

المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia



الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي للهيئة السعودية للملكية الفكرية و بموجب أحكام نظام براءات الإختراع و التصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة و الأصناف النباتية و النماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ و المعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 و تاريخ 1439/10/19هـ ، و لائحته التنفيذية.
يقرر منح :

أشي. لبوراتوريوس فارماكوتيكوس اس. أ
ACHE LABORATPRIOS FARMACEUTICOS S.A.

براءة اختراع رقم : SA 12287

بتاريخ : 1444/07/17 هـ
الموافق : 2023/02/08 م

عن الإختراع المسمى :

تركيبات جديدة واستخدامها لعلاج الاضطرابات المناعية

Novel compositions and their use for the treatment of immunological disorders

وفق ما هو موضح في وصف الاختراع المرفق، ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق النظامية في المملكة العربية السعودية خلال فترة سريان الحماية.

الرئيس التنفيذي

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

[19] **الهيئة السعودية للملكية الفكرية**
[11] **رقم البراءة:** SA 12287 B1

[12] **براءة اختراع**

[45] **تاريخ المنح:** 1444/07/17 هـ
الموافق: 2023/02/08 م

[21] رقم الطلب: 519402443
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1440/12/14 هـ
الموافق: 2019/08/15 م
[30] بيانات الأسبقية:
BR1020170033180 BR 2017/02/17 م
[72] اسم المخترع: كريستيانو روش ويرنيك جيماريس، كارلوس إدواردو فيتور، ليساندرا رافانيلي بيسا، رومولو دراجاني ريس، اليساندرا ماسكاريلو، فرناندو هنريك دي سوزا جاما
[73] مالك البراءة: أشي لابوراتوريوس فارماكوتيكوس اس. أ.
عنوانه: رود بريسيدانتي دوترا، اس/ان - كم 222، بورتو دو ايجريجا 07034-904 جوالولهوس، ساوباولو، البرازيل
جنسيته: برازيلية
[74] الوكيل: مكتب المحامي سليمان ابراهيم العمار

[86] رقم الطلب الدولي: PCT/BR2018/050037
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2018/02/19 م
[87] رقم النشر الدولي: WO 2018/148816
تاريخ النشر الدولي: 2018/08/23 م
[51] التصنيف الدولي(IPC®):
C07D 311/094, C07C 059/042
C07C 069/608
[56] المراجع:
CN 103120699, WO 2008098325
CN 103690551, WO 03094946
EP 1145709, WO 2016128471
EP 0045837
ADEBAJO, A. C. ET AL, "Hypoglycaemic constituents of Stachytarpheta cayennensis leaf", PLANTA MEDICA, (20070222), vol. 73, no. 3, doi:10.1055/s-2007-967125, ISSN 0032-0943, pages 241 - 250, XP002780026

الفاحص: خالد بن أحمد الحازمي

[54] اسم الاختراع: تركيبات جديدة واستخدامها لعلاج الاضطرابات المناعية
Novel compositions and their use for the treatment of immunological disorders

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي بمركبات معزولة جديدة ومبتكرة والعملية لإنتاج مركبات وخلاصات extracts ذات نشاط مثبط للمناعة immunosuppressive activity، من نبات من جنس البَرْكَل (Stachytarpheta). وبهذه الطريقة، يصف الطلب الحالي أيضًا تركيبات جديدة ومبتكرة واستخدامها لعلاج الاضطرابات المناعية immunological disorders.

عدد عناصر الحماية (18)، عدد الأشكال (4)

تركيبات جديدة واستخدامها لعلاج الاضطرابات المناعية

Novel compositions and their use for the treatment of immunological disorders

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يصف الاختراع التالي مركبات معزولة جديدة ومبتكرة وخلاصات ذات نشاط مثبط للمناعة وعملية لإنتاج مركبات من الإيبولاميد والخلاصات، من نباتات من جنس البَرْكَل. وبهذه الطريقة، يصف الطلب الحالي أيضًا تركيبات جديدة ومبتكرة واستخدامها لعلاج الاضطرابات المناعية. والاختراع الحالي يقع ضمن مجالات الصيدلة والطب والكيمياء.

يمكن اعتبار الاضطرابات المناعية كأي فقد توازن أو خلل وظيفي في الجهاز المناعي. وهذا الجهاز مسؤول بشكل أساسي عن المساعدة في الدفاع عن الجسم ضد العوامل الخارجية أو غير المعروفة من خلال الأجسام المضادة التي تتعرف على المستضدات الضارة وتحاربها.

وتعد أمراض المناعة الذاتية مثالًا على الاضطرابات المناعية التي يبدأ فيها الكائن الحي إنتاج أجسام مضادة ضد جزيئاتها، دون تمييز بين العوامل الداخلية والخارجية. وفي مثل هذه الحالات، ستكون الأدوية ذات النشاط المثبط للمناعة مطلوبة بشدة لمساعدة المرضى على تخفيف الأعراض الناجمة عن هذا النوع من الاضطراب.

وتعد أمراض المناعة الذاتية، باستثناء التهاب المفاصل الروماتويدي والتهاب الغدة الدرقية الناجم عن المناعة الذاتية، نادرة بصورة منفردة، ولكنها معًا تصيب حوالي 5% من سكان الدول الغربية. ومسبباتها ليست مفهومة تمامًا. وفي أمراض المناعة الذاتية النوعية للأعضاء والجهازية، يلاحظ فقدان قدرة الجهاز المناعي على تمييز ما هو ذاتي عما هو غير ذاتي. ويتم الاحتفاظ بهذه القدرة، التي تسمى التحمل الذاتي، في الخلايا البائية والتائية المؤهلة مناعيًا بواسطة كل من الآليات المركزية والمحيطية. وقد يكون لفقدان التحمل الذاتي أسباب داخلية أو خارجية. والعوامل البيئية مثل حالات العدوى البكتيرية والفيروسية، والتعرض للعوامل الفيزيائية والكيميائية مثل الأشعة فوق البنفسجية والمبيدات الحشرية والعقاقير هي أمثلة على الأسباب الخارجية. وعادةً ما ترتبط الأسباب الداخلية،

أي المتعلقة بخصائص الفرد نفسه، بتعددات أشكال جزيئات التوافق النسيجي، ومكونات المناعة الخِلقية، مثل النظام المتمم والمستقبلات الشبيهة بالتول (مستقبلات بروتينية لتنشيط المناعة)، ومكونات المناعة المكتسبة كخلايا لمفاوية تنظيمية وسيتوكينات، بالإضافة إلى العوامل الهرمونية التي تخضع للتحكم الوراثي.

وتتألف الاستراتيجية العلاجية في أمراض المناعة الذاتية بالأساس من تثبيط الجهاز المناعي باستخدام مثبطات مناعة، والتي تعمل على تثبيط المراحل المبكرة من تطور المناعة. وهذا العلاج لا يقوم بإجراء كبت مناعة انتقائي، والذي أدى إلى تطور مجموعة متنوعة من الأجسام المضادة. وقد يتم استخدام العوامل البيولوجية لتثبيط تأثير السيتوكينات، كما يحدث مع الأجسام المضادة أحادية النسيلة المضادة للسيتوكينات أو استخدام مستقبلات قابلة للذوبان ترتبط بالسيتوكين وتمنع آثارها على الخلايا المستهدفة. ويتم أيضًا استخدام السيتوكينات في العلاج البيولوجي من خلال البروتينات المأشوبة المضاهئة التي تحاكي تأثير السيتوكين الأصلي. وتكون الأهداف العلاجية الرئيسية في العلاج المضاد للسيتوكينات هي إنترلوكين-1 السيتوكينات المعززة للالتهابات (IL-1)، TNFα و IL-6، ويتم تنفيذ علاج ناهض السيتوكين الرئيسي باستخدام إنترفيرونات من النمط I (IFN). وفي عائلة الإنترفيرون من النمط I، يتم استخدام بروتينات مأشوبة من IFNα ومن IFNβ في الممارسة السريرية، في المقام الأول لعلاج التهاب الكبد الفيروسي (فيروس التهاب الكبد B وC) والتصلب المتعدد، على الترتيب. وبالنسبة للأخير، فإن آلية العمل المقترحة هي التضاد الذي يحدثه الـ IFNβ ضد IFNγ، والذي له أهمية كبيرة في الفيزيولوجيا المرضية للتصلب المتعدد. وتم استخدام الـ IFNα أيضًا في علاج المظاهر المخاطية الجلدية والعينية والعصبية لداء بهجت ومتلازمة شيرج شتراوس. والفونتوليزوماب هو عامل مؤنسن مضاد لـ IFNγ، والذي تم تقييمه في المرضى الذين يعانون من تشوهات في الخلايا التغصنية مع نتائج جيدة.

وتتمتع الأجسام المضادة أحادية النسيلة بمزايا في علاج أمراض المناعة الذاتية عند مقارنتها بالعلاجات التقليدية لأنها علاج مستهدف، مع نوعية وانتقائية عالية. ومع ذلك، يتم استخدامها كخط ثان للعلاج عند عدم وجود فعالية في السيطرة على أمراض المناعة الذاتية مع العلاجات التقليدية. وبالإضافة إلى القيود المفروضة على الفعالية، فإن الأجسام المضادة أحادية النسيلة لا تزال بها

العديد من القيود المتعلقة بالتكلفة وإمكانية الوصول إليها. والعديد من أمراض المناعة الذاتية لا تزال تفتقر إلى علاجات فعالة، مع تحمل جيد من جانب المرضى.

وتم استخدام المنتجات الطبيعية لعدة قرون في علاج أمراض مختلفة. وفي الآونة الأخيرة، بُذِلَت جهود كبيرة في تطوير بحث جديد عن منتجات عشبية ذات تأثيرات مثبطة للمناعة. فعلى سبيل المثال، أظهرت بالفعل العديد من التجارب الإكلينيكية التي أجريت في الولايات المتحدة فوائد هامة لخلاصة T. wilfordii في المرضى المصابين بالتهاب المفاصل الروماتويدي. وعلى الرغم من وجود العديد من الأنواع ومكوناتها النشطة مع وصف آليات العمل، لا يزال هناك مجال واسع يتعين استكشافه فيما يتعلق بالفحوصات في المختبر وفي الجسم الحي والتجارب السريرية المستقبلية في الأمراض ذات الأساس المناعي. ويجب أن تصاغ هذه المنتجات الطبيعية في تركيبات دوائية مناسبة لضمان فعالية علاج أمراض المناعة الذاتية.

وأحد أمراض المناعة الذاتية التي لا يوجد لها، حتى الآن، دواء فعال، أقل كثيرًا من خيار دواء يتم الحصول عليه من الخلاصات الطبيعية، يمكن تمثيله بالبهاق. ويرتبط البهاق عادةً بفقدان الخلايا الميلانينية الوظيفية ويعتبر اضطراب فقد الصباغ المكتسب الأكثر شيوعًا في البشر، يصيب 0.5% على الأقل من سكان العالم. وهو يتميز بتطور البقع البيضاء، الناتجة عن فقدان الخلايا الميلانينية البشروية، والتي يمكن أن تؤدي إلى تدمير خلوي من خلال استجابة مناعية سامة للخلايا محددة للخلايا الميلانينية وإلى تلف نظام الالتصاق الخاص بها.

وارتبطت آليات متعددة بالبهاق مثل الاستعداد الوراثي والتنشيطات البيئية والشذوذات الأيضية والتغيرات في الاستجابات المناعية والالتهابية. وبالإضافة إلى ذلك، فمن المعروف أن حالات مثل التعرض للإشعاع فوق البنفسجي والإجهاد المؤكسد تؤدي إلى تفاقم هذه الحالة.

ونظرًا للافتقار إلى المعرفة المحددة حول البداية الأولية للمرض، تحاول العديد من الدراسات توضيح المسارات البيولوجية المتضمنة في هذا الإمراض. ويشير معظمها إلى التعقيد والتحديات المتعلقة بهذا المرض، حيث يصعب جدًا العثور على علاج فعال. ويجب ألا ننسى أن معظم الاضطرابات المناعية لها تأثير اجتماعي مهم، حيث تتسبب في ارتفاع مستوى الضغط النفسي للمرضى. وحتى الآن، لا يوجد تدخل قادر على تقديم العلاج للبهاق.

وبهذه الطريقة، تصبح الحاجة إلى تحديد مركبات جديدة قادرة على تعزيز النشاط المثبط للمناعة ذات تأثير طويل الأمد. وبالتالي، فإن الاختراع الحالي يعالج هذه الفجوة في علاج الاضطرابات المناعية من خلال مركبات جديدة والتي، عند عزلها، تُظهِر النشاط المثبط للمناعة وخلاصات نشطة تشتمل على مجموعات من المركبات النشطة، والتي يتم الحصول عليها بطريقة فريدة ومبتكرة.

وبتسليط الضوء على تعقيد ونقص المعرفة العلمية حول البهاق، فقد كان يُعتقَد حتى الآن أن بنية الإيبولاميد في صورته السليمة يمكن أن يرتبط بالنشاط المثبط للمناعة، ذي الصلة بمعالجة المرضى المصابين بالبهاق. ومع ذلك، في الاختراع الحالي نوضح أن هذا النشاط ينتج عن مشتقات محددة من الإيبولاميد والخلاصات التي تشتمل على هذه المركبات، ويُفضَّل التي يتم الحصول عليها بواسطة عمليات الإنتاج الفريدة والمبتكرة الموصوفة في هذا الطلب. وتقدم كل من المركبات والخلاصات نشاطًا مثبطًا للمناعة مؤكَّدًا تجريبيًا. ويتم إظهار هذا النشاط في هذا الطلب عن طريق منع تنشيط الخلايا التائية +CD8 والحد من إفراز □-IFN. وقد اتضح أن هذه الآلية واعدة للبهاق في ضوء النتائج السريرية الحديثة المتعلقة بالتحديد الكمي لهذه المكونات في جلد المرضى. وعلى وجه التحديد، ترتبط التركيزات العالية للخلايا التائية +CD8 و□-IFN بالموت الخلوي المبرمج للخلايا الميلانينية، وبالتالي، فإن تعديل هذه الخلايا يعد آلية واعدة للعمل.

يتعلق طلب البراءة الدولي رقم 2016128471 بخليط نباتي نشط مناعيا يشتمل على خلاصة نباتية واحدة على الأقل يتم اختيارها من فصيلة (أ) النجمية، (ب) اللوزية، و/أو (ج) البخورية، ويفضل من جنس (أ) الحسيكة، (ب) البركل، و/أو (ج) البورسيره.

يتعلق طلب البراءة الدولي رقم 2008098325 بالحصول على مركب ومنتج صيدلاني معياري من جذور، جذوع، لحاء، وأوراق نباتات من جنس البركل (فصيلة اللوزيات)، في صورة خلاصات أو أجزاء غنية، أو مركبات معزولة نقية أو مركبات يتم الحصول عليها من تخليق أو شبه تخليق، تستخدم وحدها (خلاصة نقية) أو مخلوطة بمنتجات مصنعة أو طبيعية أخرى، بنسب مختلفة، لدمجها في تركيبات صيدلانية للاستخدام عبر المسارات المناسبة (سطحي أو فموي)، وتحديدا في صورة أقراص، كبسولات، أصباغ، مستحلبات، W/O و O/W (كريمات وجلات)، جسيمات شحمية، كبسولات دقيقة، جسيمات نانوية، بخاخ، مراهم، وغير ذلك من الأشكال، وكذلك تركيبات لغرسات بطيئة الإطلاق، تستخدم في علاج البهاق ومظاهره –فقدان صبغة الجلد.

تتعلق البراءة الدولية رقم 03094946 بطريقة لعلاج أو الوقاية من حالات الأمراض الكبدية في خاضع ثديي يشمل البشر، وتشتمل الطريقة المذكورة على خطوات إعطاء الثديي جرعة فعالة من تركيبة تشتمل على حمض 2- p- هيدروكسي بينزويل موساندويك من نبتة فيتكس نيجوندو اختياريا على نحو منفرد أو في توليفة من واحد أو أكثر من الإضافات الصيدلانية.

تتعلق البراءة الصينية رقم 03690551 بتحضير 6-O- أستيل تشكن جلوكوزايد وحمض 6ألفا- ميثوكسي جينيبنك من نبات، وتحديدا تتعلق باستخدام راتنج وجل امتزاز واسع المسامية أو تحضير 6- O- أستيل جلوكوزايد و6 α أستيل جلوكوزايد و6 α-ميثوكسي جينبين في عمود جل سيلكا ذات طور عكسي؛ ومركب 6-O- أستيل جلوكوزايد و6 α ميثوكسي جينيبن. وتتعلق بالاستخدام الطبي لمركبات جلوكوزايد في المناعة المضادة للالتهاب والحماية العصبية.

تتعلق البراءة الصينية رقمم 103120699 باستخدام مركبات الإيريدويد.

تتعلق البراءة الأوروبية رقم 1145709 بمستحضرات التجميل والصيدلة وتتعلق أولا باستخدام مستخلصات نباتية معينة في إنتاج مستحضرات تجميلية وثانيا باستخدام المستخلصات كمواد فعالة نشطة لزيادة نشاط أنزيمات معينة في الأيض، وكذلك تتعلق بطريقة لتقييم المواد الفعالة النشطة بالنسبة لشيخوخة الجلد.

تكشف البراءة الأوروبية رقم 0045837 عن مشتقات إيريدويد تفاعلية ممثلة بالصيغة العامة التالية (حيث تمثل R ذرة هيدروجين، مجموعة ألكيل مع 1 إلى 5 ذرات كربون، مجموعة أسيل مع 2 إلى 6 ذرات كربون، مجموعة أر ألكيل ليس بها استبدال مع 7 إلى 12 ذرة كربون، مجموعة ميثان سلفونيل أو تولين سالفونيل، بينزويل، مجموعة نيتروبنزويل أو كلورو بينزويل باستبدال بارا بشكل تفضيلي، أو مجموعة تترا هيدرو بيرانيل)، وطريقة لتصنيع المشتقات المذكورة بداية من الكاتابول باعتباره مادة طبيعية سهل الحصول عليها واستخدام المشتقات المذكورة كمواد وسيطة في تصنيع مركبات البروستانويد.

تكشف وثيقة أديباجو إيه سي وآخرين "المكونات الخافضة لسكر الدم في ورقة Stachytarpheta cayennensis"، PLANTA MEDICA, (20070222), vol. 73, no. 3, doi:10.1055/s-2007-967125, ISSN 0032-0943, pages 241 - 250,

XP002780026 [X] 1,5,6,9-32 * page 243, column l, paragraph 3 - column r, paragraph 5 * * ipolamide and 6beta-hydroxyipolamide * [l] 1,5,6,9-32

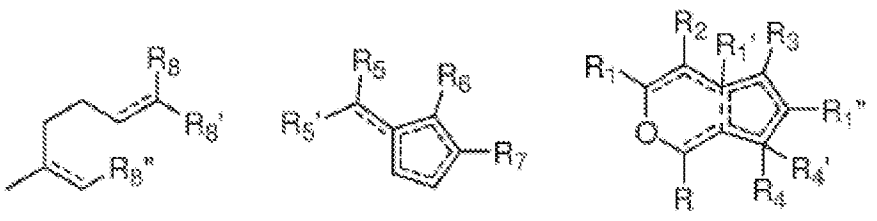
عن منقوع مائي (شاي) لأوراق Stachytarpheta cayennensis يستخدم في نطاق الطب العرقي في بلدان البيرو، نيجيريا وغيرها من البلدان الاستوائية للتحكم في مرض السكري. أظهر الإعطاء الفموي للمنقوع المائي (125مج/كجم) والمستخلصات الميثانولية (2000مج/كجم) من الأوراق لفئران مصابة بسكري ألوكسان معدلات انخفاض واضحة في جلوكوز الدم بنسب 43% و53% على الترتيب، في نهاية فترة زمنية من 4 ساعات مشابهة للتأثير القوي لـ جليبنسلاميد (5مج/كجم، بالفم).

ومن بين ما يمكن استخلاصه من أدبيات البحث، لم يتم العثور على أي مستندات تتوقع أو تقترح تعاليم الاختراع الحالي، لذلك فإن الحل التقني المقترح في هذا الطلب يتسم بالجِدَّة والنشاط الابتكاري في ضوء الفن السابق.

الوصف العام للاختراع

يصف الاختراع الحالي مركبات جديدة ومبتكرة مشتقة من الإيبولاميد، والتي لها نشاط مثبط للمناعة. لذلك، يمكن استخدامها لعلاج الاضطرابات المناعية. وبالإضافة إلى ذلك، يصف الاختراع الحالي خلاصات نباتية غنية بالمركبات المذكورة، مشتقة من الإيبولاميد، يتم الحصول عليها من خلال عملية إنتاج فريدة، لها أيضًا نشاط مثبط للمناعة.

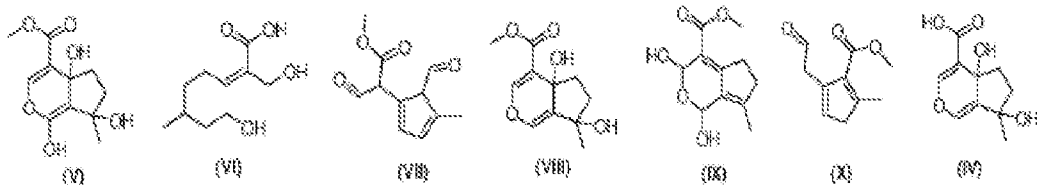
ويتمثل، بالتالي، أحد أهداف الاختراع الحالي في مشتقات الإيبولاميد التي تشتمل على مركبات لها الصيغة العامة التالية:

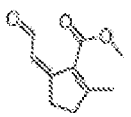


(III) ، (II) ، (I)

حيث R يناظر H، OH، OGlyc (جليكوسيد)؛ R1، 'R1، "R1 يناظرون H، OH؛ R2 يناظر H، COOH، COOCH3، CH3، CHO؛ R3 يناظر H، OH، CH3؛ R4، 'R4 يناظران H، OH، CH2OH، CH3؛ R5، 'R5 يناظران H، CH3، COOCH3، CHO، CH2OH؛ R6 يناظر CHO، COOH، COOCH3؛ R7 يناظر H، CH3؛ R8، 'R8، "R8 يناظرون CHO، CH3، CH2OH، COOH والروابط المتقطعة تمثل روابط أحادية (C–C) أو مزدوجة (C=C) بين الكربونات (تصل إلى رابطتين مزدوجتين لكل بنية).

وفي نموذج مفضل، قد يتم اختيار مركب مفضل واحد على الأقل وفقًا للاختراع الحالي من المجموعة التي تتكون من البنيات التالية:





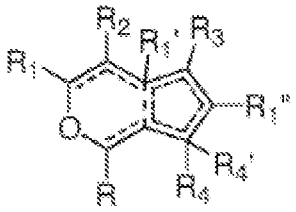
.

وفي هذا النموذج المفضل، يشتمل المركب ذو الصيغة العامة (I) على المركبات ذات الصيغة (IV) و(V) و(VIII) و(IX) ويشتمل المركب ذو الصيغة العامة (II) على المركب ذي الصيغة (VII) و(X) و(XI) ويشتمل المركب ذو الصيغة العامة (III) على المركب ذي الصيغة (VI).

ويتمثل أيضًا أحد أهداف الاختراع الحالي في طريقة لعلاج الاضطرابات المناعية، تشتمل على إعطاء مريض مركب له الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III)، بكمية كافية لتوفير تأثير مثبط للمناعة. وفي نموذج مفضل، تكون طريقة العلاج مخصصة لعلاج البهاق.

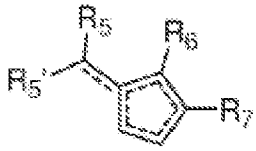
ويمكننا، بالتالي، النظر في استخدام مركب واحد على الأقل له الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III) في تركيبة لعلاج الاضطرابات المناعية.

وعلاوة على ذلك، يتمثل أحد أهداف الاختراع الحالي في تركيبة صيدلانية لعلاج الاضطرابات المناعية، تشتمل على مركب واحد على الأقل يتم اختياره من بين المجموعات التي تشتمل على المركبات ذات الصيغة العامة:



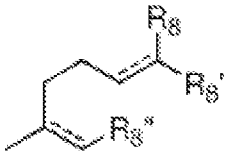
(I)

أ) ،



(II)

ب) ؛ و/أو



(III)

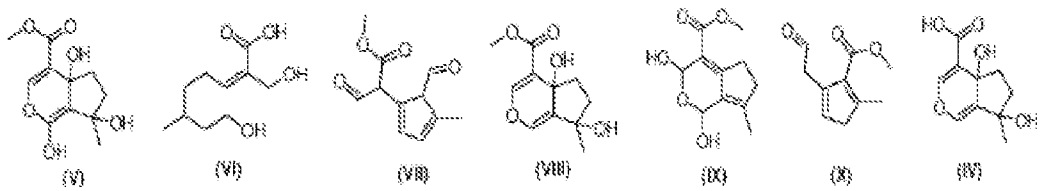
ج) ،

حيث R يناظر H، OH، OGlyc (جليكوسيد)؛ R1، 'R1، "R1 يناظرون H، OH؛ R2 يناظر H، COOH، COOCH3، CH3، CHO؛ R3 يناظر H، OH، CH3؛ R4، 'R4 يناظران H، OH، CH2OH، CH3؛ R5، 'R5 يناظران H، CH3، COOCH3، CHO، CH2OH؛ R6 يناظر CHO، COOH، COOCH3؛ R7 يناظر H، CH3؛ R8، 'R8، "R8 يناظرون CHO، CH3، CH2OH، COOH والروابط المتقطعة تمثل روابط أحادية (C–C) أو مزدوجة (C=C) بين الكربونات (تصل إلى رابطتين مزدوجتين لكل بنية)؛ و

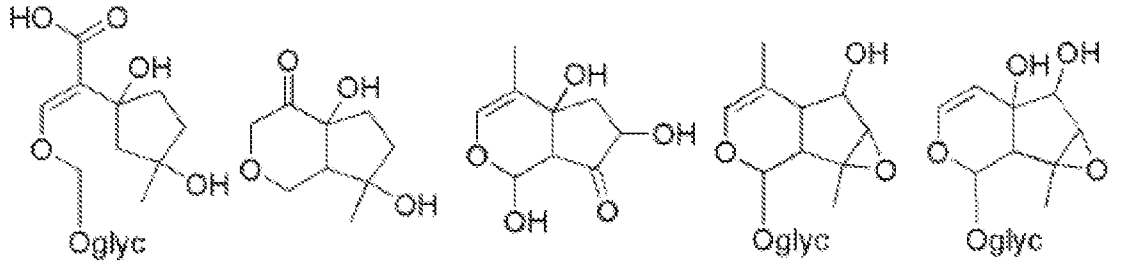
د) مادة ناقلة مقبولة صيدلانيًا.

وفي نموذج اختياري، تشتمل التركيبة وفقًا للاختراع الحالي أيضًا على مركب الإيبولاميد.

وفي نموذج اختياري، قد تشتمل التركيبة وفقًا للاختراع الحالي أيضًا على واحد على الأقل من المركبات التالية:



(V) (VI) (VII) (VIII) (IX) (X) (XI)



(XVI) (XV) (XIV) (XIII) (XII)

.

وبالإضافة إلى ذلك، يصف الاختراع الحالي العملية لإنتاج المركبات ذات الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III)، تشتمل على خطوة تعريض مركب إيبولاميد واحد على الأقل إلى خطوة تسخين واحدة على الأقل عند درجات حرارة مرتفعة، في وجود مذيب مناسب واحد على الأقل لفترة كافية للحصول على المركبات ذات الصيغ العامة (I) و/أو (II) و/أو (III).

وفي نموذج مفضل، تشتمل درجات الحرارة المرتفعة وفقًا للاختراع الحالي على درجات حرارة أعلى من 35° مئوية، ويفضل بدرجة أكبر بين 35° مئوية و165° مئوية.

وفي نموذج مفضل، تشتمل العملية لإنتاج المركبات ذات الصيغة العامة (I)، و/أو (II)، و/أو (III) على تعريض مركب إيبولاميد واحد على الأقل إلى خطوة تحلل مائي و/أو تحلل بالمذيب واحدة على الأقل. وبصورة أكثر مثالية، يتم تعريض مركب إيبولاميد واحد على الأقل إلى خطوة تحلل مائي حمضي. وبصورة اختيارية، يتم تعريض مركب إيبولاميد واحد على الأقل إلى خطوة تحلل مائي قلوي/قاعدي.

وكما ذكرنا سابقًا، فقد تحققنا من أن الإيبولاميد المعزول لا يُظهِر نشاطًا مثبطًا للمناعة. وعلى الجانب الآخر، فإن مجموعات معينة من المركبات المشتقة من الإيبولاميد بها مثل هذا النشاط. وفي الوقت ذاته، حددنا أيضًا مزايا الحصول على الأدوية العشبية لعلاج الأمراض، لأن أنظمة إنتاج المركبات هذه تسمح بسلسلة من التفاعلات الإنتاجية بين مكونات النبات والمركبات النشطة، غالبًا ما تكون بشكل تآزري. وبالتالي، للحصول بصورة إضافية على دواء عشبي يشتمل على مثل هذه المركبات النشطة، فقد قمنا بتطوير عملية إنتاج فريدة تسمح بالحصول على خلاصة غنية بالمركبات المعنية. ووفقًا للوصف الوارد أدناه، تشتمل عملية إنتاج الخلاصة وفقًا للاختراع الحالي على خطوات فريدة تؤدي إلى خلاصات غنية بمشتقات الإيبولاميد بها نشاط مثبط للمناعة. وقد تحققنا من صلة الاختيار المسبق للكتل الحيوية النباتية المدخلة التي تحتوي على ما بين 2.5% و3.5% من الإيبولاميد، مما ينتج عنه خلاصة غنية بالإيبولاميد ومركبات مشتقة من الإيبولاميد من حوالي 1% إلى حوالي 20%، ويُفضَّل من حوالي 8.5% إلى حوالي 11.5% من محتوى الإيبولاميد والمشتقات.

وكما تم عرضه مسبقًا، سيتم استخدام الكتلة الحيوية النباتية التي تحتوي على هذا المركب كمادة بدء لعملية إنتاج الخلاصة. وفقط مع عملية الإنتاج وفقًا للاختراع الحالي يمكن الحصول على خلاصة غنية بمركبات محددة مشتقة من الإيبولاميد. وتعرض هذه الخلاصة الغنية، علاوة على ذلك، نشاطًا مثبطًا للمناعة.

ويتمثل، بالتالي، هدف إضافي للاختراع الحالي في عملية لإنتاج خلاصة غنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد، تشتمل بالأساس على الخطوات التالية:

أ) اختيار كتلة حيوية نباتية مدخلة مع محتوى إيبولاميد يتراوح بين 2.5% و3.5% تم الحصول عليه من النباتات من جنس البركل؛

ب) إخضاع الكتلة الحيوية المختارة من أ) إلى تجفيف بالفرن عند درجة حرارة تتراوح بين 40 إلى 80° مئوية، حتى الحصول على استقرار الرطوبة بين 10 إلى 12%؛

ج) طحن الكتلة الحيوية النباتية؛

د) إجراء استخلاص الكتلة الحيوية النباتية من خلال الخطوات التالية:

i. تسخين الكتلة الحيوية النباتية عند درجة حرارة تتراوح بين 70 إلى 100° مئوية، مع التحريك المستمر؛

ii. تعطين الكتلة الحيوية النباتية في درجة حرارة الغرفة؛

iii. تسخين الكتلة الحيوية النباتية مع درجة حرارة تتراوح بين 70 إلى 100° مئوية.

وفي نموذج مفضل، تشتمل عملية الإنتاج وفقًا للاختراع الحالي على الخطوات التالية:

iv. ترشيح وتركيز الخلاصة؛

v. التجفيف في مجفف بالرش، خلال 1 إلى 60 ثانية، مع درجة حرارة مدخل تتراوح بين 155 و165° مئوية ودرجة حرارة مخرج تتراوح بين 85 إلى 95° مئوية، مقترن بمزيل رطوبة.

وفي نموذج مفضل، تكون عملية الاستخلاص وفقًا للاختراع الحالي عبارة عن عملية مائية أو مائية كحولية، ويفضل بدرجة أكبر عملية مائية.

لذلك، فإن عملية الإنتاج وفقًا للاختراع الحالي تسمح بالحصول على خلاصة عيارية غنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد، يفضل بإنتاجية تبلغ حوالي 8% إلى حوالي 10%.

ويتمثل، بالتالي، هدف إضافي للاختراع الحالي في الخلاصة الغنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد يتم الحصول عليها بواسطة الإجراء المذكور أعلاه. وتشتمل الخلاصة العيارية الغنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد وفقًا للاختراع الحالي، بصورة مفضلة، على المركبات ذات الصيغة (I) و/أو (II) و/أو (III).

وتشتمل الكتلة الحيوية النباتية وفقًا للاختراع الحالي على جميع أجزاء النباتات من جنس البركل. وبصورة مفضلة، تشتمل الكتلة الحيوية النباتية على الأجزاء الهوائية من النباتات 100، ويفضل بدرجة أكبر، الأوراق.

وفي نموذج مفضل، تشتمل الكتلة الحيوية النباتية المدخلة على كتلة حيوية نباتية واحدة على الأقل مع محتوى موحد من الإيبولاميد يتراوح بين 2.5% و3.5%. وفي نموذج اختياري، تشتمل الكتلة الحيوية النباتية المدخلة على أكثر من كتلة حيوية نباتية، حيث تحتوي الكتلة الحيوية النباتية المختلفة

على محتويات مختلفة من الإيبولاميد بشكل مستقل، لكنها تحقق معًا محتوىً موحدًا من الإيبولاميد (يتراوح بين 2.5% و3.5%).

وفي نموذج مفضل آخر، يمكن استخدام المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة كمعامل للتنبؤ بالمحتوى النظري للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة التي يتم الحصول عليها. ويمكن تحقيق هذا التنبؤ بواسطة طريقة تشتمل على خطوة تطبيق المعادلة I على بعض المعاملات التي يتم الحصول عليها تجريبيًا لإيجاد النسب المثالية من الإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة، والتي تُظهِر بصورة مفضلة محتوى الإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة من 8.5% إلى 11.5% من. المعادلة I يتم تحديدها أدناه:

% المحتوى النظري للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة = % المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية × DER / (<المحتوى الفعلي للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة/المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة>) ± الانحراف المعياري (المعادلة I).

وبهذه الطريقة، يمكن التنبؤ بالمحتوى النظري للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة من المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة. وبصورة مفضلة، تتراوح النسبة بين المحتوى الفعلي للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة/محتوى الإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة بين حوالي 3.0 وحوالي 3.5.

وفي نموذج أكثر تفضيلًا، تشتمل النباتات وفقًا للاختراع الحالي على Stachytarpheta cayennensis.

ويتمثل، بالتالي، هدف إضافي للاختراع الحالي في استخدام خلاصة عيارية غنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد، يتم الحصول عليها من نباتات من جنس البركل لتصنيع دواء به نشاط مثبط للمناعة.

ويتمثل، بالتالي، هدف إضافي للاختراع الحالي في جزء نشط واحد على الأقل من خلاصة غنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد. وبصورة مفضلة، يشتمل جزء واحد على الأقل على مركب واحد على الأقل مشتق من الإيبولاميد له الصيغة (I) و/أو (II) و/أو (III).

وفي نموذج اختياري، يشتمل الجزء النشط من الخلاصة الغنية أيضًا على الإيبولاميد.

ويتمثل، بالتالي، هدف إضافي للاختراع الحالي في استخدام جزء عياري واحد على الأقل غني بمركبات مشتقة من الإيبولاميد، يتم الحصول عليها من نباتات من جنس البركل لتصنيع دواء به نشاط مثبط للمناعة.

وأهداف الاختراع هذه وغيرها سيتم إدراكها بسهولة من قبل المتمرسين في المجال ومن قبل الشركات التي لها مصالح في هذا القطاع، وسيتم وصفها بتفصيل كافٍ لإعادة إنتاجها في الوصف التالي.

<u>شرح مختصر للرسومات</u>

الشكل 1 – مخطط سير عمليات موجز يصف عملية إنتاج الخلاصة النشطة الغنية بمشتقات إيبولاميد يتم الحصول عليها من Stachytarpheta cayennensis.

الشكل 2 أ يوضح تأثير الخلاصة المائية لـ Stachytarpheta cayennensis (3 و10 و30 ميكرومولار، التركيز المعبر عنه في الإيبولاميد) والإيبولاميد المعزول (3 و10 و30 ميكرومولار) على تكاثر الخلايا التائية +CD8 المنشطة بواسطة CD28/αCD3 (أ) وإنتاج IFNγ

الشكل 2 ب يوضح تقييم تأثير تجميعة المركبات (IV إلى VIII) والمركبات المعزولة الجديدة الخمسة (IV إلى VIII) المولدة بعد التحلل المائي الحمضي للإيبولاميد (30 ميكرومولار) في نفس التجارب، وانتشار الخلايا التائية +CD8 المنشطة بواسطة CD28/αCD3 (ج) و

الشكل 2 ج يوضح إنتاج IFNγ .

الشكل 2 د يوضح استخدام تاكروليموس (0.5 ميكرومولار) كالتحكم الموجب لجميع التجارب. وتكون البيانات هي المتوسط ± الانحراف المعياري لثلاثة تكرارات.

الشكل 3 – تأثير التحلل المائي الحمضي للإيبولاميد على تكوُّن مشتقاته. المخطط الاستشرابي للإيبولاميد السليم (الأزرق)؛ الإيبولاميد تحلل بالماء عند 0.1 N HCl عند 40° مئوية لمدة ساعة واحدة (أخضر)؛ الإيبولاميد تحلل بالماء عند 0.1 N HCl عند 40° مئوية لمدة ساعتين (أحمر)؛ الإيبولاميد تحلل بالماء عند 0.1 N HCl عند 40° مئوية لمدة 5 ساعات (أرجواني). IPO = إيبولاميد.

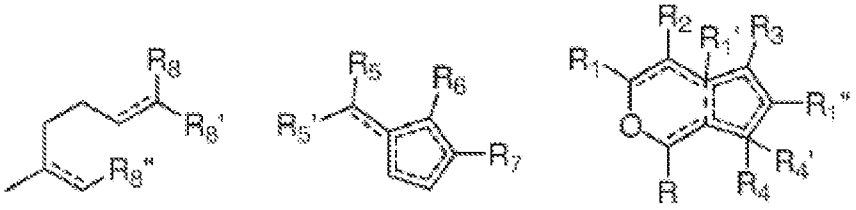
الشكل 4 – المخطط الاستشرابي لخلاصة Stachytarpheta cayennensis التي يتم الحصول عليها من عملية الإنتاج المطلوب حمايتها في هذا الطلب. يوضح الشكل واسم الإيبولاميد ومشتقاته الخاصة في أزمنة الاحتجاز: 5.5؛ 9.7؛ 12.0؛ 14.3؛ 17.3 دقيقة IPO = إيبولاميد.

الوصف التفصيلي:

الأمثلة الموضحة في هذا الطلب هي فقط لغرض تمثيل إحدى الطرق العديدة لتنفيذ الاختراع، على أي حال، دون تقييد نطاقه.

المركبات النشطة

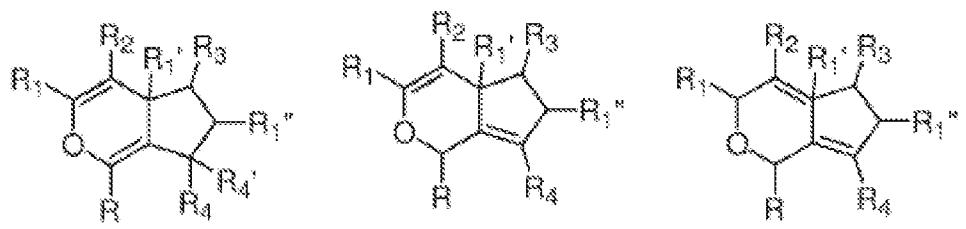
يقدم الاختراع الحالي مجموعات مركبات جديدة ومبتكرة، تشتمل على الصيغ العامة التالية:



(III) ، (II) ، (I)

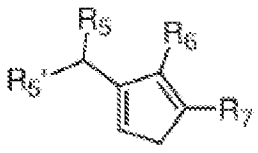
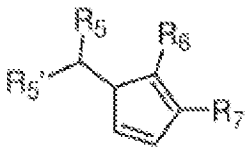
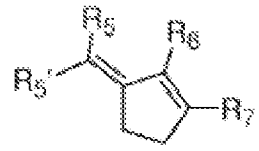
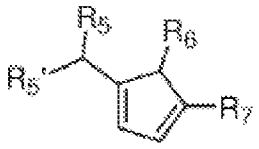
حيث R يناظر H، OH، OGlyc (جليكوسيد)؛ R1، R1'، R1" يناظرون H، OH؛ R2 يناظر H، COOH، COOCH3، CH3، CHO؛ R3 يناظر H، OH، CH3؛ R4، R4' يناظران H، OH، CH2OH، CH3؛ R5، R5' يناظران H، CH3، COOCH3، CHO، CH2OH؛ R6 يناظر CHO، COOH، COOCH3؛ R7 يناظر H، CH3؛ R8، R8'، R8" يناظرون CHO، CH3، CH2OH، COOH والروابط المتقطعة تمثل روابط أحادية (C–C) أو مزدوجة (C=C) بين الكربونات (تصل إلى رابطتين مزدوجتين لكل بنية).

المثال 1: تشتمل المركبات ذات الصيغة العامة (I) على البنيات التالية.



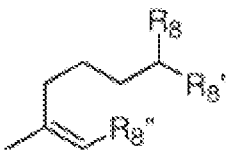
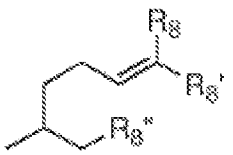
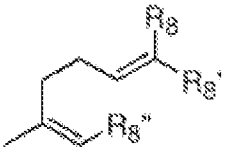
أ ب ج

المثال 2: تشتمل المركبات ذات الصيغة العامة (II) على البنيات التالية.

د هـ و ز

المثال 3: تشتمل المركبات ذات الصيغة العامة (III) على البنيات التالية.

ح ط ي

تمثل تلك البنيات المذكورة أعلاه البنيات الأساسية للبنيات الكيميائية المتضمنة في الصيغ (I) أو (II) أو (III).

الاضطرابات المناعية

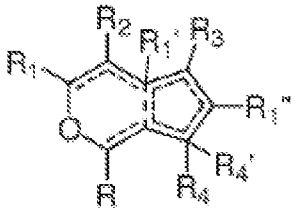
يشتمل المصطلح "الاضطرابات المناعية" وفقًا للاختراع الحالي على أي خلل في الجهاز المناعي. وعادةً يمكن أن تتميز الاضطرابات بمكونات الجهاز المناعي المتأثرة أو بمستوى نشاط الجهاز المناعي. وفي الاختراع الحالي، على نحو مفضل، تشير الاضطرابات المناعية إلى الأمراض التي تحتوي على بعض الأدلة على المناعة الذاتية. ويمكن أن نعتبر في الاختراع الحالي البهاق على أنه مختار بصورة أكثر تفضيلًا من بين الاضطرابات المناعية المحتملة.

طريقة لعلاج الاضطرابات المناعية

يصف الاختراع الحالي طريقة لعلاج الاضطرابات المناعية، تشتمل على إعطاء مريض مركب له الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III)، بكمية كافية لتوفير تأثير مثبط للمناعة. وتجدر الإشارة إلى أنه، لغرض طلب براءة الاختراع الحالي، يمكن تحقيق علاج الاضطرابات المناعية باستخدام مشتقات الإيبولاميد و/أو أجزاء و/أو خلاصات تحتوي على مشتقات الإيبولاميد، أي من هذه الأنشطة له نشاط مثبط للمناعة. وفي نموذج مفضل، تكون طريقة العلاج مخصصة لعلاج البهاق.

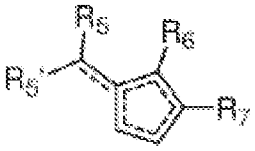
تركيبة صيدلانية تشتمل على مركبات معزولة مشتقة من الإيبولاميد.

في أحد النماذج، تشتمل التركيبة الصيدلانية وفقًا للاختراع الحالي على مشتقات إيبولاميد معزولة، تُستخدَم بمفردها أو في توليفة، لعلاج الاضطرابات المناعية، حيث تشتمل المركبات على مركب واحد على الأقل مختار من المجموعة التي تشتمل على:



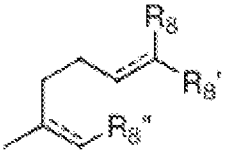
(I)

أ) ،



(II)

ب) ؛ و/أو



(III)

ج)

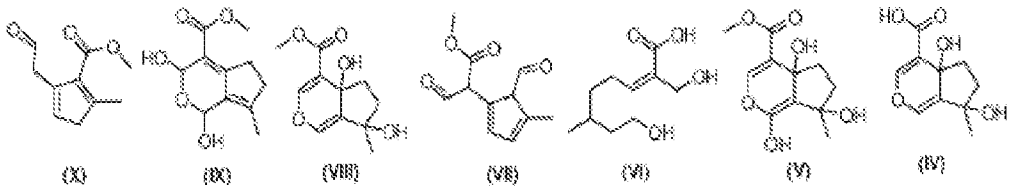
حيث R يناظر H، OH، OGlyc (جليكوسيد)؛ R1، 'R1، "R1 يناظر H، OH؛ R2 يناظر H، COOH، COOCH3، CH3، CHO؛ R3 يناظر H، OH، CH3؛ R4، 'R4 يناظران H،

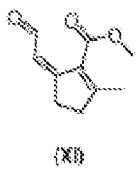
OH، CH_2OH، CH_3؛ R5، R5' يناظران H، CH_3، $COOCH_3$، CHO، CH_2OH؛ R6 يناظر CHO، COOH، $COOCH_3$؛ R7 يناظر H، CH_3؛ R8، R8'، R8" يناظرون CHO، CH_3، CH_2OH، COOH والروابط المتقطعة تمثل روابط أحادية (C–C) أو مزدوجة (C=C) بين الكربونات (تصل إلى رابطتين مزدوجتين لكل بنية)؛ و

د) مادة ناقلة مقبولة صيدلانيًا.

وفي نموذج اختياري، تشتمل التركيبة الصيدلانية المذكورة أعلاه أيضًا على مركب الإيبولاميد.

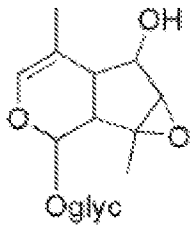
وفي نموذج مفضل، تشتمل التركيبة الصيدلانية وفقًا للاختراع الحالي على المركبات التالية:



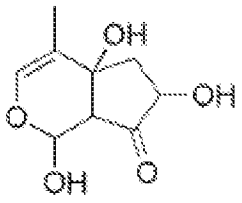


وفي هذا النموذج المفضل، يشتمل المركب ذو الصيغة العامة (I) على المركبات ذات الصيغة (IV) و(V) و(VIII) و(IX) ويشتمل المركب ذو الصيغة العامة (II) على المركب ذي الصيغة (VII) و(X) و(XI) ويشتمل المركب ذو الصيغة العامة (III) على المركب ذي الصيغة (VI).

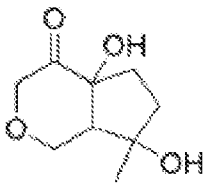
وقد تشتمل التركيبة الصيدلانية وفقًا للاختراع الحالي بصورة إضافية على المركبات التالية:



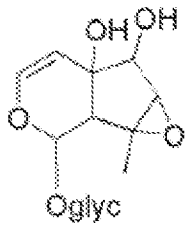
(XIII)



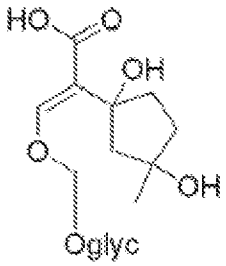
(XIV)



(XV)



(XII)



(XVI)

ومادة ناقلة مقبولة صيدلانيًا.

المادة الناقلة المقبولة صيدلانيًا.

لتنفيذ نشاطها، يجب إعطاء المركبات ذات الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III) إلى كائن حي حيواني، كائن ثديي، خاصةً الإنسان، بصورة مفضلة في صورة تركيبة صيدلانية، أي، مرتبطة بمواد ناقلة مقبولة صيدلانيًا والتي تكون مناسبة لكل طريقة إعطاء.

وتحتوي التركيبات الصيدلانية وفقًا للاختراع الحالي كمكون فعال على واحد أو أكثر من المركبات المقترحة في هذا الطلب، المرتبطة بواحدة أو أكثر من المواد الناقلة المقبولة صيدلانيًا. وعادةً ما يتم خلط المكونات الفعالة أو تخفيفها أو تغليفها بمادة ناقلة واحدة على الأقل.

وعندما تكون المادة الناقلة عبارة عن مخفف، فقد تكون في صورة صلبة أو شبه صلبة أو سائلة، تعمل كمادة حاملة أو سواغ أو وسط للمكون الفعال. لذلك، يمكن أن تكون التركيبة في صورة أقراص، حبوب، مساحيق، أكياس، معلقات، مستحلبات، محاليل، أيروسولات (في وسط صلب أو سائل)، كريمات، كبسولات صلبة أو رخوة، تحاميل، محاليل قابلة للحقن.

وفي الاختراع الحالي، يُفضل أن تُعتبر بمثابة مادة ناقلة مناسبة صيدلانيًا أي مادة مختلفة عن المركب ذي الصيغة العامة (I) أو (II) أو (III)، والتي تمت إضافتها عمدًا إليه لإنتاج صورة جرعة صيدلانية

مناسبة لطريقة إعطاء. ويتم وصف أمثلة غير مُقيِّدة للسواغات الصيدلانية المناسبة لتحضير التركيبات الصيدلانية في Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations – Vol. 1 to 6 – 2004 – Sarfaraz K. Niazi – CRC Press e Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing.

وتتمثل أمثلة غير مُقيِّدة لطرق إعطاء التركيبة التي تشتمل على المركب ذي الصيغة العامة (I) أو (II) أو (III) في الطرق الموضعية، الفموية، الوريدية، الأنفية، المستقيمية، عبر الغشاء المخاطي، عبر الأدمة.

ويجب تخطيط الجرعة العلاجية المراد توظيفها للمركبات وفقًا للاختراع الحالي وحسابها وفقًا لطريقة الإعطاء المختارة، وعمر المريض ووزنه وحالته وشدة الاضطراب المعالج. وبشكل عام، يتم إعطاء المركبات وفقًا للاختراع الحالي بجرعات فعالة علاجيًا. ويمكن استقراء الجرعات الفعالة من منحنيات الاستجابة للجرعة، المشتقة من النماذج المختبرية أو الحيوانية. وعادةً، سيقوم الطبيب بإعطاء المركب حتى تحقق جرعة مناسبة التأثير المطلوب.

عملية لإنتاج المركبات النشطة

يصف الاختراع الحالي بالتفصيل عملية إنتاج المركبات النشطة ذات الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III). وبالأساس، تشتمل عملية إنتاج المركبات المعزولة على خطوة تعريض مركب إيبولاميد واحد على الأقل لخطوة تسخين واحدة على الأقل عند درجات حرارة مرتفعة، في مذيب مناسب، لفترة كافية للحصول على المركبات المشتقة من الإيبولاميد ذات الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III).

وفي نموذج اختياري، تشتمل التركيبة وفقًا للاختراع الحالي أيضًا على مركب الإيبولاميد.

وفي نموذج مفضل، يشتمل المذيب وفقًا للاختراع الحالي على ماء.

وبالإضافة إلى ذلك، يصف الاختراع الحالي عملية إنتاج المركبات ذات الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III)، تشتمل على خطوة تعريض مركب إيبولاميد واحد على الأقل إلى خطوة تسخين عند درجات حرارة مرتفعة، في مذيب مناسب، لفترة كافية للحصول على المركبات المشتقة من الإيبولاميد ذات الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III).

وفي نموذج مفضل، يتم الحصول على تركيزات عالية من المركبات ذات الصيغة (I) و/أو (II) و/أو (III) وفقًا للاختراع الحالي من التحويل الكلي (100%) لمحتوى الإيبولاميد المستخدم في عملية الإنتاج الخاصة.

وبصورة أكثر تفضيلًا، تشتمل التركيزات العالية وفقًا للاختراع الحالي على حوالي 0.5% إلى حوالي 45% من كل مركب (IV إلى VIII) في خليط. وفي هذه الحالة، تشتمل التركيزات على حوالي 1 إلى 5% من المركب IV، يفضل 4%؛ حوالي 15 إلى حوالي 25% من المركب V، يفضل 19%؛ حوالي 1% إلى حوالي 6% من المركب VI، يفضل 3%؛ حوالي 35 % إلى حوالي 45% من المركب VII أو أيزومراته (مثل المركب X أو المركب XI)، يفضل 37%؛ حوالي 0.5% إلى حوالي 4% من المركب VIII أو أيزومراته (مثل المركب IX)، يفضل 2%.

وفي نموذج مفضل، تشتمل درجات الحرارة المرتفعة وفقًا للاختراع الحالي على درجات حرارة أعلى من 35° مئوية، ويفضل بدرجة أكبر بين 35° مئوية و165° مئوية.

وفي نموذج مفضل آخر، يشتمل المذيب وفقًا للاختراع الحالي على مذيبات مناسبة أخرى.

وفي نموذج مفضل، تشتمل عملية إنتاج المركبات النشطة المشتقة من الإيبولاميد على خطوة التحلل المائي أو التحلل بالمذيب للإيبولاميد.

وبصورة أكثر تفضيلًا، قد يكون التحلل المائي للإيبولاميد من النوع الحمضي. ومن بين الأحماض المناسبة للتحلل المائي الحمضي للإيبولاميد، يمكن ذكر حمض الهيدروكلوريك، الهيدروكلوريك، الكبريتيك، النتريك، الفسفوريك وحمض الأسيتيك، دون أي قيود محددة على أي منها. وفي نموذج مفضل، في الاختراع الحالي يتم استخدام حمض الهيدروكلوريك.

وفي نموذج اختياري، قد يكون التحلل المائي للإيبولاميد من النوع القاعدي/القلوي. ومن بين القواعد المناسبة للتحلل المائي القاعدي/القلوي للإيبولاميد، يمكن ذكر الهيدروكسيدات القلوية الفلزية، دون قيود محددة على أي منها. وفي نموذج مفضل، في الاختراع الحالي يتم استخدام هيدروكسيد الصوديوم.

وفي نموذج أكثر تفضيلًا، يتبع التحلل المائي في الوسط الحمضي تحلل مائي في وسط قاعدي/قلوي. وكمثال، يمكن أن نذكر عملية الإنتاج التي تشتمل على خطوة إخضاع مركب إيبولاميد واحد على الأقل إلى درجات حرارة مرتفعة و0.1 N (مكافئ/لتر) من حمض الهيدروكلوريك، يليها التحضين لفواصل زمنية مختلفة يمكن أن تتراوح من صفر إلى 120 دقيقة. ويتم بعد ذلك إيقاف التحلل المائي بواسطة عملية تحييد باستخدام، بصورة مفضلة، هيدروكسيد الصوديوم 0.1 N.

وفي نموذج اختياري، تشتمل عملية إنتاج المركبات ذات الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III) على خطوة تحلل مائي للإيبولاميد في وسط قاعدي، يجري تنفيذها باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم المائي 0.1 N، محفوظًا عند 40° مئوية لمدة ساعتين.

عملية إنتاج أجزاء/خلاصات نشطة غنية بمشتقات الإيبولاميد

تحقق المخترعون من أنه يمكن الحصول على مركبات نشطة معزولة معينة وفقًا للاختراع الحالي بواسطة تقنيات التصميم الجزيئي والتخليق. وفي الوقت ذاته، حددنا أيضًا مزايا الحصول على الأدوية العشبية لعلاج الأمراض، لأن أنظمة إنتاج المركبات هذه تسمح بسلسلة من التفاعلات الإنتاجية بين مكونات النبات والمركبات النشطة، غالبًا ما تكون بشكل تآزري. وبالتالي، للحصول بصورة إضافية على دواء عشبي يشتمل على مثل هذه المركبات النشطة، فقد قمنا بتطوير عملية إنتاج فريدة تسمح بالحصول على خلاصة غنية بالمركبات المعنية.

ووفقًا للوصف الوارد أدناه، تشتمل عملية إنتاج الخلاصة وفقًا للاختراع الحالي على خطوات فريدة تؤدي إلى خلاصات غنية بمشتقات الإيبولاميد بها نشاط مثبط للمناعة. وقد تحققنا من صلة الاختيار المسبق للكتل الحيوية النباتية المدخلة التي تحتوي على ما بين 2.5% و3.5% من الإيبولاميد، مما ينتج عنه خلاصة غنية بالإيبولاميد ومركبات مشتقة من الإيبولاميد من حوالي 8.5% إلى حوالي 11.5%. وكما تم عرضه مسبقًا، سيتم استخدام الكتلة الحيوية النباتية التي تحتوي على الإيبولاميد كمادة بدء لعملية إنتاج الخلاصة. وفقط مع عملية الإنتاج وفقًا للاختراع الحالي يمكن الحصول على خلاصة غنية بمركبات محددة مشتقة من الإيبولاميد. وتعرض هذه الخلاصة الغنية، علاوة على ذلك، نشاطًا مثبطًا للمناعة.

وبالتالي، يوفر الاختراع الحالي عملية لإنتاج خلاصة عيارية غنية بمشتقات الإيبولاميد من نبات من جنس البركل.

ويتمثل، بالتالي، هدف إضافي للاختراع الحالي في عملية لإنتاج خلاصة غنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد، تشتمل بالأساس على الخطوات التالية:

أ) اختيار كتلة حيوية نباتية مدخلة مع محتوى إيبولاميد يتراوح بين 2.5% و3.5% تم الحصول عليه من النباتات من جنس البركل؛

ب) إخضاع الكتلة الحيوية المختارة من أ) إلى تجفيف بالفرن عند درجة حرارة تتراوح بين 40 إلى 80° مئوية، حتى الحصول على استقرار الرطوبة بين 10 إلى 12%؛

ج) طحن الكتلة الحيوية النباتية؛

د) إجراء استخلاص الكتلة الحيوية النباتية من خلال الخطوات التالية:

i. تسخين الكتلة الحيوية النباتية عند درجة حرارة تتراوح بين 70 إلى 100° مئوية، مع التحريك المستمر؛

ii. تعطين الكتلة الحيوية النباتية في درجة حرارة الغرفة؛

iii. تسخين الكتلة الحيوية النباتية مع درجة حرارة تتراوح بين 70 إلى 100° مئوية.

وفي نموذج مفضل، تشتمل عملية الإنتاج وفقًا للاختراع الحالي على الخطوات التالية:

iv. ترشيح وتركيز الخلاصة؛

v. التجفيف في مجفف بالرش، خلال 1 إلى 60 ثانية، مع درجة حرارة مدخل تتراوح بين 155 و165° مئوية ودرجة حرارة مخرج تتراوح بين 85 إلى 95° مئوية، مقترن بمزيل رطوبة.

وفي نموذج مفضل، تكون عملية الاستخلاص وفقًا للاختراع الحالي عبارة عن عملية مائية أو مائية كحولية، ويفضل بدرجة أكبر عملية مائية.

لذلك، فإن عملية الإنتاج وفقًا للاختراع الحالي تسمح بالحصول على خلاصة عيارية غنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد، يفضل بإنتاجية تبلغ حوالي 8% إلى حوالي 10%.

ويتمثل، بالتالي، هدف إضافي للاختراع الحالي في الخلاصة الغنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد يتم الحصول عليها بواسطة الإجراء المذكور أعلاه. وتشتمل الخلاصة العيارية الغنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد وفقًا للاختراع الحالي، بصورة مفضلة، على المركبات ذات الصيغة (I) و/أو (II) و/أو (III).

وتشتمل الكتلة الحيوية النباتية وفقًا للاختراع الحالي على جميع أجزاء النباتات من جنس البركل. وبصورة مفضلة، تشتمل الكتلة الحيوية النباتية على الأجزاء الهوائية من النباتات، ويفضل بدرجة أكبر، الأوراق.

وفي نموذج مفضل، تشتمل الكتلة الحيوية النباتية المدخلة على كتلة حيوية نباتية واحدة على الأقل مع محتوى موحد من الإيبولاميد يتراوح بين 2.5% و3.5%. وفي نموذج اختياري، تشتمل الكتلة الحيوية النباتية المدخلة على أكثر من كتلة حيوية نباتية، حيث تحتوي الكتلة الحيوية النباتية المختلفة على محتويات مختلفة من الإيبولاميد بشكل مستقل، لكنها تحقق معًا محتوىً موحدًا من الإيبولاميد (يتراوح بين 2.5% و3.5%).

وفي نموذج مفضل آخر، يمكن استخدام المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة كمعامل للتنبؤ بالمحتوى النظري للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة التي يتم الحصول عليها. ويمكن تحقيق هذا التنبؤ بواسطة طريقة تشتمل على خطوة تطبيق المعادلة I على بعض المعاملات التي يتم الحصول عليها تجريبيًا لإيجاد النسب المثالية من الإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة، والتي تُظهِر بصورة مفضلة محتوى الإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة من 8.5% إلى 11.5% من. المعادلة I يتم تحديدها أدناه:

% المحتوى النظري للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة = % المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية × DER / (<المحتوى الفعلي للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة/المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة>) ± الانحراف المعياري (المعادلة I).

وبهذه الطريقة، يمكن التنبؤ بالمحتوى النظري للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة من المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة. وبصورة مفضلة، تتراوح النسبة بين المحتوى الفعلي للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة/محتوى الإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة بين حوالي 3.0 وحوالي 3.5.

ويطلب أيضًا الاختراع الحالي حماية خلاصات عيارية غنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد من نباتات من جنس البركل يتم الحصول عليها من عملية الإنتاج الموصوفة أعلاه.

وفي نموذج أكثر تفضيلًا، تشتمل النباتات وفقًا للاختراع الحالي على Stachytarpheta cayennensis.

ويتم بصورة مفضلة الحصول على الخلاصات العيارية من النباتات من جنس البركل بواسطة عملية الإنتاج الموصوفة أعلاه مما ينتج عنه خلاصة غنية بالإيبولاميد ومركبات مشتقة من الإيبولاميد من حوالي 1% إلى حوالي 20%، ويُفضَّل من حوالي 8.5% إلى حوالي 11.5% من محتوى الإيبولاميد والمشتقات.

ويتمثل، بالتالي، هدف إضافي للاختراع الحالي في استخدام خلاصات عيارية من النباتات من جنس البركل تحتوي على مركبات مشتقة من الإيبولاميد لتصنيع دواء ذي نشاط مثبط للمناعة. وبشكل أكثر تحديدًا، خلاصات عيارية من النباتات من جنس البركل تحتوي على مركبات مشتقة من الإيبولاميد لها الصيغة العامة (I) و/أو (II) و/أو (III) لتصنيع دواء ذي نشاط مثبط للمناعة.

ويتمثل، بالتالي، هدف إضافي للاختراع الحالي في جزء نشط واحد على الأقل من خلاصة غنية بمركبات مشتقة من الإيبولاميد. وبصورة مفضلة، يشتمل جزء واحد على الأقل على مركب واحد على الأقل مشتق من الإيبولاميد له الصيغة (I) و/أو (II) و/أو (III).

وفي نموذج اختياري، يشتمل الجزء النشط من الخلاصة الغنية أيضًا على الإيبولاميد.

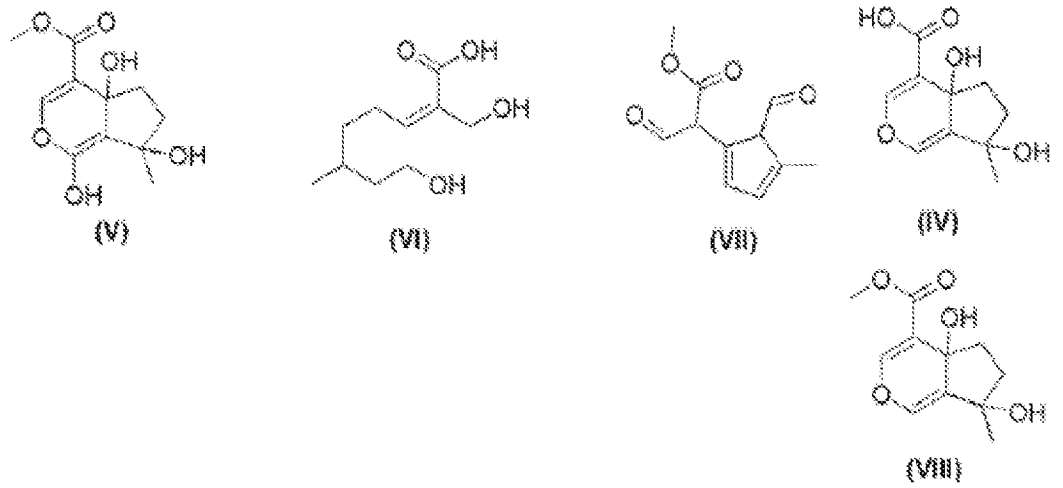
ويتمثل، بالتالي، هدف إضافي للاختراع الحالي في استخدام جزء عياري واحد على الأقل غني بمركبات مشتقة من الإيبولاميد، يتم الحصول عليها من نباتات من جنس البركل لتصنيع دواء به نشاط مثبط للمناعة.

الأمثلة – النموذج المفضل

الأمثلة الموصوفة في الجزء التجريبي هي فقط لغرض تمثيل إحدى الطرق العديدة لتنفيذ الاختراع، على أي حال، دون تقييد نطاقه.

عملية إنتاج وتحديد المركبات النشطة

يتم الحصول على المركبات المعزولة وفقًا للاختراع الحالي عن طريق تعريض مركب الإيبولاميد إلى 0.1 N حمض الهيدروكلوريك، عند 40° مئوية و100° مئوية، لمدة ساعة واحدة وساعتين و5 ساعات. ويوضح الشكل 3 الحالة عند 40° مئوية. ومن هذه التجربة، تمكنا من ملاحظة منتجات عديدة من هذا التحلل المائي وتحديد، بناءً على المخططات الاستشرابية، عدة مشتقات من الإيبولاميد، مثل، على سبيل المثال، البنيات الموصوفة أدناه، وفقًا لما هو موضح في الشكل 3.



وبدلًا من ذلك، يمكن إجراء التحلل المائي عن طريق تغيير تركيز حمض الهيدروكلوريك بين 0.1 إلى 1 N وقد تتراوح درجة الحرارة التجريبية بين 35° مئوية و165° مئوية. وبالإضافة إلى ذلك، قد يتراوح زمن التحلل المائي بين دقيقة واحدة و24 ساعة لتسهيل تكوين تركيزات أعلى لمشتقات إيبولاميد معينة.

عملية للحصول على الخلاصة

وفقًا للاختراع الحالي، اشتملت العملية للحصول على خلاصة مائية من Stachytarpheta cayennensis غنية بمشتقات الإيبولاميد بالأساس على خطوات إنتاج خلاصة عيارية موضحة

في مخطط سير العمليات وفقًا للشكل 1 للحصول على مادة لتطوير البحوث قبل السريرية في علم المناعة.

في البداية، تم إخضاع البذور المختارة بصورة مفضلة بواسطة التنميط الجيني لـ Stachytarpheta cayennensis لعملية بذر لمدة شهرين في بيئة يتم مقننة فيما يتعلق بدرجة الحرارة والرطوبة والضوء. وتم إجراء البذر في صواني بوليسترين متمددة، مملوءة بالركيزة، وتم حفظها في هذه البيئة المحمية مع الري المقنن. وبدأت الشتلات تظهر في 10 إلى 15 يومًا. وبقيت الصواني في هذه الظروف حتى وصلت الشتلات إلى الحجم والظروف المثالية للزراعة الدائمة.

وتمت زراعة الشتلات ذات الحجم التقريبي من 5 إلى 8 سم ارتفاع مع 2 إلى 3 أزواج من الأوراق المُحدِّدة في موقع النمو، والذي تضمن بصورة مفضلة متوسط درجة حرارة سنوي يبلغ 30° مئوية، متوسط رطوبة نسبية سنوي أقل من 55%، والذي تضمنت فيه التربة على سبيل التفضيل، لا الحصر، نتائج تحليلات تربة كيميائية وفيزيائية محددة، على سبيل المثال، الحموضة والكالسيوم والنيتروجين واستخدام التسميد العضوي في جميع المناطق.

وبعد زراعة الشتلات، تم إجراء الحصاد الأول بعد 6 أشهر، وإعادة النمو الآخر كل 4 أشهر، مما يضمن بالتالي دورة حياة مُحسَّنة للشجيرة بهدف زيادة محتوى الإيبولاميد إلى الحد الأقصى في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة.

وبعد الزراعة، تم تثبيت الكتلة الحيوية النباتية من خلال عملية تجفيف صوبة، في ظروف محددة من درجة الحرارة والرطوبة. وتم تجفيف النباتات في مجففات مع مبادل حراري، وإمرار الهواء الجبري، ودرجة حرارة تتراوح بين 50 إلى 70° مئوية، يفضل 60° مئوية. وتكون التجفيف من مرور الهواء الساخن خلال النباتات، مما يزيل الرطوبة، حتى تم تثبيت الكتلة الحيوية النباتية مع رطوبة تتراوح بين 10 إلى 12%. وفي نموذج مفضل، يحدث زمن التجفيف من 8 إلى 20 ساعة.

ووفقًا لما هو موضح في الشكل 1، تم تعريض الكتلة الحيوية النباتية لعملية الطحن بواسطة كسارة مطرقية بسرعة 1800 دورة في الدقيقة ومنخل سعته 19 ملم، للحصول على إنتاجية تتراوح من 50 إلى 150 كجم/ساعة في درجة حرارة الغرفة. وبعد الطحن، تم إخضاع الكتلة الحيوية النباتية إلى استخلاص مائي عند درجة حرارة تتراوح بين 80 إلى 90° مئوية، مع التحريك المستمر لمدة 15

دقيقة. ويجب أن تكون كمية المحلول الاستخلاصي 10 أضعاف كمية الكتلة الحيوية النباتية المستخدمة، بما يضمن الاستخلاص الشامل للمادة المقصودة في الكتلة الحيوية النباتية.

وبعد الخطوة السابقة، تم تعريض المادة إلى عملية التعطين لمدة 10 ساعات في درجة حرارة الغرفة. وبعد ذلك، تم تسخين المادة مرة أخرى عند 80 إلى 90° مئوية لمدة 15 دقيقة.

وتم ترشيح المادة على مرشح دوار بشبكة بوليستر بسعة 40 ميكرومتر. وبعد خطوة الترشيح 400، تم تركيز المادة على مبخر "برناوير" و/أو مبخر ذي غشاء هابط إلى حوالي 30% من إجمالي المواد الصلبة.

وتم إخضاع منتج هذه الخطوة إلى التجفيف في مجفف بالرش، مع درجة حرارة مدخل تتراوح بين 155 إلى 165° مئوية ودرجة حرارة مخرج تتراوح بين 85 إلى 95° مئوية مقترن بمزيل رطوبة، يفضل من النوع براي إير، خلال 20 إلى 40 ثانية، بهدف الحصول على أقل محتوى ممكن من الرطوبة المتبقية (الجدول 1). وتحسن هذه العملية بدرجة كبيرة جودة الخلاصة الغنية، حيث أن الرطوبة المتبقية في المادة توفّق في البداية استقرار المكونات المعنية، خلال مدة صلاحية الخلاصة/المشتق النباتي. وأدت هذه العملية الاستخلاصية إلى نسبة 10 إلى 12: 1 وإنتاجية تتراوح بين 8 إلى 10%.

الجدول 1 – محتوى الرطوبة في الخلاصة بعد التجفيف فقط وبعد التجفيف مع المرطب

محتوى الرطوبة في الخلاصة بعد التجفيف مع الانحراف المعياري	محتوى الرطوبة في الخلاصة بعد التجفيف مع الانحراف المعياري + مزيل الرطوبة
%4.61	%1.77

ضمنت العملية الاستخلاصية الموصوفة أعلاه الاستخلاص الشامل للإيبولاميد لضمان النشاط المثبط للمناعة للخلاصة بسبب وجود مشتقات الإيبولاميد المتولدة في العملية. وبالتالي، كان من الضروري وضع ضوابط العملية للكتلة الحيوية النباتية المدخلة، لذلك تراوح المحتوى الفعلي للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة بين 8.5 و11.5%، على النحو التالي في الجدول 2. ويضمن التحكم في الإيبولاميد

في الكتلة الحيوية النباتية وجود مشتقات الإيبولاميد مع نشاط مثبط للمناعة في الخلاصة، متولد بواسطة العملية الموصوفة في هذا الطلب.

الجدول 2 – محتوى الإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية وفي الخلاصة.

المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة	المحتوى النظري للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة	المحتوى الفعلي للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصةa	اختيار الكتلة الحيوية النباتية المدخلة
%1.57	%5.23 (6.02 – 4.44)	%4.47	غير مختار
%2.20	%7.33 (8.43 – 6.23)	%7.62	غير مختار
%3.00	%10 (11.5- 8.5)	%10.80	مختار
%3.30	%11 (12.65 – 9.35)	%11.20	مختار
%3.07	%10.2 (11.73 – 8.67)	%8.90	مختار
%3.65	%12.2 (14.03 -10.37)	%12.40	غير مختار

aيوضح الاتفاق بين المحتويات النظرية والفعلية للإيبولاميد ومشتقاته في الخلاصة مدى قابلية تطبيق المعادلة ا.

ومع هذا، كان من الممكن تحديد طريقة للتنبؤ بالمحتوى النظري للإيبولاميد ومشتقاته في الخلاصة النشطة الغنية. ولهذا الغرض، تم استخدام معادلة لإظهار المحتوى الذي سيتم الحصول عليه بواسطة عملية الاستخلاص (النظري) من المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية (المعادلة ا).

% المحتوى النظري للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة = % المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية × DER / (<المحتوى الفعلي للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة/المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة>) ± الانحراف المعياري (المعادلة ا).

في المعادلة الموصوفة أعلاه، يمكن فهم DER على أنه مقدار الكتلة الحيوية النباتية المطلوب للحصول على 1 كيلو من الخلاصة الأصلية. وتتراوح النسبة بين المحتوى الفعلي للإيبولاميد والمشتقات على الخلاصة/محتوى الإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة، بصورة مفضلة، بين حوالي 3.0 وحوالي 3.5.

وبالتالي، بطريقة استباقية، باستخدام المعادلة المذكورة أعلاه، يمكن اختيار فقط الكتلة الحيوية النباتية (التي يتم الحصول على محتوى الإيبولاميد الخاص بها بواسطة طرق تحليلية، مثل HPLC) والتي تُظهِر محتوىً نظريًا كافيًا من الإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة يتراوح بين 8.5 و11.5% وتجاهل تلك التي لن تُظهِر هذا النطاق. وبطريقة جديدة ومبتكرة، تم التحقق في الاختراع الحالي من أن العلاقة بين المحتوى الفعلي للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة ومحتوى الإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة سيتراوح، بصورة مفضلة، بين 3.0 و3.5.

واشتمل تحليل HPLC على خطوات تحضير محاليل ومعايير عينات، وشطفها، على النحو التالي:

1. تحضير المحاليل

1.1 – محلول حمض الفورميك 0.1% (الطور المتحرك أ): في قارورة حجمية بسعة 1000 مليلتر تحتوي على حوالي 800 مليلتر من الماء فائق النقاء، تمت إضافة 1 مليلتر من حمض الفورميك. وتم ملء حجم القارورة بماء فائق النقاء وجيد التجانس.

1.2 – محلول مخفف حمض الفورميك: الميثانول (1: 1): في دورق، تم خلط 50 مليلتر من الـ 0.1% من محلول حمض الفورميك مع 50 مليلتر من الميثانول.

2. تحضير العينة:

المادة الخام (العشبية): تم وزن 1.0 جرام من الأعشاب المطحونة 200 ونقلها إلى قارورة إرلنماير كهرمانية بسعة 250 مليلتر أو مغطاة برقائق الألومنيوم. تمت إضافة 50 مليلتر من الماء المقطر واستخلاصها تحت الارتداد عند 80° مئوية لمدة ساعتين. تم ترشيح المحلول بالورق في قارورة حجمية بسعة 50 مليلتر وملؤه بالماء المقطر. وتم ترشيحه خلال غشاء بسعة 0.22 أو 0.45 ميكرومتر إلى قنينة HPLC.

3. تحضير المعايير:

معيار الإيبولاميد 100 جزءًا في المليون: تم وزن 1.0 مجم من معيار الإيبولاميد ونقله إلى قارورة حجمية كهرمانية بسعة 10 مليلتر. تمت إضافة 5 مليلتر من المخفف، والذي تم تركه في حمام بالموجات فوق الصوتية لمدة 10 دقائق أو حتى الانحلال التام. وتم ملؤه بالمخفف ثم بعد ذلك كان التجانس. وتم إجراء تحليل الرطوبة بواسطة كارل فيشر لمعيار الإيبولاميد.

4. التحليل بواسطة HPLC:

4.1–المعلمات/المعدات

–العمود: ZORBAX SB–C18 (250 مليمتر × 4 مليمتر؛ 5 ميكرومتر)

–الطور المتحرك: (أ) 0.1% حمض الفورميك؛

(ب) ميثانول.

الجدول 3 – تدرج شطف الإيبولاميد

الزمن (بالدقائق)	(%) أ	(%) ب
صفر	80	20

27	58	42
32	58	42
32.1	صفر	100
36	صفر	100
36.1	80	20
45	80	20

- معدل التدفق: 1.0 مليلتر/ دقيقة

- الكشف: 254 نانومتر.

- زمن التحليل: 45 دقيقة

- حجم الحقن: 30 ميكرولتر

4.2 - حساب محتوى الإيبولاميد

محتوى الإيبولاميد (%) = العينة A × المعيار M × المعيار P × العينة D × (100 - المعيار U)؛

المعيار A × العينة M × المعيار D × 10000/ 100؛ حيث:

العينة A: منطقة ذروة الإيبولاميد في العينة

المعيار M: كتلة الإيبولاميد العياري بالمجم

المعيار P: نقاء المعيار بالعشرية

العينة D: تخفيف العينة بالمليلتر

المعيار A: منطقة ذروة الإيبولاميد في المعيار

العينة M: كتلة العينة المستخدمة بالجرام

المعيار D: تخفيف المعيار باللتر

المعيار U: رطوبة المعيار المحددة كميًا بواسطة كارل فيشر

10000: تحويل الوحدات

تم إعطاء نتيجة المحتوى في الخلاصة في قاعدة جافة 300، أي تم خصم الرطوبة. وبالتالي كان حساب كتلة الخلاصة كالتالي:

العينة M = الكتلة × (100 – العينة U) / 100؛

حيث:

الكتلة = كتلة الخلاصة الجافة 600 (بالجرامات)

العينة U = رطوبة الخلاصة الجافة بالنسبة المئوية، وفقًا لـ iT2-052.

5. التحليل بواسطة HPLC لمشتقات الإيبولاميد

5.1 – المعلمات/المعدات

– العمود: إكليبس XDB أجيلينت – C18 (150 × 4.6 مليمتر) 5 ميكرون

– الطور المتحرك: (أ) 0.1% دارئ حمض الفورميك؛

(ب) أسيتونتريل

الجدول 4 – تدرج شطف مشتقات الإيبولاميد

الزمن (بالدقائق)	(%) أ	(%) ب
صفر	95	5
5.00	90	10

8.00	80	20
10.00	90	10
12.00	95	5

- التدفق: 1.2 مليلتر/دقيقة

- الكشف: DAD (205-280 نانومتر)

- زمن التحليل: 15 دقيقة

- حجم الحقن: 20 ميكرولتر

5.2 حساب محتوى مشتقات الإيبولاميد

لتحليل مشتق إيبولاميد معين (Y)، قمنا بإخضاعه لمحلول بتركيز 500 محدد. ويرتبط هذا التركيز مباشرةً مع المنطقة الملاحظة في المخطط الاستشرابي. وهذه المنطقة، عند مقارنتها بإجمالي منطقة المخطط الاستشرابي، مضروبة في التركيز المحدد مسبقًا، تعطينا قيمة النسبة المئوية للمشتق المذكور (Y) في العينة، كما يمكن رؤيته أدناه:

$$\text{لمحتوى المشتق } Y \,\% = 100 \times \frac{\text{منطقة المشتق } Y}{\text{إجمالي المنطقة}} \times \text{تركيز العينة}$$

(Σ محتوى المشتقات = % إجمالي محتوى مشتقات الإيبولاميد في العينة.)

النشاط البيولوجي / المثبط للمناعة

تم إجراء تقييم النشاط البيولوجي في المختبر للخلاصة المائية لـ Stachytarpheta cayennensis وكذلك للإيبولاميد ومشتقاته على النحو الموصوف أدناه.

وتمت دراسة خلاصة Stachytarpheta cayennensis والإيبولاميد والمشتقات في نموذج مناعي تجريبي في المختبر يتضمن خلايا تائية +CD8 وIFNγ. وكان الهدف من هذه الدراسة تقييم ما إذا

كانت الخلاصة والمواد الأخرى، المعزولة أو الممزوجة، تعمل عن طريق منع تنشيط الخلايا التائية +CD8 والإفراز المترتب لـ IFNγ.

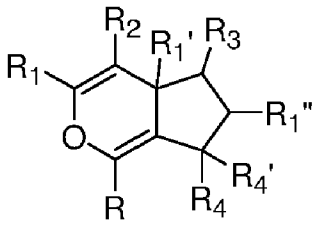
وتم عزل الخلايا وحيدة النواة في الدم المحيطي (PBMCs) من متطوعين أصحاء من طبقات الكريات البيضاء بواسطة الطرد المركزي فيكول-هيستوباك. وبعد ذلك، تم عزل الخلايا التائية البشرية +CD8 باستخدام عتيدة عزل الخلايا التائية +CD8 (ميلتيني بيوتيك،#130-096-495). وتم تحضين هذه الخلايا (3×510 خلية/عين) في RPMI + 10% من وسط FBS وتنشيطها بـ CD28/αCD3 (1 ميكروجرام/مليلتر) ومعالجتها بتركيزات مختلفة من الخلاصة المائية من Stachytarpheta cayennensis المعايرة في 10% من الإيبولاميد، والإيبولاميد المعزول، ومشتقات الإيبولاميد التي يتم الحصول عليها بواسطة التحلل المائي الحمضي لدراسة تأثيرها على منع تنشيط الخلايا التائية +CD8 وإفراز IFNγ. ولتقييم تكاثر الخلايا، تم استخدام بروموديوكسي يوريدين (BrdU)، وهو نظير ثيميدين مستخدم بصورة شائعة لمقايسات التكاثر، كواسم للتكاثر. وعلى وجه الخصوص، تم تقييم تضمين BrdU من خلال نظام إليزا بيوتراك (جنرال إلكتريك للرعاية الصحية، RPN250) حسب تعليمات المُصنِّع. واشتملت منهجية التحديد الكمي لإنترفيرون جاما على استخدام عتيدة إليزا IFNγ البشري استعد-اضبط-شغِّل (إيبيوساينس 88-7316-88) واتبعت تعليمات المُصنِّع. ووفقًا لما هو موضح في الرسم البياني الوارد في الشكل 2، فإن الخلاصة المائية من Stachytarpheta cayennensis الغنية بمشتقات الإيبولاميد منعت تنشيط الخلايا التائية +CD8 المستحث بواسطة CD28/αCD3. ولم يكن للإيبولاميد المعزول تأثير على تكاثر الخلايا التائية +CD8 المستحث بواسطة CD28/αCD3، أو إفراز IFNγ. ومع ذلك، فإن المركبات المشتقة من الإيبولاميد في خليط تم الحصول عليه من أجل التحلل المائي الحمضي الخاص به قللت بدرجة كبيرة من تكاثر الخلايا التائية +CD8 وإفراز IFNγ. وأظهرت أيضًا مشتقات الإيبولاميد المعزولة من هذا الخليط انخفاضًا دالًا إحصائيًا في تكاثر الخلايا التائية +CD8 وإفراز IFNγ. وتم استخدام تاكروليموس، وهو عامل مثبط للمناعة معروف، كمركب مرجعي وكتحكم موجب للتجربة. وكان التأثير الذي تم الحصول عليه بواسطة التاكروليموس مشابهًا للتأثير الذي تم الحصول عليه مع الإيبولاميد المتحلل بالماء في كل من تكاثر الخلايا وإنتاج IFNγ.

وبالتالي، أظهرت النتائج أن النشاط المثبط للمناعة يشتق من مشتقات الإيبولاميد وليس من الجزيء السليم. ومن المهم التأكيد على أن المركبات التي يتم الحصول عليها بواسطة الحالة التجريبية للتحلل المائي الحمضي للإيبولاميد المعزول تكون موجودة في الخلاصة المائية من Stachytarpheta cayennensis، كما هو مبين في الشكل 4. ومع ذلك، فإن وجود هذه المركبات يرجع إلى عملية الاستخلاص المستخدمة في الاختراع الحالي.

وسيدرك المتمرسون في المجال المعرفة المقدمة في هذا الطلب وقد يقومون بإعادة إنتاج الاختراع في النماذج المقدمة وفي نماذج أخرى، تقع في نطاق عناصر الحماية الملحقة.

عناصر الحماية

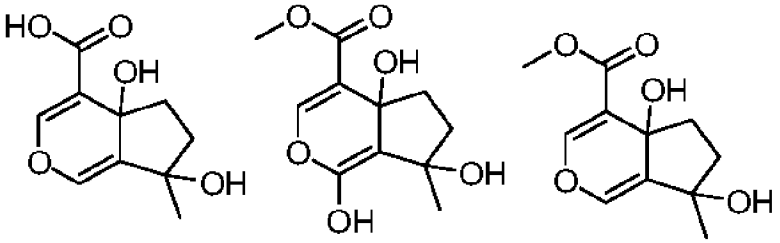
1- مركبات لها الصيغة العامة ج، حيث تكون عبارة عن مشتقات إيبولاميد:



C

حيث R يناظر H، OH، OGlyc (جليكوسيد)؛ R1، 'R1، "R1 يناظرون H، OH؛ R2 يناظر H، COOH، COOCH3، CH3، CHO؛ R3 يناظر H، OH، CH3؛ R4، 'R4 يناظران H، OH، CH2OH، CH3.

2- المركبات ذات الصيغة ج، وفقًا لعنصر الحماية 1، يتم اختيارها من:



3- المركبات ذات الصيغة ج وفقا لعنصر الحماية 1 أو 2، للاستخدام كدواء.

4- المركبات ذات الصيغة ج وفقا لعنصر الحماية 1 أو 2 للاستخدام كمثبطات مناعية في علاج الاضطرابات المناعية.

5- المركبات ذات الصيغة ج وفقا لعنصر الحماية 1 أو 2، للاستخدام في علاج البهاق.

6- تركيبة صيدلانية تشتمل على مشتقات الإيبولاميد لها الصيغة ج وفقا لعنصر الحماية 1 أو 2، وحامل مقبول صيدلانيا، وتشتمل اختياريا على الإيبولاميد.

7- عملية لإنتاج خلاصة غنية بمشتقات الإيبولاميد التي لها الصيغة ج وفقا لعنصر الحماية 1 أو 2 تشتمل على الخطوات التالية:

أ) اختيار كتلة حيوية نباتية مدخلة مع محتوى إيبولاميد يتراوح بين 2.5% و3.5% تم الحصول عليه من النباتات من جنس البركل؛

ب) إخضاع الكتلة الحيوية المختارة من أ) إلى تجفيف بالفرن عند درجة حرارة تتراوح بين 40 إلى 80° مئوية، حتى الحصول على استقرار الرطوبة بين 10 إلى 12%؛

ج) طحن الكتلة الحيوية النباتية؛

د) إجراء استخلاص الكتلة الحيوية النباتية من خلال الخطوات التالية:

i. تسخين الكتلة الحيوية النباتية عند درجة حرارة تتراوح بين 70 إلى 100° مئوية، مع التحريك المستمر؛

ii. تعطين الكتلة الحيوية النباتية في درجة حرارة الغرفة؛

iii. تسخين الكتلة الحيوية النباتية مع درجة حرارة تتراوح بين 70 إلى 100° مئوية.

8- عملية لإنتاج الخلاصة وفقًا لعنصر الحماية 7، تشتمل أيضًا على الخطوات التالية:

iv. ترشيح وتركيز الخلاصة؛

v. التجفيف في مجفف بالرش، خلال 1 إلى 60 ثانية، مع درجة حرارة مدخل تتراوح بين 155 و165° مئوية ودرجة حرارة مخرج تتراوح بين 85 إلى 95° مئوية، مقترن بمزيل رطوبة.

9- عملية لإنتاج الخلاصة وفقًا لعنصر الحماية 7، يحدث فيها تسخين الكتلة الحيوية النباتية بالخطوة د) لمدة 5 إلى 30 دقيقة.

10- عملية لإنتاج الخلاصة وفقًا لعنصر الحماية 7، يحدث فيها تسخين الكتلة الحيوية النباتية في البند i بالخطوة د) لمدة 5 إلى 15 ساعة.

11- العملية لإنتاج الخلاصة وفقًا لعنصر الحماية 7، فيها تشتمل الكتلة الحيوية النباتية المدخلة على الأجزاء الهوائية من النباتات من جنس البركل Stachytarpheta.

12- العملية لإنتاج الخلاصة وفقًا لعنصر الحماية 7، يكون فيها النبات هو Stachytarpheta cayennensis.

13- العملية لإنتاج الخلاصة وفقًا لعنصر الحماية 7، حيث تشتمل العملية على استخلاص مائي.

14- العملية لإنتاج الخلاصة وفقًا لعنصر الحماية 7، تشتمل على خطوة التنبؤ بالمحتوى النظري للإيبولاميد ومشتقاته التي لها الصيغة ج في الخلاصة من المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة باستخدام المعادلة I:

% المحتوى النظري للايبولاميد والمشتقات في الخلاصة =

% المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية × DER ± الانحراف المعياري

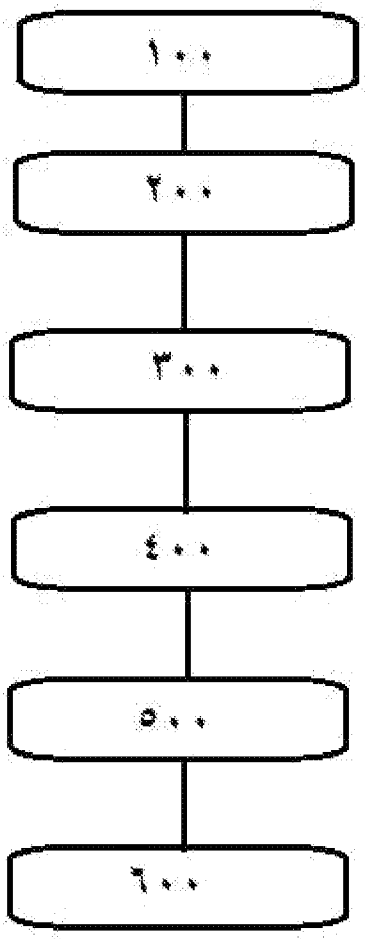
$$\left(\frac{\text{المحتوى الفعلي للإيبولاميد والمشتقات في الخلاصة}}{\text{المحتوى الفعلي للإيبولاميد في الكتلة الحيوية النباتية المدخلة}}\right)$$

15- خلاصات من نباتات من جنس البركل غنية بمركبات مشتقة من إيبولاميد لها الصيغة ج وفقاً لعنصر الحماية 1.

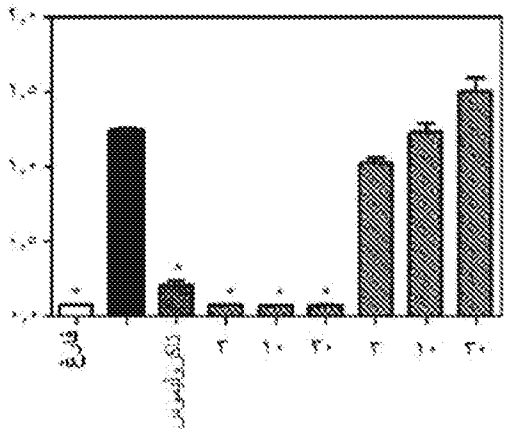
16- خلاصات من نباتات من جنس البركل غنية بمركبات مشتقة من إيبولاميد لها الصيغة ج من خلال العملية وفقًا لعنصر الحماية 7.

17- خلاصات من نباتات من جنس البركل وفقا لعنصر الحماية 15 أو 16 تحتوي على ما يتراوح من 1% إلى 20% من الإيبولاميد أو مشتقات الإيبولاميد التي لها الصيغة ج.

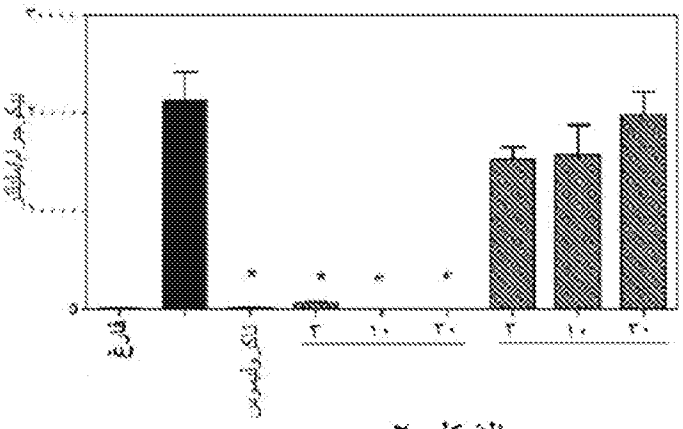
18- خلاصات من نباتات من جنس البركل وفقا لعنصر الحماية 15 أو 16 ، للاستخدام كمثبط للمناعة في علاج الاضطرابات المناعية.



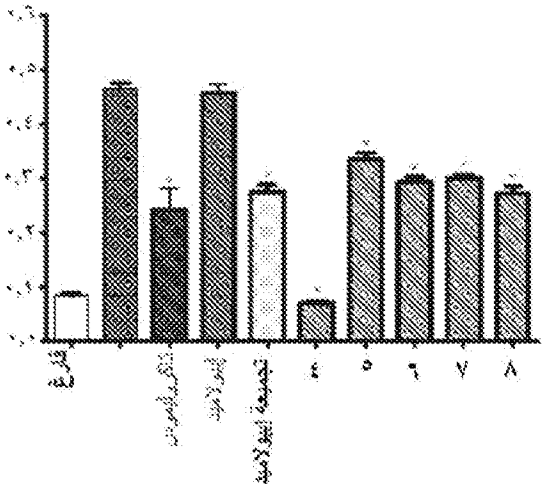
الشكل ١



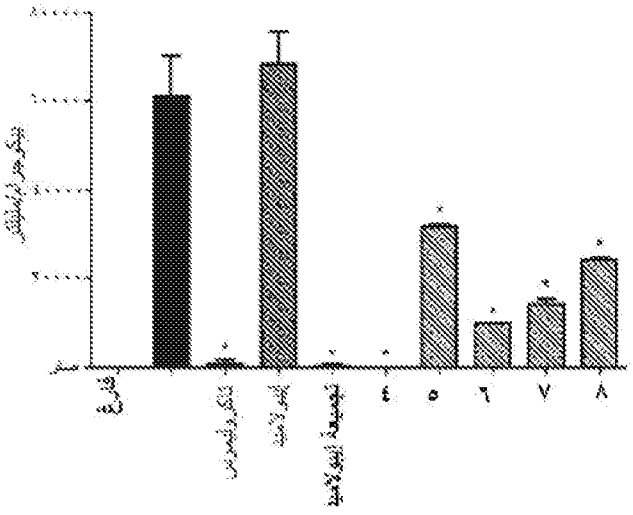
الشكل ٢ أ



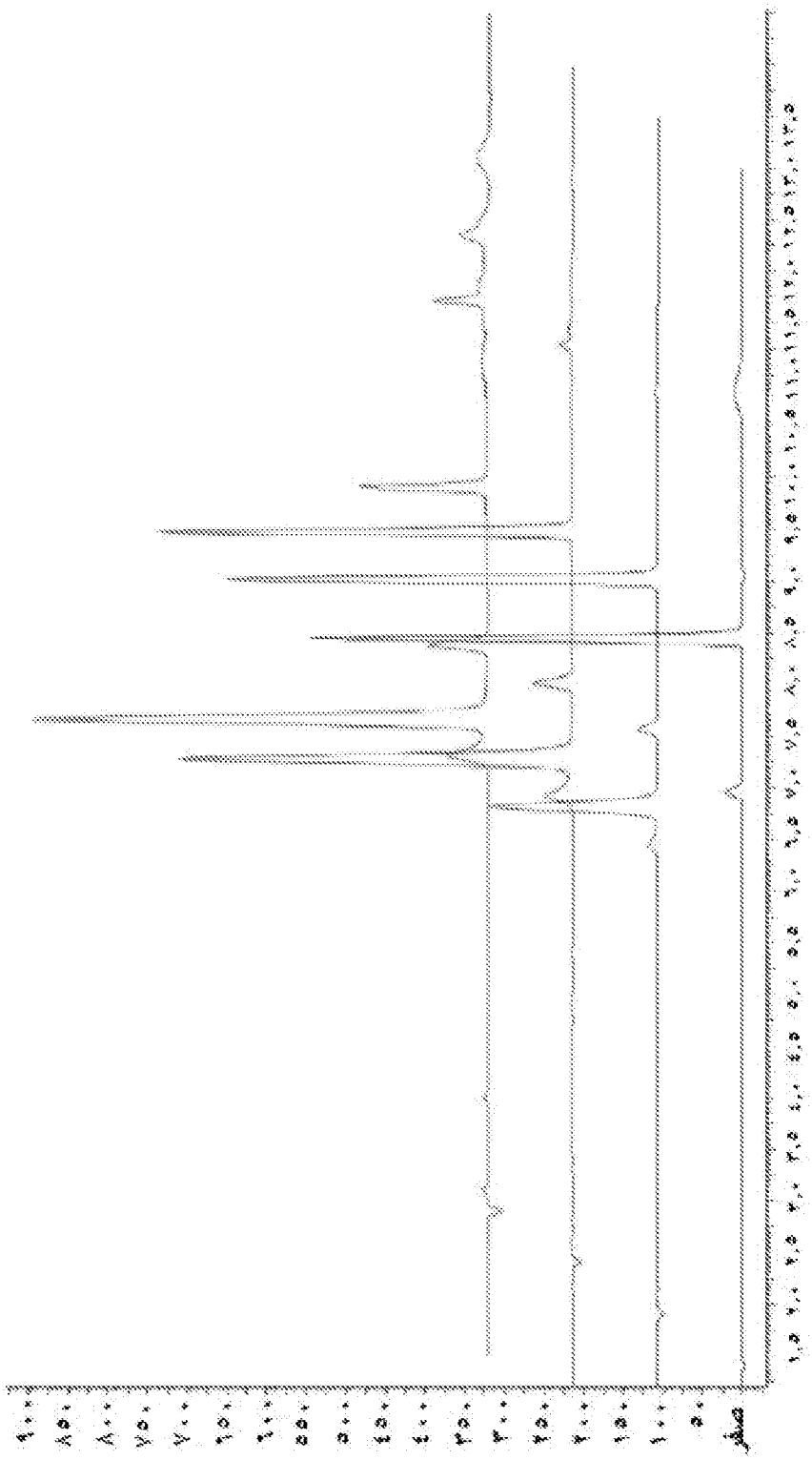
الشكل ٢ ب



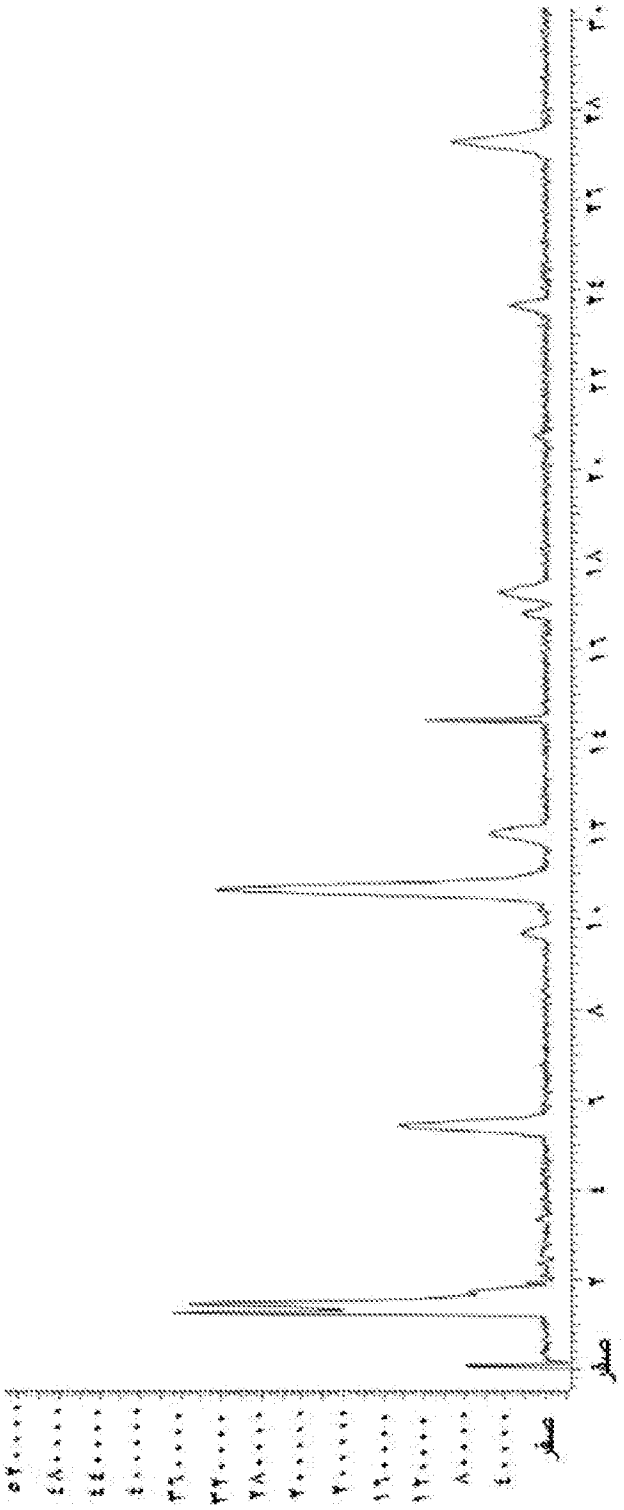
الشكل ٢ ج



الشكل ٢ د


صفر
۵۰
۱۰۰
۱۵۰
۲۰۰
۲۵۰
۳۰۰
۳۵۰
۴۰۰
۴۵۰
۵۰۰
۵۵۰
۶۰۰
۶۵۰
۷۰۰
۷۵۰
۸۰۰
۸۵۰
۹۰۰
۱٫۵ ۲٫۰ ۲٫۵ ۳٫۰ ۳٫۵ ۴٫۰ ۴٫۵ ۵٫۰ ۵٫۵ ۶٫۰ ۶٫۵ ۷٫۰ ۷٫۵ ۸٫۰ ۸٫۵ ۹٫۰ ۹٫۵ ۱۰٫۰ ۱۰٫۵ ۱۱٫۰ ۱۱٫۵ ۱۲٫۰ ۱۲٫۵ ۱۳٫۰ ۱۳٫۵

شکل ۳



شکل ۶

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشـرط تسـديد المقابل المالي السـنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سـقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية.

صادرة عن

الهيئة السعودية للملكية الفكرية

ص ب ٦٥٣١ ، الرياض ١٣٣٢١ ، المملكة العربية السعودية

SAIP@SAIP.GOV.SA