٣، وتم بعد ذلك تحديد مقدار تلاشي الخلايا في صورة نسبة مئوية في المنطقة الفرعية G1 (نقص الضعفانية) في تحليل دورة الخلية بواسطة مقياس تدفق الخلايا. ويتم بيان وضع قمة G1 الفرعية (نقص الضعفانية)، المتكامل بواسطة تلاشي الخلايا، فضلاً عن قمم G0/G1وG2/M بالأسهم. وتم تشغيل الخلايا المقارنة غير المعالجة بالتوازي.

ويتم بيان النسبة المئوية للخلايا ذات محتوى من DNA أقل من G1 (G1 الفرعية) في كل شكل بياني بأعمدة. وتكون التجربة المبينة ممثلة لثلاث تجارب تم تنفيذها.

التعبير عن بروتينات مختلفة مرتبطة بتلاشي الخلايا أثناء المعالجة بالمركب ٣ (الشكل ٨ب). تمت معالجة الخلايا HCT-116 وSW620 باستخدام ١٠ ميكرو مولار من المركب ٣ للأوقات المبينة وتم تحليلها بواسطة التلطيخ المناعي باستخدام أجسام مضادة محددة للبروتينات المبينة. تم بيان مواضع الانتقال للبروتينات المختلفة. تم استخدام أكتين بيتا كمقارن تحميل. تكون البيانات الموضحة عبارة عن بيانات تمثيلية لثلاث تجارب. تم تكوير حوالي ١٠ ^{٧} خلية عن طريق الطرد المركزي وتم الغسل باستخدام PBS وتم التحليل.

تمت معالجة البروتينات (٢٠ ميكرو جرام) على أنواع sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels وتم نقلها إلى مرشحات من nitrocellulose وتم إغلاقها باستخدام ٥٪

(وزن/حجم) من الحليب منزوع الدهون في TBST (٥٠ مل مولار من تريس HCl (برقم هيدروجيني pH ٨,٠)، ١٥٠ مل مولار NaCl و٠,١٪ من توين ٢٠) لمدة ٩٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة وتمت الحضانة لمدة ساعة عند درجة حرارة الغرفة أو طوال الليل عند ٤ درجات مئوية مع أجسام مضادة معينة:

جسم مضاد من anti-poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) (١: ١٠٠٠ تخفيف) من الجسم الماضد أحادي النسيلة (BD Biosciences Pharmingen)؛ مضاد Bcl-X_L (تخفيف ١: ٥٠٠) من الجسم المضاد متعدد النسائل من الأرنب (BD Biosciences Pharmingen) والجسم المضاد لـ Bcl-2- (١: ٢٥٠ من التخفيف) من الجسم المضاد أحادي النسيلة (BD Biosciences Pharmingen)؛ ومضاد caspase -٣ (تخفيف ١: ٥٠٠) من الجسم المضاد من الأرانب متعدد النسائل (BD Biosciences Pharmingen)، الجسم المضاد لـ caspase -٩ (١: ١٠٠٠ تخفيف) من الجسم المضاد متعدد النسائل المأخوذ من الأرانب (Oncogene)؛ والجسم المضاد لـ Mcl-1 (١: ١٠٠٠ تخفيف) من الجسم المضاد متعدد النسيلة (BD Biosciences Pharmingen) ومضاد p53 (تخفيف ١: ٥٠٠) من الجسم المضاد أحادي النسيلة الفأري (Santa Cruz Biotechnology)؛ أجسام مضادة anti-β-actin (تخفيف ١: ٥٠٠٠) من الجسم المضاد أحادي النسيلة الفأري (Sigma).

تمت حضانة الأجسام المضادة من الفئران والأرانب (GE Healthcare) والماعز (Santa Cruz Biotechnology) والأجسام المضادة الثنائية من HRP عند تخفيف من ١: ٥٠٠٠ في ٥٪ (وزن/حجم) في الحليب منزوع الدهون في TBST لمدة ساعة عند درجة حرارة الغرفة. تمت زيادة الإشارات باستخدام طقم التألق الكيميائي المحسن (Amersham).

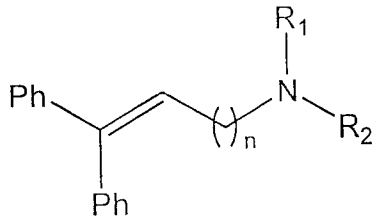
عناصر الحماية

١ ١- مركب بالصيغة (I)، أو ملح أو هيدرات hydrates وكحولات alcoholates منه:، أو ester،

٢ أو إستر حامض أميني amino acid ester ، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني،

٣ أو carbamate أو amide :

٤



(I)

٥ حيث :

٦ تكون Ph عبارة عن phenyl ؛

٧ تكون n عبارة عن ٢، ٣ أو ٤؛

٨ يتم اختيار R_1 من المجموعة المكونة من hydrogen و C_1-C_6 alkyl ؛

٩ تكون R_2 عبارة عن شق بالصيغة –[[CH(R3)]m-R_4]–، حيث

١٠ تكون m عبارة عن ١؛

١١ يتم اختيار R_3، متى كان مناسباً، من المجموعة المكونة من hydrogen ، phenyl و C_1-C_6 alkyl

١٢ ؛

١٣ يتم اختيار R_4 من المجموعة المكونة من aryl غير متجانسة ليس بها استبدال، aryl غير

١٤ متجانسة بها استبدال وشق aryl بها استبدال،

١٥ يتم اختيار مجموعات الاستبدال المذكورة من المجموعة المكونة من C_1-C_6 alkyl ، aryl C7-C11

١٦ alkyl، phenyl ، ٥- أو ٦- ذرات aryl غير متجانسة، F، Cl، Br، I، trifluoromethyl ،

١٧ cyano ، –N(Ra)(Rb)، –ORc، –SRd أو –C(O)Re؛ حيث Ra، Rb، Rc، Rd، وRe تختار

١٨ بشكل مستقل من hydrogen ، C_1-C_6 alkyl ، phenyl و trifluoromethyl ؛

أو

إذا كانت R_1 و/ أو R_3 تختلف عن hydrogen ، فإن R4 يمكن أن تكون أيضاً عبارة عن phenyl ليس بها استبدال؛

أو

R1 وR2، سوياً مع ذرة nitrogen التي يرتبطا بها، من مجموعة aryl غير متجانسة بها أو ليس بها استبدال، حيث تكون مجموعات الاستبدال المذكورة كما تم تعريفها أعلاه

بشرط أن:

2-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-phenol,

3-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-phenol,

5-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-2-methoxy-phenol,

4-[(4,4-diphenyl-but-3-enylamino)-methyl]-2,6-difluoro-phenol,

benzyl-(5,5-diphenyl-pent-4-enyl)-ethyl-amine,

6-Chloro-9-(4,4-diphenyl-but-3-enyl)-9H-purine,

9-(4,4-Diphenyl-but-3-enyl)-9H-purin-6-ylamine, and

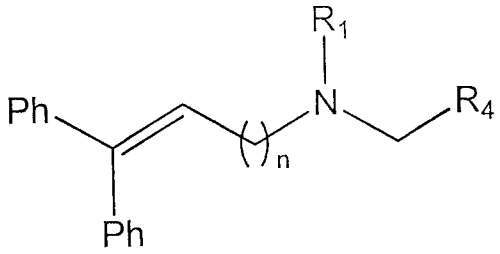
5-(4,4-Diphenyl-but-3-enyl)-4,5,6,7-tetrahydro-isoxazolo[4,5-c]pyridin-3-ol

لا تكون متضمنة في الصيغة (I).

٢- مركب وفقاً لعنصر الحماية ١ حيث يتم اختيار كل مجموعات الاستبدال المذكورة من المجموعة المكونة من C_1-C_6 alkyl ، C_7-C_{11} aryl alkyl، phenyl ، ٥- أو ٦- ذرات aryl غير متجانسة، F، Br، I، trifluoromethyl ، cyano ، $N(R_a)(R_b)$- ، OR_c-، SR_d- أو $C(O)R_e$-؛ حيث R_a، R_b، R_d، وR_e تختار بشكل مستقل من hydrogen ، C_1-C_6 alkyl ، phenyl و

trifluoromethyl ؛ ويتم اختيار R_c من المجموعة المكونة من C_1-C_6 alkyl ، phenyl و trifluoromethyl ، بشرط أن $-N(R_a)(R_b)$ لا تكون $-NH_2$.

٣- مركب وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة بالصيغة (IA)، أو ملح ، أو ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester ، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو hydrate وكحولات منه:



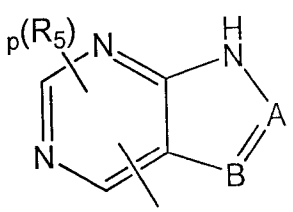
(IA)

حيث Ph، n، R_1 وR_4 تكون كما هي محددة في أي من عناصر الحماية السابقة.

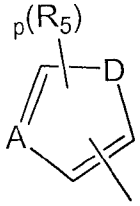
٤- مركب وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة حيث تكون R_4 عبارة عن aryl غير متجانسة ليس بها استبدال أو aryl غير متجانسة بها استبدال تختار من المجموعة المكونة من :

thienyl, furyl, pyridil, 1*H*-benzimidazol, 9*H*-Purine, 1*H*-Imidazole, and 1*H*-Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine.

٥- مركب وفقاً لأي من عناصر الحماية من ١ إلى ٣، حيث تكون R_4 عبارة عن مجموعة بالصيغة (V) أو (VI)



(V)



(VI)

حيث،

A وB تختار بشكل مستقل من –CH– و–N–؛

يتم اختيار D بشكل مستقل من المجموعة المكونة من -O-، –S– و–NH–؛

تكون p عبارة عن عدد صحيح منتقى من المجموعة المكونة من ٠، ١، ٢ أو ٣؛

يتم اختيار كل R_5 من المجموعة المكونة من C_1-C_3alkyl، phenyl ، phenylmethyl ، ٥– أو

٦– ذرات aryl غير متجانسة، F، Br، I، trifluoromethyl ، $N(R_a)(R_b)$–، SR_d– أو –

$C(O)R_e$؛ حيث R_a، R_b، R_d، وR_e تختار بشكل مستقل من hydrogen ، C_1-C_3alkyl، phenyl

وtrifluoromethyl ، بشرط أن في مركب بالصيغة (V) $N(R_a)(R_b)$– لا تكون NH_2–؛

تكون المجموعة المذكورة بالصيغة (V) أو (VI) مرتبطة بباقي الجزيء من خلال أي من المواضع

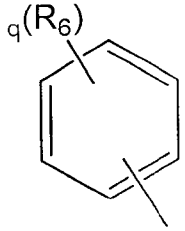
الحرة.

٦– مركب وفقاً لعنصر الحماية ١ حيث R_1 وR_2، سوياً مع ذرة nitrogen التي يرتبطا بها، من

شق تختار من المجموعة المكونة من :

1*H*-benzimidazol, 9*H*-Purine, 1*H*-Imidazole, and 1*H*-Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine

٧– مركب وفقاً لعنصر الحماية ١، حيث تكون R_4 عبارة عن مجموعة بالصيغة (VII)



(VII)

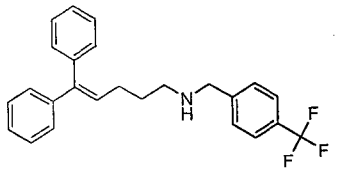
حيث يتم اختيار R_6 من المجموعة المكونة من OCF_3–، OC_1-C_3alkyl ، F، Cl، Br، I وCN–؛

وتكون q عبارة عن عدد صحيح منتقى من المجموعة المكونة من ١، ٢ أو ٣، ويتم ربط المجموعة

المذكورة بالصيغة (VII) بباقي الجزيء من خلال أي من المواضع الحرة.

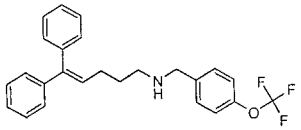
٨- **المركب** وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث R_1 هي hydrogen أو methyl .

٩- **مركب** وفقاً لعنصر الحماية ١ يختار من المجموعة المكونة من :



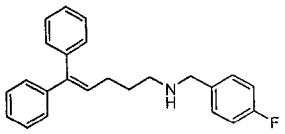
المركب ١

(ملح hydrocloride)



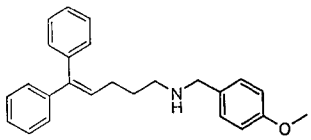
المركب ٢

(ملح hydrocloride)



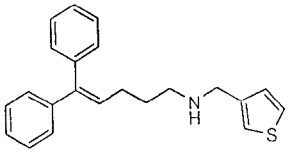
المركب ٣

(ملح hydrocloride)



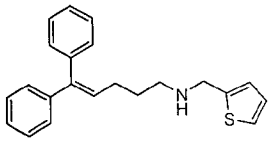
المركب ٤

(ملح hydrocloride)



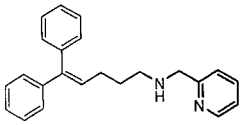
المركب ٥

(ملح hydrocloride)



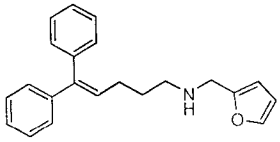
المركب ٦

(ملح hydrocloride)



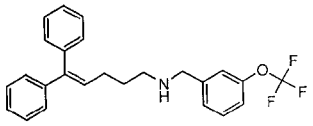
المركب ٧

(ملح hydrocloride)



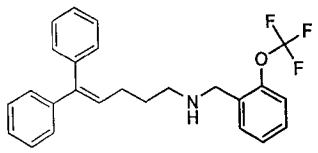
المركب ٨

(ملح hydrocloride)



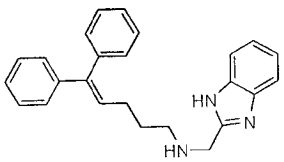
المركب ٩

(ملح hydrocloride)



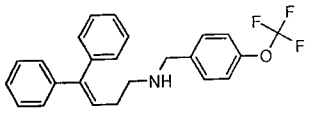
المركب ١٠

(ملح hydrocloride)



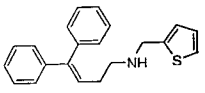
المركب ١١

(ملح hydrocloride)



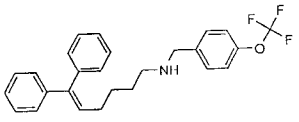
المركب ١٢

(ملح hydrocloride)



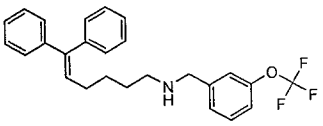
المركب ١٣

(ملح hydrocloride)



المركب ١٤

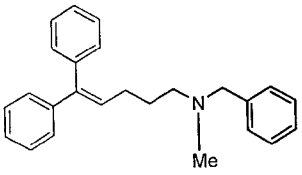
(ملح hydrocloride)



المركب ١٥

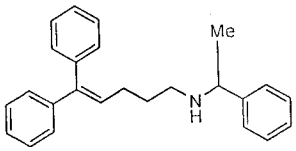
(ملح hydrocloride)

٦



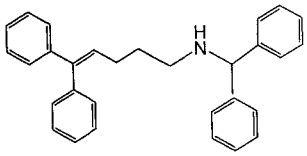
المركب ١٦

(ملح hydrocloride)



المركب ١٧

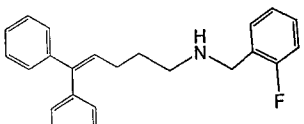
(ملح hydrocloride)



المركب ١٨

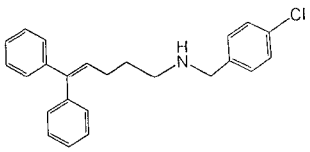
(ملح hydrocloride)

٧



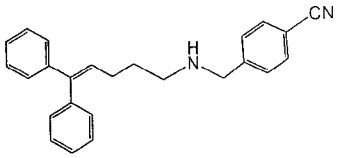
المركب ١٩

(ملح hydrocloride)



المركب ٢٠

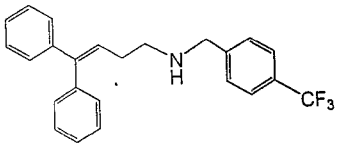
(ملح hydrocloride)



المركب ٢١

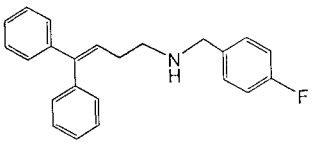
(ملح hydrocloride)

٨



المركب ٢٢

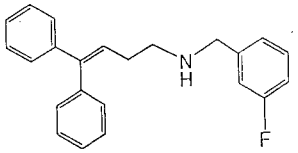
(ملح hydrocloride)



المركب ٢٣

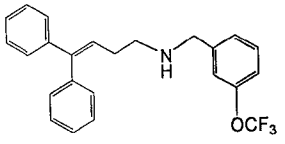
(ملح hydrocloride)

٩



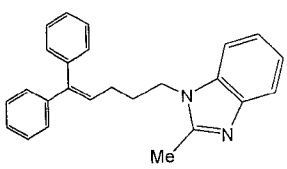
المركب ٢٦

(ملح hydrocloride)



المركب ٢٥

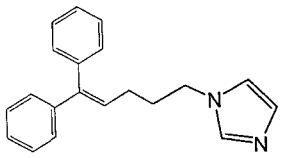
(ملح hydrocloride)



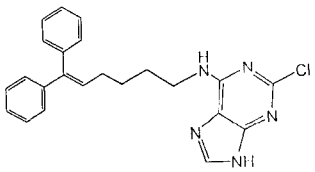
المركب ٢٧

١٠

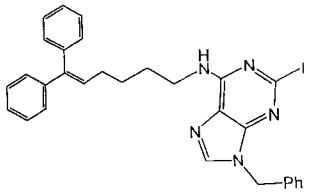
١١



المركب ٢٨



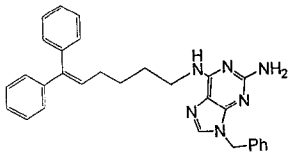
المركب ٢٩



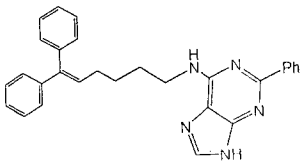
المركب ٣٠

(ملح hydrocloride)

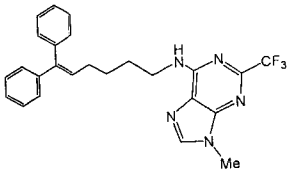
١٢



المركب ٣١

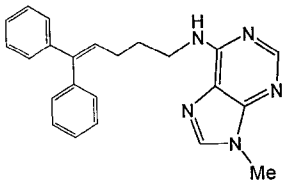


المركب ٣٢

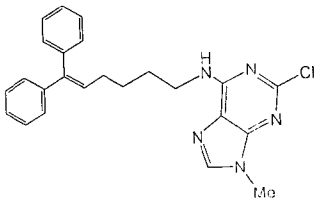


المركب ٣٣

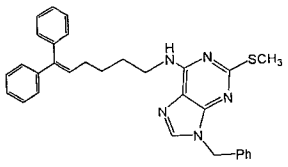
١٣



المركب ٣٤



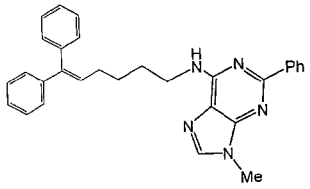
المركب ٣٥



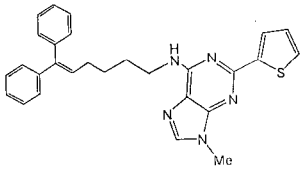
المركب ٣٦

(ملح hydrocloride)

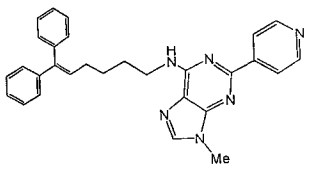
١٤



المركب ٣٧

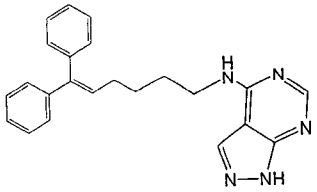


المركب ٣٨

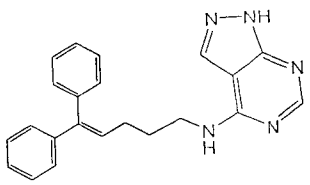


المركب ٣٩

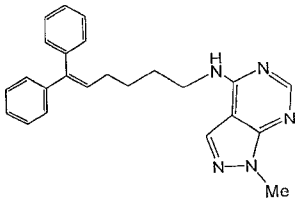
١٥



المركب ٤٠

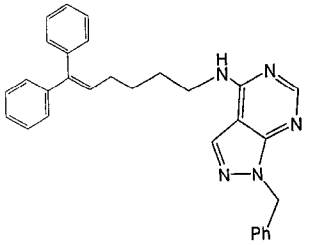


المركب ٤١

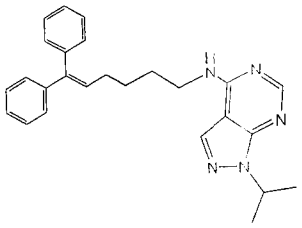


المركب ٤٢

(ملح hydrocloride)

١٦ 

المركب ٤٣ (ملح hydrocloride)



المركب ٤٤ (ملح hydrocloride)

١٧ أو ملح، أو ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester ، أو phosphate ester، أو

١٨ sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو hydrate وكحولات منه:

١ ١٠- تركيبة صيدلانية تتضمن مركب بالصيغة (I) وفقاً لأي من عناصر الحماية من ١ إلى ٩ أو

٢ ملح مقبول صيدلانياً، أو ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester ، أو phosphate ester،

٣ أو sulfonate ester ملح معدني، أو carbamate أو amide أو hydrate وكحولات ، ومادة حاملة

٤ carrier واحدة على الأقل مقبولة صيدلانياً.

١ ١١- مركب بالصيغة (I) وفقاً لأي من عناصر الحماية من ١ إلى ٩ أو ملح مقبول صيدلانياً، أو

٢ ester، أو إستر حامض أميني amino acid ester ، أو phosphate ester، أو sulfonate ester ملح

٣ معدني، أو carbamate أو amide أو hydrate وكحولات للاستخدام في صورة دواء.

١ ١٢- مركب بالصيغة (I) وفقا لعنصر الحماية ١، للاستخدام في صناعة دواء لمعالجة أمراض

٢ التهابية.

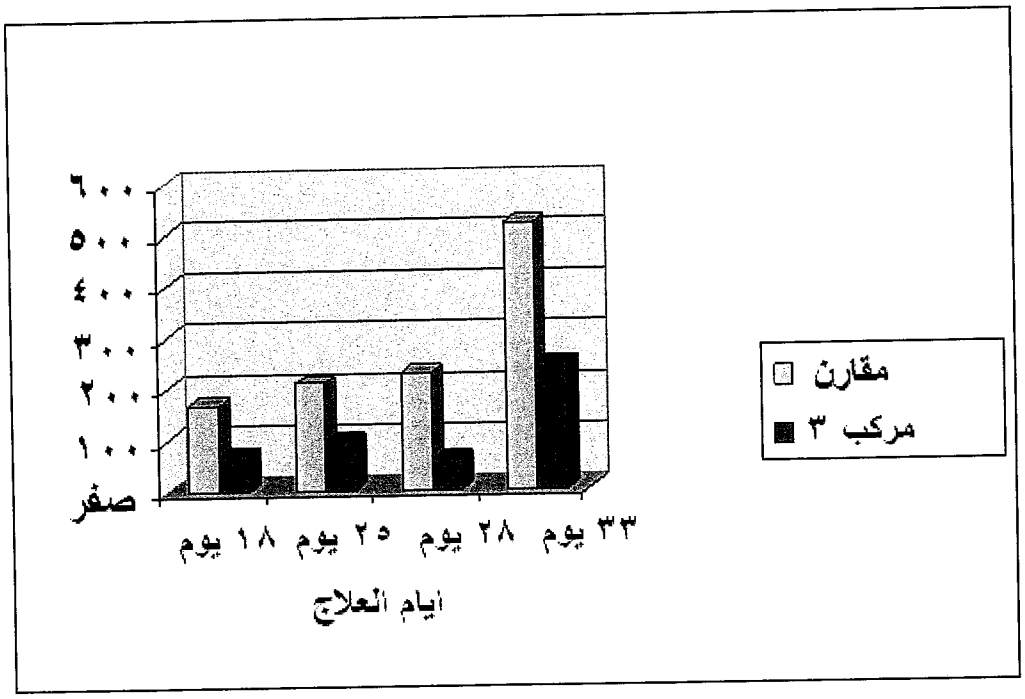
١ ١٣- مركب بالصيغة (I) وفقاً لعنصر الحماية ١٢ حيث يتم اختيار المرض اللالتهابي من

٢ المجموعة المكونة من مرض التهاب الأمعاء Inflammatory Bowel Disease (IBD)، التهاب

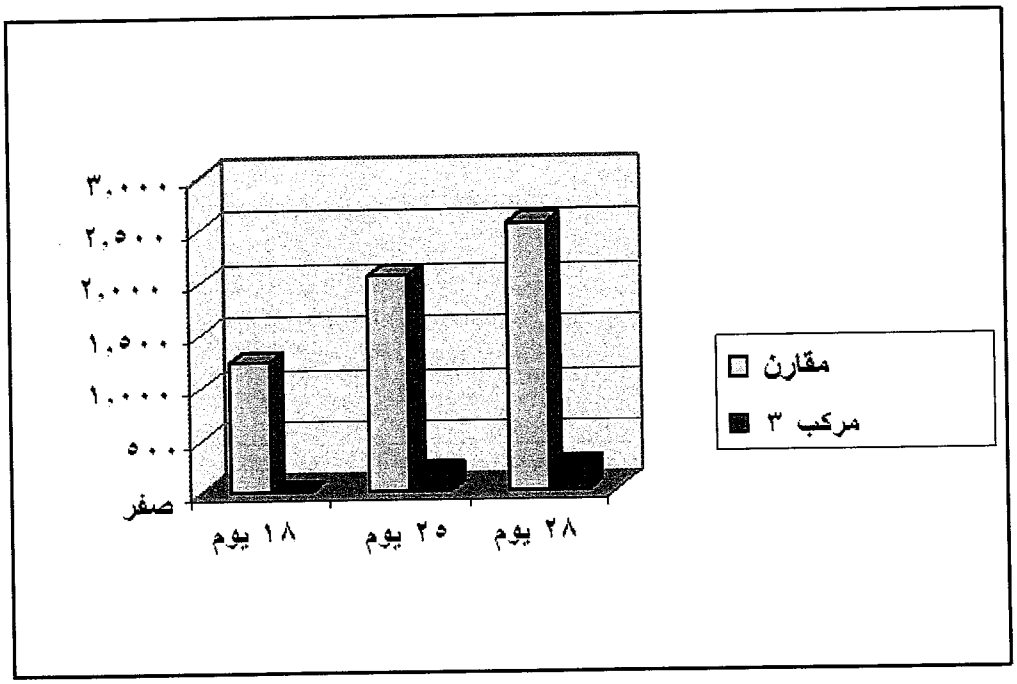
٣ المفاصل الروماتويدي Rheumatoid Arthritis (RA)، تضخم البروستاتا الحميد benign prostatic
٤ hyperplasia ، مرض Barrett، الربو asthma ، الهيكل العظمي وإصلاح الوتر skeletal muscle
٥ and tendon repair ، التهاب القولون التقرحي ulcerative colitis ، داء الليشمانيات
٦ leishmaniasis وأمراض المناعة immune diseases الذاتية autoimmune diseases ، يفضل
٧ مرض Crohn.

١ ١٤ – مركب بالصيغة (I) طبقا لعنصر الحماية ١٢ للاستخدام في علاج السرطان.

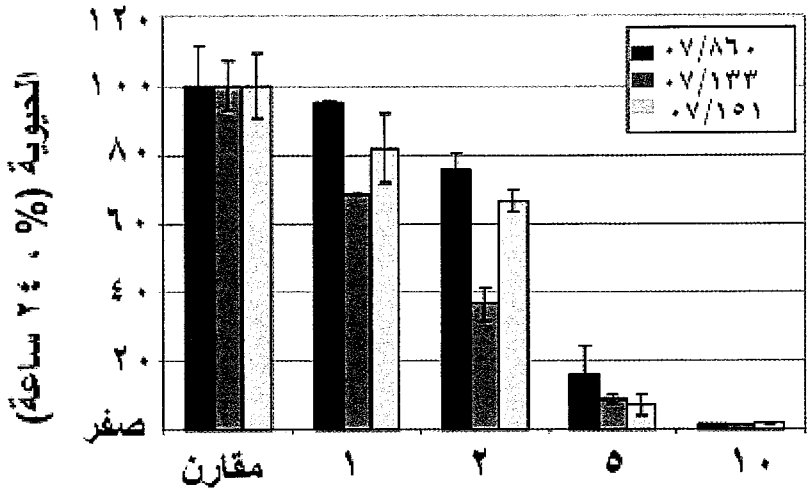
١ ١٥ – مركب وفقاً لعنصر الحماية ١٤ حيث يتم اختيار السرطان من المجموعة المكونة من الورم
٢ النقيلي، سرطان الثدي breast cancer، سرطان المريء esophageal cancer ، سرطان القولون
٣ colon cancer ، سرطانة القولون colon carcinomas ، سرطان المعدة stomach cancer ،
٤ سرطانات الدم Leukemias ، ورم ميلانيني Melanoma ، سرطانة الرحم carcinomas of the
٥ uterus ، سرطان الرئة غير الخلية الصغيرة non-small cell lung cancer ، سرطان الرئة الخلية
٦ الصغيرة small cell lung cancer ، سرطان المبيض ovarian cancer ، سرطانة المبيض ovarian
٧ carcinomas، سرطان البروستاتا prostate cancer ، سرطان الكلى renal cancer ، سرطان الكبد
٨ liver cancer ، سرطانة البنكرياس carcinomas of the pancreas ، سرطان الكلى renal cancer ،
٩ سرطان المثانة، سرطان البروستاتا prostate cancer ، سرطان الخصية، سرطان العظام، سرطان
١٠ الجلد skin cancer ، sarcoma ، ساركومة Kaposi، أورام المخ brain tumours ، ساركومة
١١ عضلية myosarcomas ، أورام أرومية عصبية neuroblastomas ، أورام ليمفية limphomas
١٢ وورم ميلانيني متعدد multiple myeloma .


٦٠٠
٥٠٠
٤٠٠
٣٠٠
٢٠٠
١٠٠
صفر
١٨ يوم
٢٥ يوم
٢٨ يوم
٣٣ يوم
ايام العلاج
مقارن
مركب ٣

شكل ١

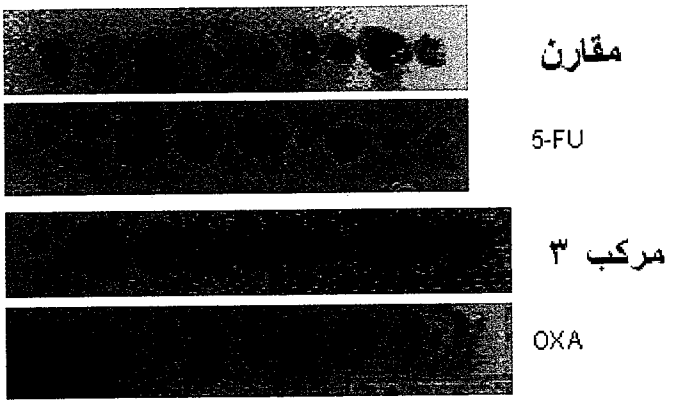

٣,٠٠٠
٢,٥٠٠
٢,٠٠٠
١,٥٠٠
١,٠٠٠
٥٠٠
صفر
١٨ يوم
٢٥ يوم
٢٨ يوم
مقارن
مركب ٣

شكل ٢

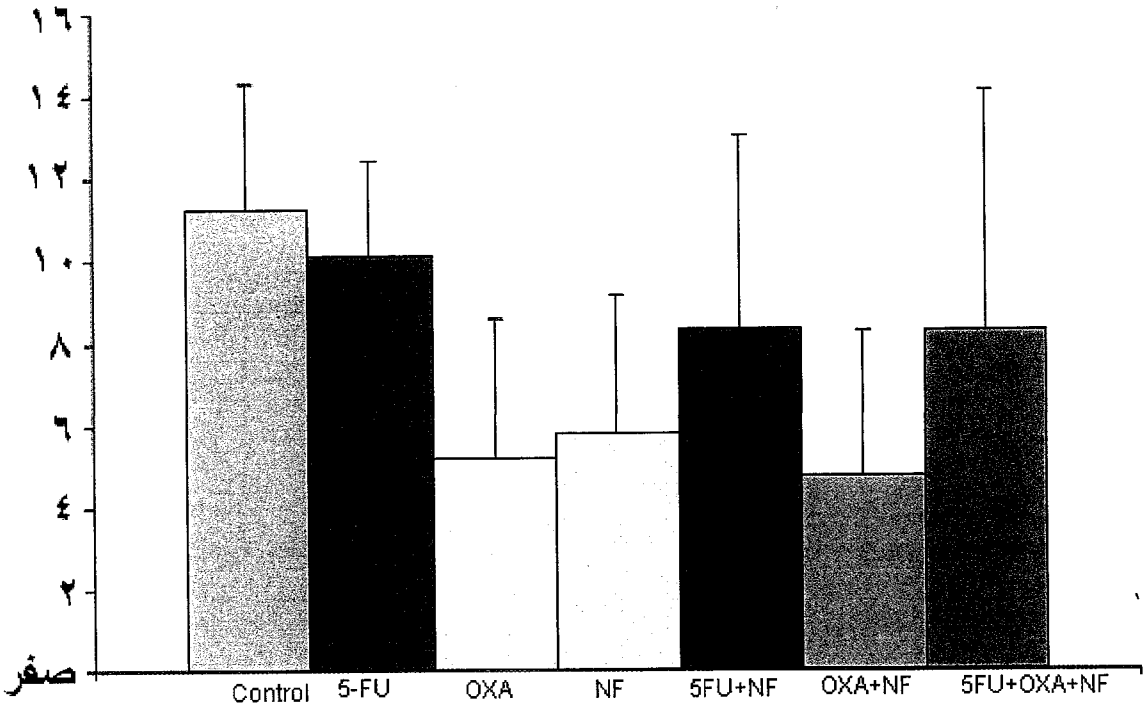

١٢٠
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
صفر
الحيوية (% ، ٢٤ ساعة)
٠٧/٨٦٠
٠٧/١٣٣
٠٧/١٥١
مقارن
١
٢
٥
١٠
مركب ٣ (ميكرو مولار)

شكل ٣

أ

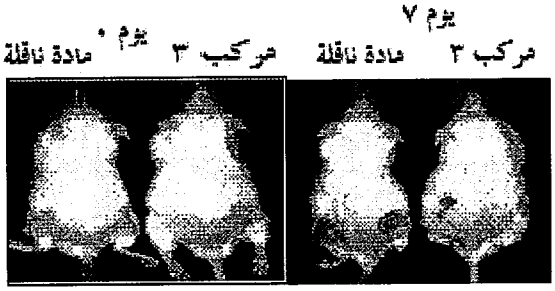


شكل ٤ أ

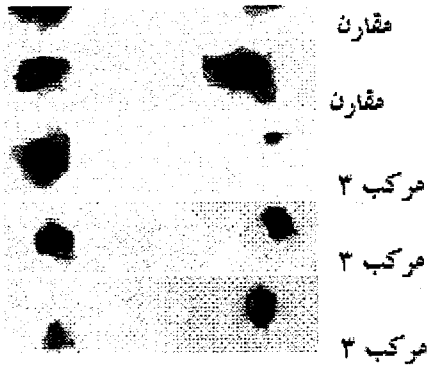


شكل ٤ ب

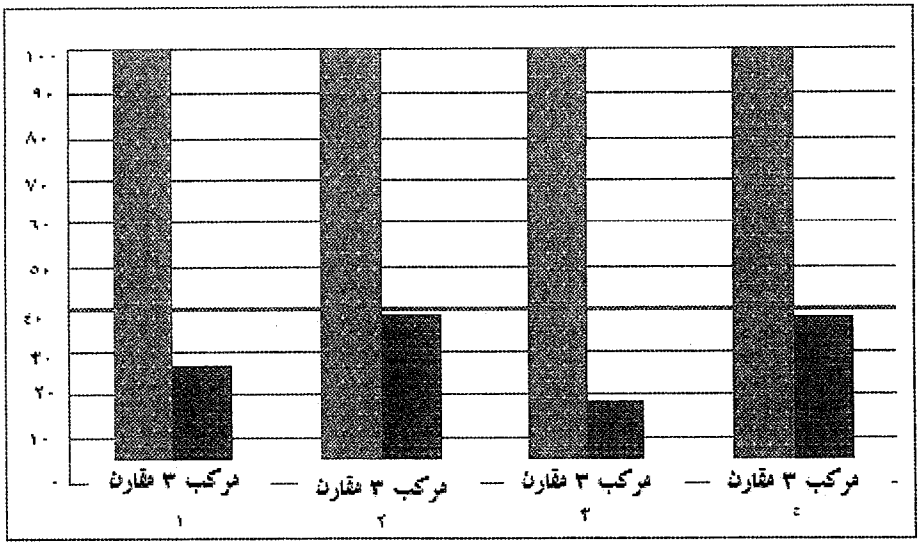
أ


يوم ٧
مركب ٣ مادة ناقلة
يوم ٥
مركب ٣ مادة ناقلة

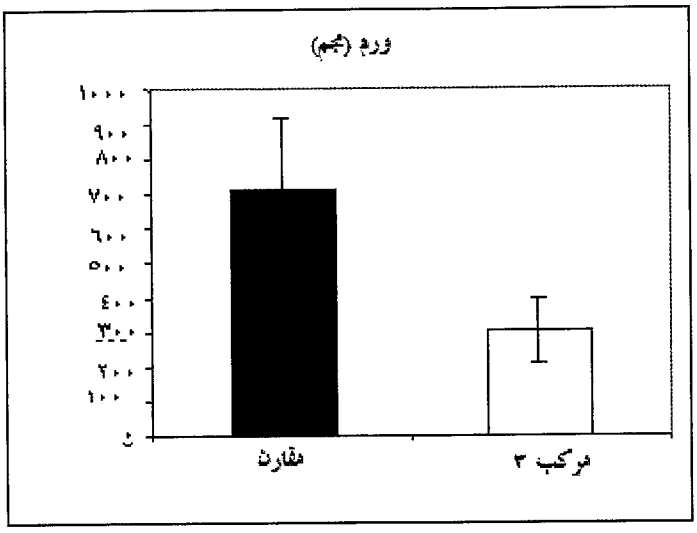
ب


مقارن
مقارن
مركب ٣
مركب ٣
مركب ٣

ج


١٠٠
٩٠
٨٠
٧٠
٦٠
٥٠
٤٠
٣٠
٢٠
١٠
-
مركب ٣ مقارن
١
مركب ٣ مقارن
٢
مركب ٣ مقارن
٣
مركب ٣ مقارن
٤

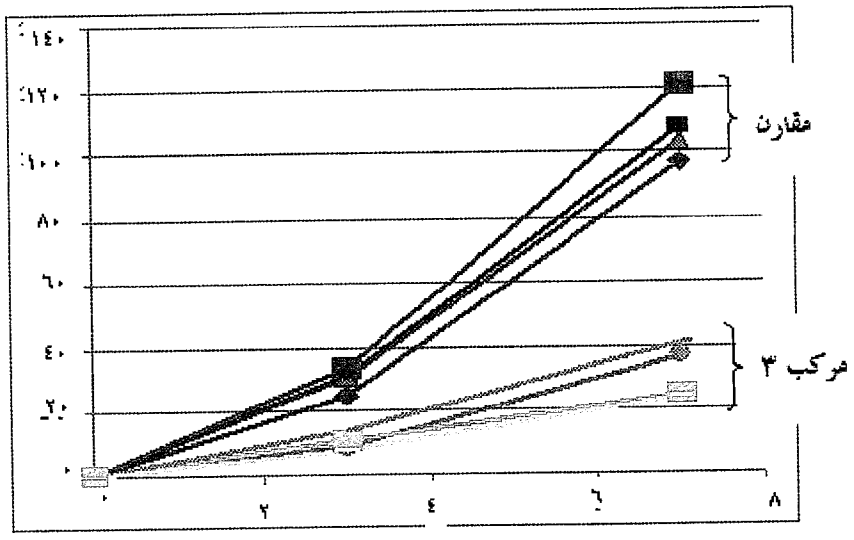
د



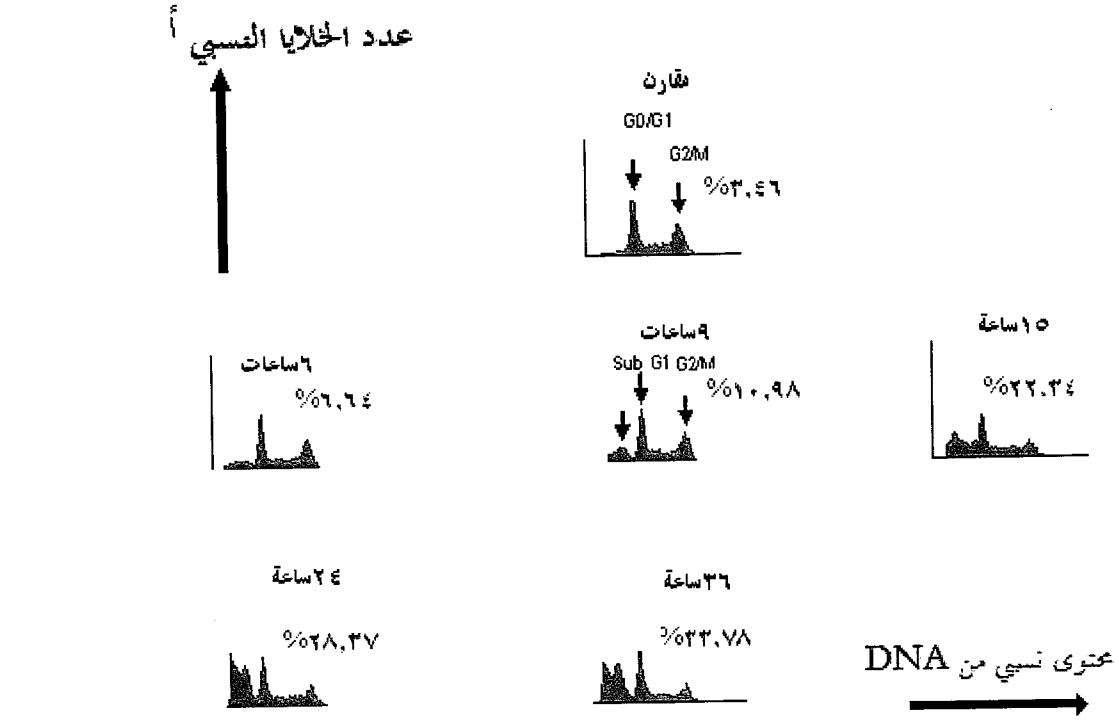
شكل ٥

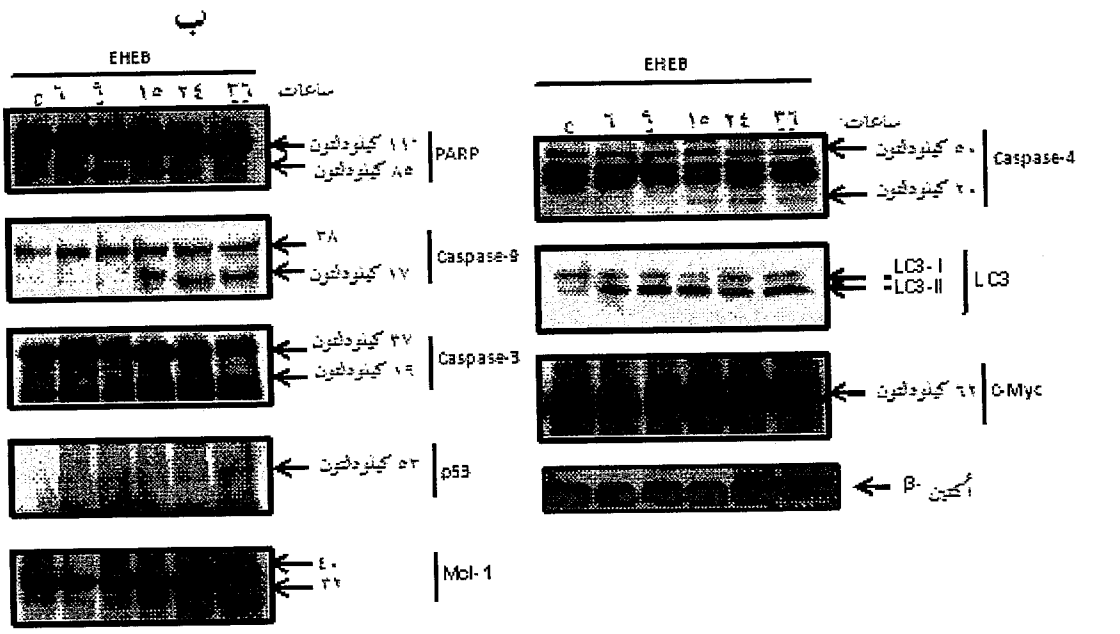
أ

ب

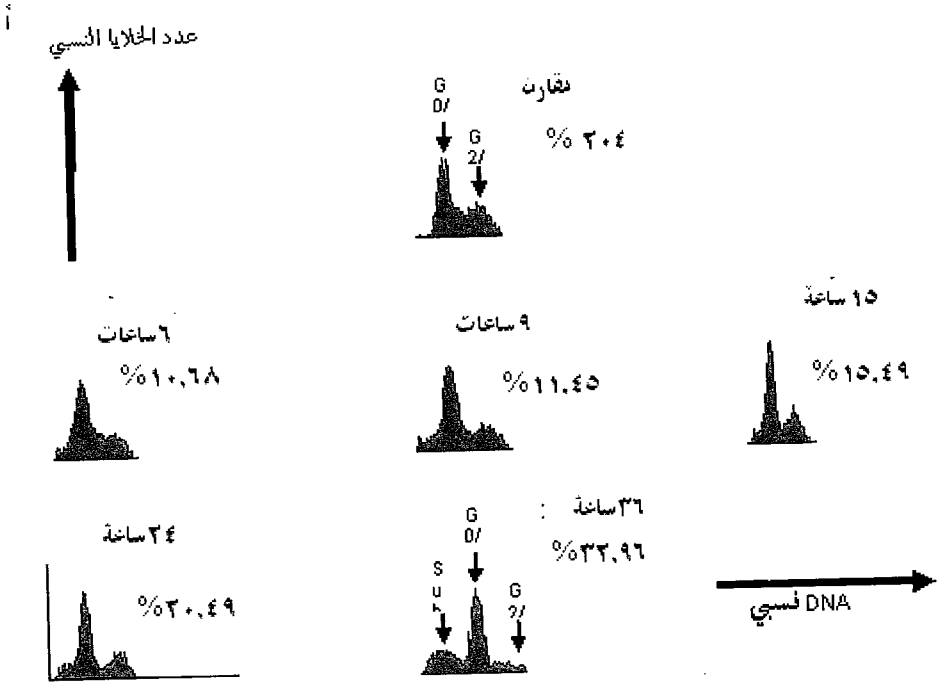


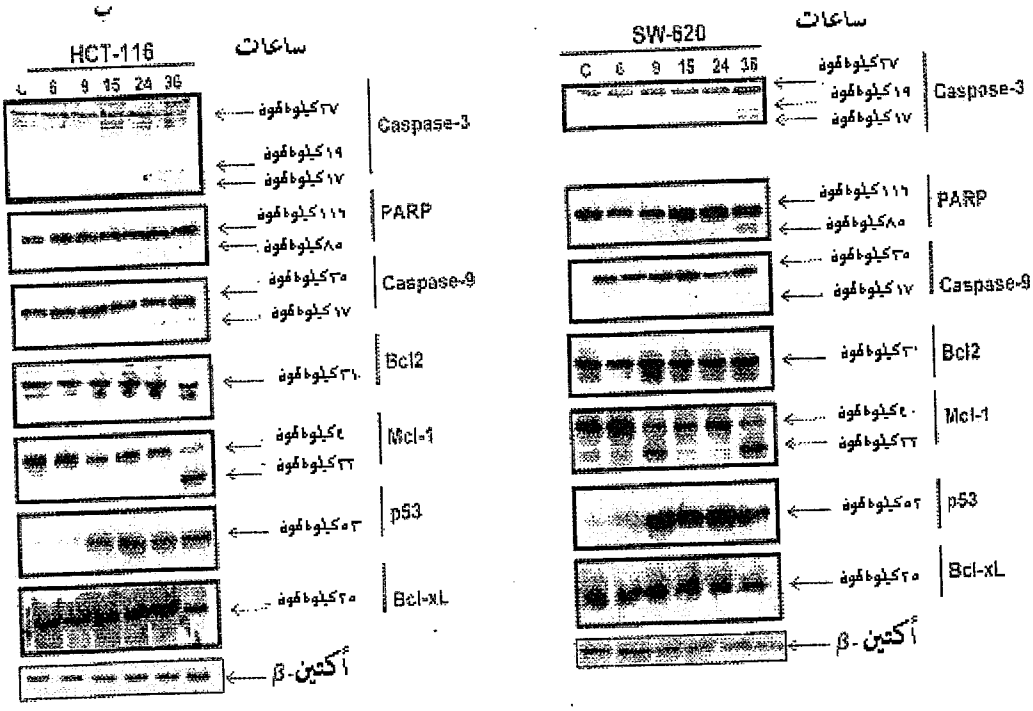
شكل ٦


أ
عدد الخلايا النسبي
مقارن
G0/G1
G2/M
%٣,٤٦
٦ساعات
%٦,٦٤
٩ساعات
Sub G1 G2/M
%١٠,٩٨
١٥ساعة
%٢٢,٣٤
٢٤ساعة
%٢٨,٣٧
٣٦ساعة
%٣٣,٧٨
محتوى نسبي من DNA


ب
EHEB
ساعات
٠ ٦ ٩ ١٥ ٢٤ ٣٦
١١٠ كيلودالتون
٨٥ كيلودالتون
PARP
٣٨
١٧ كيلودالتون
Caspase-9
٣٧ كيلودالتون
١٩ كيلودالتون
Caspase-3
٥٣ كيلودالتون
p53
٤٠
٣٢
Mcl-1
EHEB
ساعات
٠ ٦ ٩ ١٥ ٢٤ ٣٦
٥٠ كيلودالتون
٢٠ كيلودالتون
Caspase-4
LC3-I
LC3-II
LC3
٦٢ كيلودالتون
c-Myc
β-أكتين

شكل ٧


أ
عدد الخلايا النسبي
تقارن
G 0/
G 2/
% ٢٠٤
٦ ساعات
%١٠,٦٨
٩ ساعات
%١١,٤٥
١٥ ساعة
%١٥,٤٩
٢٤ ساعة
%٢٠,٤٩
٣٦ ساعة :
%٣٢,٩٦
S
G
DNA نسبي


ب
HCT-116
ساعات
0 6 9 15 24 36
Caspase-3
PARP
Caspase-9
Bcl2
Mcl-1
p53
Bcl-xL
β-أكتين
SW-620
ساعات
C 6 9 15 24 36
Caspase-3
PARP
Caspase-9
Bcl2
Mcl-1
p53
Bcl-xL
β-أكتين

شكل ٨