مدينة الملك عبدالعزيز
للعلوم والتقنية KACST

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

[11] رقم البراءة: ٢٤٤٢
[45] تاريخ المنح: ١٤٣١/٠٧/٠٨ هـ
الموافـــق: ٢٠١٠/٠٦/٢٠ م

[12] براءة اختراع

[72] اسم المخترع: ديفيد تشارلز ريس، باول جراهام ويات، جاري تريوارثا، ملادن فينكوفيك

[73] مالك البراءة: استيكس ثيرابيوتيكس ليمتد
عنوانه: ٤٣٦ كامبريدج ساينس بارك، ميلتون رود، كامبريدج، سي بي ٤ صفر كيو ايه، بريطانيا
جنسيته: بريطانية

[74] الوكيل: سعود محمد الشواف

[21] رقم الطلب: ٠٦٢٦٠٤٦٥

[22] تاريخ الإيداع: ١٤٢٦/١٢/٢١ هـ
الموافق: ٢٠٠٦/٠١/٢١ م

[30] بيانات الأسبقية:

US	٦٤٥٩٧٣	٢٠٠٥/٠١/٢١م

[51] التصنيف الدولي (IPC[8]):
A61K 31/4155 ، C07D 401/12

[56] المراجع:

WO	١٢٢٥٦	٢٠٠٥/٠٢/١٠م
WO	٧٧٤٢٦	٢٠٠٦/٠٧/٢٧م
EP	١٨٤٦٣٩٣	٢٠٠٧/١٠/٢٤م

اسم الفاحص: بهجت بن قاسم بابور

[54] اسم الاختراع: أملاح ناتجة عن إضافة أحماض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤- (٢، ٦- ثنائي كلورو- بنزويل أمينو)- H١- بيرازول- ٣- كربوكسيليك
4-(2,6-Dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide Acid Addition Salts

[57] الملخص: يزود الاختراع ملح بالإضافة إلى حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤- (٢، ٦- ثنائي كلورو- بنزويل أمينو)- H١- بيرازول- ٣- كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وبلورات crystals منه، حيث يتم تشكيل الملح باستخدام حمض يختار من حمض ميثان الكبريتونيك methanesulphonic acid وحمض الأسيتيك acetic acid ومخاليط منهما. ويزود الاختراع كذلك الاستخدامات الجديدة لأملاح بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤- (٢، ٦- ثنائي كلورو- بنزويل أمينو)- H١- بيرازول- ٣- كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، كما يزود عمليات لتحضير بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤- (٢، ٦- ثنائي كلورو- بنزويل أمينو)- H١- بيرازول- ٣- كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأملاح منه ويزود أيضاً مركبات وسيطة كيميائية chemical intermediates جديدة.

عدد عناصر الحماية (٧٤)

أملاح ناتجة عن إضافة أحماض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك

4-(2,6-Dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide Acid Addition Salts

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق هذا الاختراع بأملاح بالإضافة إلى حمض acid addition salts لمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأشكال بلورية crystalline forms منه، عمليات لتحضير المركب وأملاحه بالإضافة إلى حمض، مركبات وسيطة كيميائية chemical intermediates جديدة تستخدم في العمليات، واستخدمات علاجية therapeutic uses للمركب وأملاحه بالإضافة إلى حمض. ويتعلق الاختراع كذلك باستخدامات علاجية جديدة لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide ونظائر analogues منه.

ويكشف عن المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وملحه بالإضافة إلى حمض الهيدروكلوريك hydrochloric acid في طلب براءة الاختراع البريطاني الدولي السابق وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ (طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦) بصفتها مثبطات inhibitors لانزيمات كيناز معتمدة على السيكلين Cyclin Dependent Kinases (CDK kinases) وغليكوجين سينثاز كيناز-٣ Glycogen Synthase Kinas-3 (GSK3).

وتشكل انزيمات الكيناز البروتيني protein kinases عائلة كبيرة من انزيمات مرتبطة بنيوياً تكون مسؤولة عن ضبط تشكيلة واسعة من عمليات الانتقال العارض للإشارة signal

transduction processes داخل الخلية cell (انظر ما جاء عن جي. هاردي G. Hardie وإس. هانكز S. Hanks، في كتاب بعنوان The Protein Kinase Facts Book. I and II، إصدار شركة أكاديميك بريس Academic Press، مدينة سان دييغو San Diego، ولاية كاليفورنيا CA، (١٩٩٥م)). ويمكن تصنيف انزيمات الكيناز إلى عائلات وفقاً للركيزات substrates التي تُجري لها فسفرة phosphorylation (مثلاً، بروتين-تيروسين protein-tyrosine، بروتين-سيرين/ثريونين protein-serine/threonine، شحوم lipids، إلى آخره). ولقد مُيزت الأبحاث التالية بأنها تقابل بوجه عام كل عائلة من عائلات الكيناز هذه (مثلاً، انظر ما جاء عن إس. كيه. هانكز S.K. Hanks، تي. هنتر T. Hunter، في مجلة FASEB J، المجلد ٩، ص: ٥٧٦-٥٩٦ (١٩٩٥م)؛ نايتون Knighton ومعاونيه، في مجلة Science، المجلد ٢٥٣، ص: ٤٠٧-٤١٤ (١٩٩١م)؛ هيلز Hiles ومعاونيه، في مجلة Cell، المجلد ٧٠، ص: ٤١٩-٤٢٩ (١٩٩٢م)؛ كيونز Kunz ومعاونيه، في مجلة Cell، المجلد ٧٣، ص: ٥٨٥-٥٩٦ (١٩٩٣م)؛ غارسيا-بيوستوز Garcia-Bustos ومعاونيه، في مجلة EMBO J.، المجلد ١٣، ص: ٢٣٥٢-٢٣٦١ (١٩٩٤م)).

ويمكن تمييز انزيمات الكيناز البروتيني وفقاً لآليات التنظيم regulation mechanisms الخاصة بها. وتتضمن هذه الآليات، على سبيل المثال، فسفرة ذاتية autophosphorylation، فسفرة انتقالية transphosphorylation بواسطة انزيمات كيناز أخرى، تفاعلات تبادلية بين البروتينات protein-protein interactions، تفاعلات تبادلية بين البروتين والشحم protein-lipid interactions، وتفاعلات تبادلية بين البروتين ومتعدد النيوكليوتيد protein-polynucleotide interactions. وقد يتم تنظيم كيناز بروتيني مفرد بواسطة أكثر من آلية واحدة.

وتنظّم انزيمات الكيناز عمليات خلوية cell processes مختلفة، على سبيل المثال لا الحصر، التكاثر proliferation، التمايز differentiation، موت الخلايا المبرمج apoptosis، الحركية motility، الانتساخ transcription، الترجمة translation وعمليات تأشير signalling processes أخرى، بإضافة مجموعات الفوسفات phosphate groups إلى البروتينات المستهدفة target proteins. وتعمل حالات الفسفرة هذه كمبدّلات جزيئية للربط والفصل molecular on/off switches يمكنها أن تعدّل أو تنظم الوظيفة الحيوية biological function للبروتين المستهدف. وتحدث فسفرة البروتينات المستهدفة استجابةً لتشكيلة من إشارات خارج الخلية extracellular signals (هرمونات hormones، نواقل عصبية neurotransmitters، عوامل النمو والتمايز growth

and differentiation factors، إلى آخره)، أحداث دورة الخلية cell cycle، الإجهادات البيئية أو الغذائية environmental or nutritional stresses، إلى آخره. ويعمل الكيناز البروتيني الملائم في مسارات التأشير signalling pathways لتنشيط أو تثبيط فعالية (بشكل مباشر أو غير مباشر)، على سبيل المثال، انزيم أيضي metabolic enzyme، بروتين منظّم regulatory protein، مستقبلة receptor، بروتين هيكلي خلوي cytoskeletal protein، مضخة أو قناة الأيونات ion channel or pump أو عامل انتساخ transcription factor. ويكون للتأشير غير المضبوط الناتج عن قصور ضبط فسفرة البروتين دوراً في عدد من الأمراض، بما في ذلك، على سبيل المثال، الالتهاب inflammation، السرطان cancer، التحسُّسية/الربو allergy/asthma، أمراض وحالات مرضية تصيب جهاز المناعة immune system، أمراض وحالات مرضية تصيب الجهاز العصبي المركزي central nervous system، وتكوّن الأوعية angiogenesis.

انزيمات الكيناز المعتمدة على السيكلين Cyclin Dependent Kinases

ويمكن تجزئة عملية انقسام خلية حقيقة النواة eukaryotic cell division إجمالاً إلى سلسلة من أطوار متعاقبة تسمى G1، S، G2 و M. ولقد تبيّن أن التقدم الصحيح عبر الأطوار المختلفة من دورة الخلية يعتمد بشكل دقيق على التنظيم المكاني والزماني لعائلة من بروتينات تعرف بانزيمات كيناز معتمدة على السيلكين cyclin (cdks) ومجموعة متنوعة من أعضائها البروتينية المتشابهة المسماة سيكلينات cyclins. وتكون انزيمات cdks عبارة عن بروتينات كيناز سيرين-ثريونين serine-threonine kinase proteins متماثلة التركيب cdc2 (تعرف أيضاً بـ cdk1) تكون قادرة على استخدام ATP (ثلاثي فوسفات الأدينوزين adenosine triphosphate) كركيزه في فسفرة متعددات الببتيد polypeptides المتنوعة في تسلسل يعتمد على السياق. والسيكلينات cyclins هي عائلة من بروتينات تتميز بمنطقة تماثل، تحتوي على ١٠٠ حمض أميني amino acids تقريباً، تسمى "بنية السيكلين الصندوقية cyclin box" تستخدم في الارتباط ببروتينات متخصصة بالعضو cdk، وتحدد انتقائيتها.

ويؤدي تعديل مستويات التعبير expression levels، معدّلات التحلل degradation rates، ومستويات التنشيط activation levels لانزيمات cdk وسيكلينات cyclins متنوعة طوال دورة الخلية إلى التشكل الحلقي لسلسلة من متراكبات cdk/سيكلين cdk/cyclin complexes، حيث تكون انزيمات cdks فعالة انزيمياً. ويضبط تشكل هذه المتراكبات المرور عبر نقاط فحص

checkpoints متباعدة في دورة الخلية وبالتالي يجعل استمرار عملية انقسام الخلية ممكناً. ويمكن أن يؤدي الفشل في الإيفاء بمتطلبات المقاييس الكيميائية الحيوية biochemical criteria عند نقطة فحص محددة في دورة الخلية، أي، الفشل في تشكيل متراكب cdk/سيكلين cyclin مطلوب، إلى توقف دورة الخلية و/أو إلى موت الخلايا المبرمج. ويمكن أن يُعزى التكاثر الخلوي الشاذ aberrant cellular proliferation، كما يظهر في السرطان، في أحوال كثيرة إلى فقدان ضبط دورة الخلية الصحيح. ومن ثم يزود تثبيط فعالية cdk الانزيمية وسيلة تتمكن بواسطتها الخلايا المنقسمة بشكل شاذ إيقاف انقسامها أو يصبح قتل هذه الخلايا ممكناً بواسطة تلك الوسيلة. ويزود تنوع انزيمات cdks، ومتراكبات cdk، وأدوراها الهامة في حدوث دورة الخلية، طيفاً واسعاً من الأهداف العلاجية المحتملة المختارة على أساس منطق كيميائي حيوي محدد.

ويتم تنظيم التقدم من الطور G1 إلى الطور S من دورة الخلية بشكل أولي بواسطة cdk2، cdk3، cdk4 و cdk6 عن طريق الارتباط بأعضاء من سيكلينات cyclins من نوع D و E. وتبدو السيكلينات cyclins من نوع D مفيدة في جعل المرور إلى ما بعد نقطة الحصر G1 G1 restriction point ممكناً، في حين أن متراكب cdk2/سيكلين cyclin من نوع E يكون أساسياً للتحول من الطور G1 إلى الطور S. ويعتقد بأن التقدم التالي عبر الطور S والدخول في الطور G2 يتطلب متراكب cdk2/سيكلين cyclin من نوع A. ويتم تنظيم كل من الانقسام الفتيلي للخلية mitosis، والتحول من الطور G2 إلى الطور M الذي يُحدث ذلك الانقسام، بواسطة متراكبات من cdkl وسيكلينات cyclins من نوع A و B.

وخلال الطور G1 يكون بروتين ورم خلايا الشبكية البدائية Retinoblastoma protein (Rb)، والبروتينات الجيبية pocket proteins ذات الصلة مثل p130، عبارة عن ركيزات لمتراكبات cdk(2, 4, & 6)/سيكلين cyclin. ويتم تسهيل التقدم عبر الطور G1 جزئياً بواسطة الفسفرة المفرطة hyperphosphorylation، وبالتالي تثبيط فعالية، Rb و p130 بواسطة متراكبات cdk(4/6)/سيكلين cyclin من نوع D. وتؤدي الفسفرة المفرطة لـ Rb و p130 إلى إطلاق عوامل الانتساخ، مثل E2F، وبالتالي التعبير عن الجينات الضرورية للتقدم عبر الطور G1 وللدخول إلى الطور S، مثل الجين الخاص بسيكلين cyclin من نوع E. ويُسهل التعبير عن سيكلين cyclin من نوع E تشكل متراكب cdk2/سيكلين cyclin من نوع E الذي يُضخم، أو يحافظ على مستويات E2F بإجراء فسفرة إضافية لـ Rb. ويُجري متراكب cdk2/سيكلين cyclin من نوع E كذلك فسفرة للبروتينات الأخرى

الضرورية من أجل تضاعف DNA (حمض ريبي نووي منقوص الأكسجين deoxyribonucleic acid)، مثل NPAT، الذي يشارك في التخليق الحيوي biosynthesis للهستون histone. ويتم تنظيم التقدم عبر الطور G1 والتحول من الطور G1 إلى الطور S كذلك بواسطة منشط الانقسام الفتيلي mitogen المنبه بتأثير مسار Myc، الذي يغذي مسار cdk2/سيكلين cyclin من نوع E. ويرتبط cdk2 كذلك بمسار الاستجابة لتلف DNA الذي يتوسطه p53 عن طريق تنظيم p53 لمستويات p21. و p21 هو مثبط بروتيني protein inhibitor لمتراكب cdk2/سيكلين cyclin من نوع E وهكذا يكون قادراً على إعاقة، أو تأخير، التحول من الطور G1 إلى الطور S. وهكذا قد يمثل المتراكب cdk2/سيكلين cyclin من نوع E نقطة تندمج عندها المنبهات الكيميائية الحيوية الصادرة عن مسارات Rb، Myc و p53 إلى حد ما. وبناءاً على ما سبق، يمثل Cdk2 و/أو متراكب cdk2/سيكلين cyclin من نوع E أهدافاً جيدة لعلاجات تم تكييفها عند إيقاف، أو استعادة ضبط دورة الخلية في خلايا منقسمة بصورة شاذة.

ولا يكون الدور الحقيقي لِـ cdk3 في دورة الخلية واضحاً. وحتى الآن لم يتم التعرف على عضو سيكلين cyclin مشابه، ولكن تم التعرف على شكل سالب سائد من خلايا متأخرة بفعل cdk3 في الطور G1، وبهذا يقترح بأن لـ cdk3 دوراً في تنظيم التحول من الطور G1 إلى الطور S.

وبالرغم من أن معظم انزيمات cdks تشترك في تنظيم دورة الخلية يتضح أن أعضاء معينين من عائلة cdk يشتركون في عمليات كيميائية حيوية أخرى. ويتمثل هذا في cdk5 الذي يعد ضرورياً لحدوث تطور عصبوني صحيح والذي يشترك كذلك في فسفرة عدة بروتينات عصبونية neuronal proteins مثل Tau، NUDE-1، سينابسين ١ synapsin1، DARPP32 ومتراكب ميونك ١٨/سينتاكسين ١ إيه Munc 18/Syntaxin1 A complex. ويُنشّط انزيم cdk5 العصبوني عادةً بواسطة الارتباط ببروتينات p35/p39. غير أنه، يمكن إحداث خلل في تنظيم فعالية cdk5 بالارتباط بـ p25، وهو شكل معدّل مقطوع من p35. ويمكن استحثاث التحول من p35 إلى p25، وإحداث خلل لاحق في تنظيم فعالية cdk5، بفعل قلة الدموية الموضعية ischemia، إثارة السمية excitotoxicity، وببتيد نشواني من نوع β peptide β-amyloid. ونتيجة لذلك يشترك p25 في تكون أمراض الانحلال العصبي neurodegenerative diseases، مثل مرض الزهايمر Alzheimer's disease، ولذلك يكون ذا أهمية كهدف من أجل العلاجات الموجهة ضد هذه الأمراض.

ويكون انزيم cdk7 عبارة عن بروتين نووي يمتلك فعالية CAK cdc2 ويرتبط بسيكلين cyclin من نوع H. ولقد تم تعريف cdk7 بأنه مكون للمتراكب الانتساخي TFIIH الذي يمتلك فعالية حقل عند الطرف الكربوكسيلي C-terminal domain (CTD) activity لبوليمراز RNA (حمض ريبي نووي ribonucleic acid) RNA polymerase II II. ويكون هذا مرتبطاً بتنظيم انتساخ HIV-1 بواسطة مسار كيميائي حيوي يتوسطه Tat. ويرتبط cdk8 بسيكلين cyclin من نوع C ويشترك في فسفرة CTP (ثلاثي فوسفات السيتيدين cytidine triphosphate) لبوليمراز II RNA. وعلى نحو مماثل، يشترك متراكب cdk9/سيكلين cyclin من نوع T1 (متراكب P-TEFb) في ضبط استطالة بوليمراز II RNA. ويلزم PTEF-b كذلك لتنشيط انتساخ المجين HIV-1 HIV-1 genome بواسطة المنشط الانتقالي الفيروسي viral transactivator Tat Tat عن طريق تفاعله التبادلي مع سيكلين cyclin من نوع T1. ولذلك يعدُّ cdk7، cdk8، cdk9 ومتراكب P-TEFb أهدافاً محتملة من أجل علاجات مضادة للفيروسات anti-viral therapeutics.

وعلى المستوى الجزيئي يتطلب توسيط فعالية متراكب cdk/سيكلين cyclin سلسلة من حالات الفسفرة أو نزع الفسفرة المنبهة والمثبطة. وتجرى فسفرة cdk بواسطة مجموعة من انزيمات كيناز تنشيط Cdk cdk activating kinases (CAKs) و/أو انزيمات كيناز مثل weel، Mytl و Mikl. ويجرى نزع الفسفرة بواسطة انزيمات فوسفاتاز phosphatases مثل cdc25(a & c)، pp2a، أو KAP.

ويمكن تنظيم فعالية متراكب cdk/سيكلين cyclin كذلك بواسطة عائلتين من مثبطات بروتينية خلوية داخلية المنشأ endogenous cellular proteinaceous inhibitors: عائلة Kip/Cip، أو عائلة INK. وترتبط بروتينات INK بشكل خاص بـ cdk4 و cdk6. ويمثل $pl6^{ink4}$ (المعروف أيضاً بـ MTSl) جين محتمل كابت للورم تحدث عليه طفرة، أو يتم حذفه، في عدد كبير من أمراض السرطان الأولية. وتحتوي عائلة Kip/Cip بروتينات مثل $p21^{Cipl,Wafl}$، $p27^{Kipl}$ و $p57^{kip2}$. وكما نوقش سابقاً يُستحث p2l بواسطة p53 ويكون قادراً على تثبيط فعالية متراكبات cdk2/سيكلين cyclin (A/E) و cdk4/سيكلين cyclin (D3/D2/D1). وتُلاحظ مستويات منخفضة نموذجياً من التعبير عن p27 في سرطانات الثدي breast، القولون colon والبروستات prostate. وبالعكس تبين أن التعبير المفرط عن السيكلين cyclin من نوع E في الأورام الصلبة يرتبط بتشخيص مسبق

ضعيف للمريض، ويرتبط التعبير المفرط عن السيكلين cyclin من نوع D1 بأورام سرطانية مريئية oesophageal، ثديية، حرشفية squamous، ورئوية غير صغيرة الخلية non-small cell lung.

ولقد أوجزت أعلاه الأدوار المحورية لانزيمات cdks، والبروتينات المرافقة الخاصة بها، في تنسيق وتشغيل دورة الخلية في خلايا المتكاثرة. ولقد وصفت كذلك بعض المسارات الكيميائية الحيوية التي تلعب انزيمات cdks فيها دوراً رئيسياً. وبناءً على ذلك، يعد تطوير علاجات أحادية monotherapies لمعالجة الاضطرابات التكاثرية، مثل أمراض السرطان، باستخدام العلاجات التي تستهدف بشكل عام انزيمات cdks، أو انزيمات cdks خاصة، بشكل محتمل مرغوباً جداً. ويمكن كذلك استخدام مثبطات cdk في حدود الإمكان لمعالجة حالات مرضية أخرى مثل الإصابات بعدوى فيروسية viral infections، أمراض المناعة الذاتية autoimmune diseases وأمراض الانحلال العصبي، من بين أمراض أخرى. وقد تزود العلاجات التي تستهدف cdk كذلك فوائد سريرية في معالجة الأمراض الموصوفة سابقاً عند استخدامها في توليفة علاجية مع عوامل علاجية موجودة حالياً، أو جديدة. ويمكن أن تمتلك العلاجات المضادة للسرطان anticancer therapies التي تستهدف cdk بشكل محتمل مزايا تفوق العديد من عوامل مضادة للأورام antitumour agents حالية بما أنها لا تتفاعل تبادلياً بشكل مباشر مع DNA وومن ثم تقلل من خطورة التطور الثانوي للورم.

انزيم غليكوجين سينثاز كيناز Glycogen Synthase Kinase

يكون انزيم غليكوجين سينثاز كيناز-٣ Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) عبارة عن انزيم كيناز سيرين-ثريونين serine-threonine kinase يوجد عند البشر في صورة شكلين زميريين isoforms معبر عنهما بشكل دائم (GSK3β & GSK3α). ويكون لـ GSK3 دوراً في التطور الجنيني embryonic development، تخليق البروتين، تكاثر الخلية، تمايز الخلية، ديناميكا الأنابيب الدقيقة microtubule dynamics، حركية الخلية وموت الخلايا المبرمج. وبهذه الصفة يشترك GSK3 في تقدم الأمراض مثل داء السكري diabetes، السرطان cancer، مرض الزهايمر Alzheimer's disease، السكتة الدماغية stroke، الصرع epilepsy، مرض العصبون المتحرك motor neuron disease و/أو إصابة الرأس head trauma. ووفقاً لعلم تاريخ الأجناس أو السلالة يكون GSK3 الأقرب صلة بانزيمات الكيناز المعتمدة على السيكلين cyclin (cdks).

وسياق ركيزة الببتيد القانوني الذي يتم التعرف عليه بواسطة GSK3 هو -X-X- (Ser/Thr) X-(pSer/pThr)، حيث X يمثل أي حمض أميني amino acid (عند المواقع (n+1)، (n+2)، (n+3)) و pSer و pThr يمثلان فوسفو-سيرين phospho-serine وفوسفو-ثريونين phospho-threonine على الترتيب (n+4). ويعمل GSK3 على فسفرة السيرين serine الأول، أو الثريونين threonine، عند الموقع (n). ويبدو فوسفو-سيرين phospho-serine، أو فوسفو-ثريونين phospho-threonine، عند الموقع (n+4) ضرورياً لتجهيز GSK3 لتزويد أقصى إجمالي من الركيزة. وتؤدي فسفرة GSK3α عند الموقع Ser21، أو فسفرة GSK3β عند الموقع Ser9، إلى تثبيط GSK3. وتوصلت دراسات تنافس الببتيد والتطفير Mutagenesis and peptide competition studies إلى نموذج GSK3 أجريت له فسفرة عند الطرف النتروجيني يكون قادراً على التنافس مع ركيزة فوسفو-ببتيد phospho-peptide substrate (S/TXXXpS/pT) بواسطة آلية تثبيط ذاتية. كما أن هناك بيانات تقترح كذلك أنه يمكن تنظيم GSK3α و GSKβ بمقدار لا يكاد يدرك بواسطة فسفرة مركبات التيروسين tyrosines، ٢٧٩ و٢١٦ على الترتيب. وينتج عن حدوث طفرة لهذه المواد المتبقية إلى Phe انخفاض في فعالية الكيناز داخل الجسم الحي. ولقد ساعدت البنية التبلورية بالأشعة السينية X-ray crystallographic structure لـ GSK3β في إلقاء ضوء على جميع أوجه تنشيط وتنظيم GSK3.

ويشكل GSK3 جزءاً من مسار استجابة الإنسولين insulin عند الثدييات وهو قابل للفسفرة، وبالتالي تثبيط فعالية انزيم غليكوجين سينثاز. وهكذا يعد تحسين تنظيم upregulation فعالية غليكوجين سينثاز، وبالتالي تخليق الغليكوجين، عن طريق تثبيط GSK3، وسيلة محتملة لمقاومة داء السكري من النوع II أو داء السكري غير المعتمد على الإنسولين non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM): وهي حالة مرضية تصبح فيها أنسجة الجسم bodytissues مقاومة للتنبيه بالإنسولين insulin. وتثار استجابة الإنسولين insulin الخلوية في أنسجة الكبد liver tissues، الأنسجة الدهنية dipose tissues، أو الأنسجة العضلية muscle tissues، بارتباط الإنسولين insulin بمستقبلة الإنسولين insulin خارج الخلية. وهذا يؤدي إلى حدوث فسفرة بروتينات ركيزة مستقبلة الإنسولين insulin receptor substrate (IRS) وتقوية غشاء البلازما plasma membrane. وتعمل الفسفرة الإضافية لبروتينات IRS على البدء بتقوية غشاء البلازما بفعل انزيم كيناز فوسفونيوسيتيد-٣ phosphoinositide-3 kinase (PI3K) عندما يكون قادراً على إطلاق

الرسول messenger الثاني ٣، ٤، ٥-ثلاثي فوسفات فوسفاتيديل إنوسيتيل phosphatidylinosityl 3,4,5-trisphosphate (PIP3). وهذا يسهل من تعيين موقع كيناز ١ بروتيني أبطل اعتماده على ٣-فوسفونيوسيتد 3-phosphoinositide-dedependent protein kinase 1 (PDK1) وكيناز B بروتيني(protein kinase B (PKB or Akt في الغشاء، حيث يعمل PDK1 على تنشيط pKB. ويكون PKB قادراً على فسفرة، وبالتالي تثبيط، GSK3α و/أو GSKβ عن طريق فسفرة Ser9، أو ser21، على الترتيب. ويحدث تثبيط GSK3 بعد ذلك تحسيناً لفعالية غليكوجين سينثاز. وهكذا قد تكون العوامل العلاجية القادرة على تثبيط GSK3 قادرة على استحثاث استجابات خلوية مشابهة لتلك المشاهدة عند التنبيه بالإنسولين insulin. وتتمثل ركيزة أخرى لانزيم GSK3 داخل الجسم الحي في عامل بدء تخليق البروتين حقيقي النواة eukaryotic protein synthesis 2B initiation factor 2B (eIF2B). وتثبَّط فعالية eIF2B بواسطة الفسفرة وهكذا يكون قادراً على كبت التخليق الحيوي للبروتين. وهكذا يمكن أن يعمل تثبيط GSK3، مثلاً بتثبيط فعالية الخلية المستهدفة الثديية لبروتين الراباميسين (mTOR) "mammalian target of rapamycin protein"، على تحسين التخليق الحيوي للبروتين. وأخيراً هناك دليلاً معين على تنظيم فعالية GSK3 بواسطة مسار كيناز بروتيني منشط بمحفز الانقسام الفتيلي mitogen activated protein kinase (MAPK) عن طريق فسفرة GSK3 بواسطة انزيمات كيناز مثل كيناز ١ بروتيني منشط بكيناز بروتيني منشط بمحفز الانقسام الفتيلي mitogen activated protein kinase activated protein kinase 1 (MAPKAP-K1 or RSK). وتقترح هذه البيانات أنه يمكن تعديل فعالية GSK3 باستخدام منبهات الانقسام الفتيلي، الإنسولين insulin و/أو منبهات الحمض الأميني amino acid.

ولقد تبين كذلك أن GSK3β هو مكون رئيسي في مسار تأشير Wnt عند الفقاريات vertebrate Wnt signalling pathway. ولقد تبين أن المسار الكيميائي الحيوي هذا هام للتطور الجنيني الطبيعي وأنه ينظم تكاثر الخلية في الأنسجة الطبيعية. ويصبح GSK3 مثبَّط الفعالية استجابة لمنبهات Wnt. وقد يؤدي هذا إلى نزع فسفرة ركيزات GSK3 مثل أكسين Axin، منتج جين المجموعة القولونية لداء السليلات الورمي الغدي adenomatous polyposis coli (APC) و β-كاتينين β-catenin. ولقد ارتبط التنظيم الشاذ لمسار Wnt بعدة أمراض من السرطان. ويكون حدوث الطفرات في APC، و/أو و β-كاتينين β-catenin شائعاً في سرطان القولون والمستقيم colorectal cancer وأورام أخرى. ولقد تبين كذلك أن β-كاتينين β-catenin له أهمية في التصاق

الخلايا cell adhesion. وهكذا قد يعمل GSK3 كذلك على تعديل عمليات التصاق الخلايا إلى حد ما. وبعيداً عن المسارات الكيميائية الحيوية الموصوفة سابقاً هنالك كذلك بيانات تدل على اشتراك GSK3 في تنظيم انقسام الخلية بواسطة فسفرة سيكلين D1-cyclin، في عملية فسفرة عوامل انتساخ مثل c-Jun، CCAAT/بروتين الربط المعزز α enhancer binding protein α (C/EBPα)، c-Myc و/أو ركيزات أخرى مثل العامل النووي للخلايا التائية المنشطة Nuclear Factor of Activated T-cells (NFATc)، عامل الصدمة الحرارية Heat Shock Factor-I (HSF-I) وبروتين ربط عنصر الاستجابة c-AMP response element binding protein c-AMP (CREB). ويبدو كذلك أن GSK3 يلعب دوراً، وإن يكن متخصصاً بالنسيج، في تنظيم موت الخلايا المبرمج. وقد يكون دور GSK3 في تعديل موت الخلايا المبرمج، بواسطة آلية موت الخلايا المبرمج التمهيدية pro-apoptotic mechanism، ذو صلة محددة بحالات مرضية طبية يمكن أن يحدث فيها موت الخلايا المبرمج العصبوني neuronal apoptosis. ومن أمثلة هذه الحالات إصابة الرأس، السكتة الدماغية، الصرع، الزهايمر وأمراض العصبون المتحرك motor neuron diseases، الشلل فوق النووي المتقدم progressive supranuclear palsy، تحلل أساسي قشري corticobasal degeneration، ومرض بك Pick's disease. ولقد تبين في أنبوب الاختبار أن GSK3 قادراً على إجراء فسفرة مفرطة للبروتين Tau المرتبط بالأنابيب الدقيقة. وتؤدي الفسفرة المفرطة لـ Tau إلى تمزيق ارتباطه الطبيعي بالأنابيب الدقيقة وقد يؤدي كذلك إلى تشكيل خيوط Tau داخل الخلية. ويعتقد بأن التراكم المتزايد لهذه الخيوط يؤدي إلى قصور الوظيفة العصبونية وإلى التحلل العصبوني بشكل نهائي. وهكذا قد يزود تثبيط فسفرة Tau، عن طريق تثبيط GSK3، وسيلة للحد من و/أو منع تأثيرات التحلل العصبي neurodegenerative effects.

أورام الخلايا B الليمفاوية الكبيرة المنتشرة Diffuse Large B-cell Lymphomas (DLBCL)

يُنظَّم تقدم دورة الخلية بتوليفة من تأثيرات السيكلينات cyclins، وانزيمات كيناز معتمدة على السيكلين cyclin (CDKs)، ومثبطات CDK- (CDKi)، التي تعد منظمات سالبة لدورة الخلية. ويكون p27KIP1 عبارة عن CDKi رئيسي في تنظيم دورة الخلايا، حيث يكون انحلاله لازماً للتحول من الطور G1 إلى الطور S. وبالرغم من غياب التعبير عن p27KIP1 في تكاثر الخلايا الليمفاوية lymphocytes، إلا أنه وصف أن بعض أورام الخلايا B الليمفاوية العدوانية أظهرت تلوُّن p27KIP1 شاذ. ووُجد التعبير الشاذ عن p27KIP1 في أورام ليمفاوية من هذا النوع. وأظهر

تحليل العلاقة السريرية لهذه النتائج أن مستوى مرتفع من التعبير عن p27KIP1 في هذا النوع من الأورام يمثل واسم التشخيص المسبق العكسي adverse prognostic marker، في كل من التحليل أحادي المتغير univariate والتحليل متعدد المتغيرات multivariate. وتبين هذه النتائج أن هناك تعبير شاذ عن p27KIP1 في أورام الخلايا B الليمفاوية الكبيرة المنتشرة (DLBCL)، مع دلالة سريرية عكسية، توحي بأن البروتين p27KIP1 الشاذ هذا يصير غير وظيفي من خلال التفاعل التبادلي مع بروتينات أخرى منظمة لدورة الخلية. (انظر ما جاء في مجلة Br. J Cancer، المجلد ٨٠، العدد ٩، ص: ١٤٢٧-١٤٣٤، يوليو ١٩٩٩م، باسم إيه سيز A Saes، ئي سانتشز E Sanchez، إم سانتشز-بياتو M Sanchez-Beato، إم إيه كروز MA Cruz، أي تشاكون I Chacon، ئي ميونوز E Munoz، إف أي كاماتشو FI Camacho، جيه سي مارتينيز-مونتيرو JC Martinez-Montero، إم موليجو M Mollejo، جيه إف غارسيا JF Garcia، إم إيه بيريس MA Piris قسم علم الأمراض Department of Pathology، مستشفى فيرجين دي لا ساليود هوسبيتال Virgen de la Salud Hospital، مدينة توليدو Toledo، اسبانيا Spain، حيث ذكر فيها أنه يتم التعبير عن p27KIP1 بشكل شاذ في أورام الخلايا B الليمفاوية الكبيرة المنتشرة وأنه يرتبط بالنتيجة السريرية العكسية).

سرطان الدم الليمفي المزمن Chronic Lymphocytic Leukemia

يعد سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا B الليمفاوية Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) أكثر أنواع سرطان الدم شيوعاً في نصف الكرة الغربي، حيث يتم تشخيص ١٠٠٠٠ حالة جديدة تقريباً كل سنة. (انظر ما جاء عن إس إل باركر SL Parker، تي تونغ T Tong، إس بولدن S Bolden، بيه إيه وينغو PA Wingo: في مقالة بعنوان Cancer statistics، في مجلة Ca. Cancer. J. Clin.، المجلد ٤٧، العدد ٥، (١٩٩٧م)). وبالنسبة للأشكال الأخرى من سرطان الدم، يكون التشخيص المسبق الكلي لمريض مصاب بـ CLL جيداً، مع أن متوسط مدة بقاء المرضى على قيد الحياة في المراحل الأكثر تقدماً يبلغ ٣ سنوات.

ولقد أدت إضافة الفلودارابين fludarabine بصفته علاج أوّلي لمرضى تظهر عليهم أعراض CLL إلى معدل أعلى من الاستجابات التامة (٢٧٪ مقابل ٣٪) ومدة بقاء على قيد الحياة دون تقدم المرض (٣٣ مقابل ١٧ شهر) مقارنة بعلاجات أساسها عامل ألكلة alkylator-based therapies مستخدمة سابقاً. وبالرغم من أن تحقيق استجابة سريرية تامة بعد العلاج يعد

الخطوة الابتدائية نحو تحسين مدة البقاء على قيد الحياة عند المرضى المصابين بـِ CLL، فإن معظم المرضى لا يصلون إلى تخفيف تام لحدة المرض أو يفشلون في الاستجابة للفلودارابين fludarabine. وعلاوة على ذلك، ينتكس جميع المرضى المصابين بـِ CLL والمعالجين بفلودارابين fludarabine بشكل نهائي، مما يجعل دوره كعامل مفرد مجرد مخفف. (انظر ما جاء عن كيه آر راي KR Rai، بي بيترسون B Peterson، إل إلياس L Elias، إل شيفيرد L Shepherd، جيه هنز J Hines، دي نيلسون D Nelson، بي تشيسون B Cheson، جيه كوليتز J Kolitz، سي إيه سكيفر CA Schiffer: في مقالة بعنوان: A randomized comparison of fludarabine and chlorambucil for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia، وفي مقالة بعنوان A CALGB SWOG, CTG/NCI-C and ECOG Inter-Group Study، في مجلة Blood، المجلد ٨٨، العدد ١٤١أ، (الخلاصة ٥٥٢، الملحق ١) ١٩٩٦م. وبناءاً على ذلك، سيكون من الضروري تحديد عوامل جديدة مع آليات تأثير جديدة تكمّل السمية الخلوية للفلودارابين fludarabine's cytotoxicity وتلغي المقاومة المستحثة بفعل عوامل مقاومة العقار CLL الأساسية إذا كان من المطلوب تحقيق خطوات أخرى إلى الأمام في علاج هذا المرض.

وكان العامل المتوقع بصورة موحّدة، الذي ركزت عليه الدراسة بالشكل الأكبر فيما يتعلق بالاستجابة الضعيفة للعلاج ومدة البقاء على قيد الحياة الأدنى عند مرضى مصابين بـِ CLL، عبارة عن وظيفة p53 الشاذة، كما تم تميزها بالطفرات النقطية point mutations أو بحالات حذف p13 من الكروموسوم ١٧. وفي الواقع، لم يتم عملياً توثيق أي استجابات لعلاج بعامل الألكلة alkylator أو بنظير البورين purine analog في العديد من سلاسل لحالات مرضية تقوم مؤسسة بدراستها تتعلق بأولئك المرضى المصابين بـِ CLL مع وظيفة P53 شاذة. وبصورة محتملة يُعدّ إدخال عامل علاجي له القدرة على التغلب على مقاومة العقار المرتبطة بطفرة P53 في مرض CLL التقدم الأهم بالنسبة لمعالجة المرض.

ويحث الفلافوبيريدول Flavopiridol و CYC 202، مثبطات انزيمات الكيناز المعتمدة على السيكلين cyclin على موت مبرمج للخلايا الخبيثة المأخوذة من خلايا B الليمفاوية المصابة بسرطان الدم المزمن (B-CLL) في أنبوب الاختبار.

ويؤدي التعرض للفلافوبيريدول Flavopiridol إلى تنبيه فعالية كاسباز ٣ caspase 3 activity وإلى إنقسام p27(kipl) المعتمد على الكاسباز، وهو منظم سالب لدورة الخلية، يتم التعبير

عنه بشكل مفرط في B-CLL. (انظر ما جاء في مجلة Blood، المجلد ٩٢، العدد ١٠، ص: ٣٨٠٤-٣٨١٦، ١٥ نوفمبر ١٩٩٨م، باسم جيه سي بيرد JC Byrd، سي شاين C Shinn، جيه كيه واسيلينكو JK Waselenko، ئي جيه فيوتشس EJ Fuchs، تي إيه ليمان TA Lehman، بيه إل نغوين PL Nguyen، أي دبليو فلين IW Flinn، إل إف ديل LF Diehl، ئي سوزفيل E Sausville، إم آر غريفر MR Grever، حيث ذكر فيها أن الفلافوبيريدول Flavopiridol يحث على الموت المبرمج للخلايا الليمفاوية المصابة بسرطان الدم المزمن بواسطة تنشيط كاسباز ٣ دون وجود دليل على تعديل bc1-2 أو الاعتماد على p35 الوظيفي).

التقنية السابقة

يكشف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٠٢/٣٤٧٢١ الصادر عن شركة ديوبونت Du Pont عن فئة من مركبات إنديو [١، ٢-جـ] بيرازولون (٤) indeno [1,2-c]pyrazol-4-ones بصفتها مثبطات لانزيمات الكيناز المعتمدة على السيكلين cyclin.

ويصف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٠١/٨١٣٤٨ الصادر عن شركة بريستول مايرز سكويب Bristol Myers Squibb استخدام مركبات ٥-ثيو-، كبريتينيل-وكبريتونيل بيرازولو [٣، ٤-ب]-بيريدين 5-thio-, sulphinyl- and sulphonylpyrazolo[3,4-b]-pyridines بصفتها مثبطات لكيناز معتمد على السيكلين cyclin.

ويكشف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٠٠/٦٢٧٧٨ الصادر عن شركة بريستول مايرز سكويب Bristol Myers Squibb عن فئة من مثبطات لكيناز تيروسين بروتيني.

ويصف طلب براءة الاختراع الدولي رقم A1 ٠١/٧٢٧٤٥ الصادر عن شركة سيكلاسيل Cyclacel مركبات ٤-أريل مخلط-بيريميدين 4-heteroaryl-pyrimidines تحمل بديلاً عند الموقع ٢ و تحضيرها، والتراكيب الصيدلية التي تحتويها واستخدامها كمثبطات لانزيمات كيناز معتمدة على السيكلين cyclin (CDKs) ومن ثم استخدامها في معالجة الاضطرابات التكاثرية مثل السرطان، سرطان الدم، الصدفية psoriasis وما شابه.

ويصف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٩٩/٢١٨٤٥ الصادر عن شركة أغورون Agouron مشتقات ٤-أمينوثيازول 4-aminothiazole derivatives تستخدم لتثبيط انزيمات كيناز معتمدة على السيكلين cyclin (CDKs)، مثل CDK1، CDK2، CDK4 وCDK6. ويوجّه الاختراع كذلك نحو الاستخدام العلاجي أو الوقائي لتراكيب صيدلية تحتوي على مركبات من هذا القبيل

وبطرق لمعالجة أمراض خبيثة malignancies أو اضطرابات أخرى بإعطاء مقادير فعالة من مركبات من هذا القبيل.

ويكشف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٠١/٥٣٢٧٤ الصادر عن شركة أغورون Agouron عن فئة من مركبات يمكن أن تشتمل على حلقة بنزين تحمل بديلاً من أميد amide-substituted benzene ترتبط بمجموعة حلقية مخلطة تحتوي على طرف نتروجيني N-containing heterocyclic group بصفتها مثبطات لكيناز CDK.

ويكشف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٠١/٩٨٢٩٠ (الصادر عن شركة فارماسيا آند أبجون Pharmacia &Upjohn) عن فئة من مشتقات ٣-أمينوكربونيل-٢-كربوكساميدوثيوفين 3-aminocarbonyl-2-carboxamido thiophene derivatives بصفتها مثبطات لكيناز بروتيني.

ويكشف طلبا براءتي الاختراع الدوليان ٠١/٥٣٢٦٨ و ٠١/٠٢٣٦٩ الصادران عن شركة أغورون Agouron عن مركبات تتوسط أو تثبّط تكاثر الخلية من خلال تثبيط انزيمات كيناز بروتيني مثل كيناز معتمد على السيكلين cyclin أو كيناز التيروسين. وتحتوي المركبات التي تنتجها شركة أغورون Agouron على حلقة أريل aryl أو أريل مخلط heteroaryl ترتبط بشكل مباشر أو من خلال مجموعة CH=CH أو CH=N بالموقع ٣ من حلقة إندازول indazole.

ويصف طلبا براءتي الاختراع الدوليان ٠٠/٣٩١٠٨ و ٠٢/٠٠٦٥١ (الصادران عن شركة ديوبونت فارماسيوتيكالز Du Pont Pharmaceuticals) مركبات حلقية مخلطة تمثل مثبطات لانزيمات بروتياز سيرين شبيهة بالتريبسين trypsin-like serine protease enzymes، وخاصةً العامل Xa والثرومبين thrombin. ويذكر بأن المركبات مفيدة بصفتها مضادات للتجلط anticoagulants أو لمنع اضطرابات انسداد الأوعية بالتجلط thromboembolic disorders.

ويكشف كل من براءة الاختراع الأمريكية رقم ٢٠٠٢/٠٠٩١١١٦ (باسم زهيو Zhu ومعاونيه)، وطلبا براءتي الاختراع الدوليان ٠١/١٩٧٩٨ و ٠١/٦٤٦٤٢ عن مجموعات متنوعة من مركبات حلقية مخلطة بصفتها مثبطات للعامل Xa. ويكشف عن مركبات كربوكساميد بيرازول تحمل بديلاً عند الموقع ١ 1-substituted pyrazole carboxamides معينة وتذكر أمثلة عليها.

ويصف كل من براءة الاختراع الأمريكية رقم ٦.١٢٧.٣٨٢، وطلبات براءات الاختراع الدولية أرقام ٠١/٧٠٦٦٨، ٠٠/٦٨١٩١، ٩٧/٤٨٦٧٢، ٩٧/١٩٠٥٢ و ٩٧/١٩٠٦٢ (الصادرة

جميعها عن شركة أليرغان Allergan) مركبات تمتلك فعالية شبيهة بالرتين retinoid-like activity لاستخدامها في معالجة أمراض فرط التكاثر hyperproliferative diseases المتنوعة بما في ذلك أمراض السرطان.

ويصف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٠٢/٠٧٠٥١٠ (الصادر عن شركة باير Bayer) فئة من مركبات حمض أمينو-ثنائي كربوكسيليك amino-dicarboxylic acid لاستخدامها في معالجة أمراض قلبية وعائية cardiovascular diseases. وبالرغم من ذكر مركبات البيرازول pyrazoles بشكل عام، إلا إنه لا توجد أمثلة محددة لمركبات البيرازول pyrazoles في هذه الوثيقة.

ويكشف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٩٧/٠٣٠٧١ (الصادر عن شركة كنول إيه جي AG Knoll) عن فئة من مشتقات سيكليل مخلط-كربوكساميد heterocyclyl-carboxamide لاستخدامها في معالجة اضطرابات الجهاز العصبي المركزي. وتذكر مركبات البيرازول pyrazoles بشكل عام بصفتها أمثلة على مجموعات حلقية مخلطة heterocyclic groups ولكن لم يكشف عن مركبات بيرازول pyrazole compounds محددة ولم تذكر أمثلة عليها.

ويصف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٩٧/٤٠٠١٧ (الصادر عن شركة نوفو نوردِسك Novo Nordisk) مركبات تمثل معدّلات لانزيمات فوسفاتاز تيروسين بروتيني protein tyrosine phosphatases.

ويكشف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٠٣/٠٢٠٢١٧ (الصادر عن شركة يونيف. كونكتيكيوت Univ. Connecticut) عن فئة من مركبات ٣-كربوكساميد البيرازول 3- pyrazole carboxamides بصفتها معدّلات لمستقبلة كنابينويد cannabinoid receptor لمعالجة حالات مرضية عصبية. ويذكر (في الصفحة ١٥) أنه يمكن استخدام المركبات في العلاج الكيميائي للسرطان cancer chemotherapy ولكن لم يتضح إن كانت المركبات فعّالة بصفتها عوامل مضادة للسرطان anti-cancer agents أو أنه يتم إعطاؤها من أجل أغراض أخرى.

ويكشف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٠١/٥٨٨٦٩ (الصادر عن شركة بريستول مايرز سكويب Bristol Myers Squibb) عن معدلات لمستقبلة الكنابينويد cannabinoid يمكن استخدامها من جملة أمور أخرى لمعالجة تشكيلة منوعة من الأمراض. ويتمثل الاستخدام الرئيسي المتصوَّر في معالجة الأمراض التنفسية respiratory diseases، بالرغم من أنه يشار إلى معالجة السرطان.

ويكشف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٠١/٠٢٣٨٥ (الصادر عن شركة أفنتيس كروب سينس Aventis Crop Science) عن مشتقات ١-(كينولينيل (٤))-H١-بيرازول -1 (quinoline-4-yl)-1H-pyrazole بصفتها مبيدات فطرية fungicides. ويكشف عن مركبات بيرازول pyrazoles لا تحمل بديلاً عند الموقع ١ بصفتها مركبات وسيطة تخليقية synthetic intermediates.

ويكشف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٤/٠٣٩٧٩٥ (الصادر عن شركة فيوجيساوا Fujisawa) عن أميدات amides تحتوي على مجموعة بيرازول pyrazole تحمل بديلاً عند الموقع ١ بصفتها مثبطات لإفراز صميم البروتين الشحمي apolipoprotein B secretion B. ويذكر أن المركبات مفيدة في معالجة حالات مرضية مثل فرط تدسم الدم hyperlipidemia.

ويكشف طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٤/٠٠٠٣١٨ (الصادر عن شركة سليولار جينوميكس Cellular Genomics) عن مركبات حلقية أحادية تحمل بديلاً من الأمينو amino-substituted monocycles بصفتها معدّلات للكيناز. ولم يكن أي من المركبات المذكورة كأمثلة من مركبات البيرازول pyrazoles.

الوصف العام للاختراع

يزود الاختراع من بين مركبات أخرى أملاح بالإضافة إلى حمض من المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأشكال بلورية منها، وخصوصاً الأملاح من حمض ميثان الكبريتونيك methanesulphonic acid وحمض الأسيتيك acetic acid.

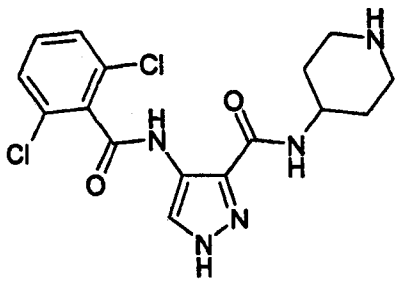
ويزود الاختراع كذلك عمليات جديدة لتحضير المركب، أملاح بالإضافة إلى حمض منه وأشكال بلورية منه، بالإضافة إلى مركبات وسيطة كيميائية chemical intermediates لاستخدامها في العمليات.

كما يزود الاختراع كذلك استخدامات علاجية therapeutic uses للمركب ولأملاح بالإضافة إلى حمض منه، بالإضافة إلى استخدامات علاجية جديدة لنظائر analogues لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-

4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كربوكسيليك

ووفقاً لذلك، في وجه أول، يزود الاختراع ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، حيث يكون الملح غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride.

ويكون للقاعدة الحرة free base من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-IH-pyrazole-3-carboxylic acid من الأملاح التي تكون مشتقة الصيغة (I):



(I)

ويمكن الإشارة إلى المركب بالصيغة (I) في هذا الطلب باسمه الكيميائي chemical name أو، على نحو مناسب، بـ "المركب"، "المركب بالصيغة (I)" أو "المركب وفقاً للاختراع". ويشير كل من هذه المرادفات إلى المركب المبين في الصيغة (I) أعلاه وله الاسم الكيميائي بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-IH-pyrazole-3-carboxylic acid.

وتتمثل الأملاح التي يتعلق بها هذا الطلب في أملاح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-IH-pyrazole-3-carboxylic acid. ويمكن استخدام المصطلحين "ملح" و"ملح بالإضافة إلى حمض" بالتبادل في هذا الطلب، كذلك يمكن استخدام المصطلحين "ملح" و"أملاح" كما استخدما في هذا البيان إلى أملاح بالإضافة إلى حمض ما لم يدل المحتوى على غير ذلك.

والإشارة إلى المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-IH-pyrazole-3-carboxylic acid وأملاح بالإضافة إلى حمض منه تتضمن ضمن نطاقها جميع الذوابات solvates، الأصناء tautomers والنظائر isotopes منه، وحيث يذكر المحتوى، مركبات N-أكسيد N-oxides، أشكال أيونية ionic forms وعقارات أولية prodrugs أخرى.

ويمكن أن يختار الملح بالإضافة إلى حمض من أملاح تم تشكيلها باستخدام حمض مختار من المجموعة المكونة من أحماض أسيتيك acetic، أديبيك adipic، ألجينيك alginic، أسكوربيك ascorbic (مثلاً L-أسكوربيك L-ascorbic)، أسبارتيك aspartic (مثلاً L-أسبارتيك L-aspartic)، بنزين كبريتونيك benzenesulphonic، بنزويك benzoic، كافوريك camphoric (مثلاً (+) كافوريك camphoric (+))، كبريك capric، كبريليك caprylic، كربونيك carbonic، ستريك citric، سيكلاميك cyclamic، دوديسانوات dodecanoate، دوديسيل كبريتوريك dodecylsulphuric، إيثان-١، ٢-ثنائي كبريتونيك ethane-1,2-disulphonic، إيثان كبريتونيك ethanesulphonic، فوماريك fumaric، غالاكتاريك galactaric، جنتيسيك gentisic، غلوكوهبتونيك glucoheptonic، D-غلوكونيك D-gluconic، غلوكورونيك glucuronic (مثلاً D-غلوكورونيك D-glucuronic)، غلوتاميك glutamic (مثلاً L-غلوتاميك L-glutamic)، ألفا-أكسوغلوتاريك α-oxoglutaric، غليكوليك glycolic، هيبوريك hippuric، إيزثيونيك isethionic، أيزوبيوتيريك isobutyric، لاكتيك lactic (مثلاً (+)-L-لاكتيك (+)-L-lactic و(±)-LD-لاكتيك (±)-DL-lactic)، لاكتوبيونيك lactobionic، لوريل كبريتونيك laurylsulphonic، ماليك maleic، ماليك malic، (-)-L-ماليك (-)-L-malic)، مالونيك malonic، ميثان كبريتونيك methanesulphonic، ميوسيك mucic، نفثالين كبريتونيك naphthalenesulphonic (مثلاً نفثالين-٢-كبريتونيك naphthalene-2-sulphonic)، نفثالين-١، ٥-ثنائي كبريتونيك naphthalene-1,5-disulphonic، نيكوتينيك nicotinic، أوليك oleic، أوروتيك orotic، أوكساليك oxalic، بالميتيك palmitic، باموبك pamoic، فوسفوريك phosphoric، بروبيونيك propionic، سباسيك sebacic، ستياريك stearic، سكسينيك succinic، كبريتوريك sulphuric، طرطريك tartaric (مثلاً (+)-L-طرطريك (+)-L-tartaric)، ثيوسيانيك thiocyanic، تولوين كبريتونيك toluenesulphonic (مثلاً بارا-تولوين كبريتونيك p-toluenesulphonic)، فاليريك valeric وزينافويك xinafoic.

وتشمل مجموعة فرعية واحدة من أملاح بالإضافة إلى حمض أملاح تم تشكيلها باستخدام حمض مختار من المجموعة المكونة من أحماض أسيتيك acetic، أديبيك adipic، أسكوربيك ascorbic (مثلاً L-أسكوربيك L-ascorbic)، أسبارتيك aspartic (مثلاً L-أسبارتيك L-aspartic)، كبرويك caproic، كربونيك carbonic، ستريك citric، دوديكانويك dodecanoic، فوماريك fumaric، غالاكتاريك galactaric، غلوكوهبتونيك glucoheptonic، غلوكونيك gluconic (مثلاً D-غلوكونيك D-gluconic)، غلوكورونيك glucuronic (مثلاً D-غلوكورونيك D-glucuronic)، غلوتاميك glutamic (مثلاً L-غلوتاميك L-glutamic)، غليكوليك glycolic، هيبوريك hippuric، لاكتيك lactic (مثلاً (+)-L-لاكتيك (+)-L-lactic و(±)-LD-لاكتيك (±)-DL-lactic)، ماليك maleic، بالميتيك palmitic، فوسفوريك phosphoric، سباسيك sebacic، ستياريك stearic، سكسينيك succinic، كبريتوريك sulphuric، طرطريك tartaric (مثلاً (+)-L-طرطريك (+)-L-tartaric) وثيوسيانيك thiocyanic.

وعلى وجه التحديد، تكون الأملاح عبارة عن أملاح بالإضافة إلى حمض تم تشكيلها باستخدام حمض مختار من حمض ميثان الكبريتونيك methanesulphonic acid وحمض الأسيتيك acetic acid، ومخاليط منها.

وفي أحد التجسيدات، يكون الملح عبارة عن ملح بالإضافة إلى حمض تم تشكيله باستخدام حمض ميثان الكبريتونيك methanesulphonic acid.

وفي تجسيد آخر، يكون الملح عبارة عن ملح بالإضافة إلى حمض تم تشكيله باستخدام حمض الأسيتيك acetic acid.

وعلى نحو مناسب، يمكن الإشارة إلى الأملاح التي تم تشكيلها من حمض ميثان الكبريتونيك methanesulphonic acid وحمض الأسيتيك acetic acid المستخدمين في هذا البيان كأملاح ميثان الكبريتونات methanesulphonate أو المسيلات mesylate وكأملاح الأسيتات acetate على الترتيب.

وفي الحالة الصلبة، يمكن أن تكون الأملاح وفقاً للاختراع بلورية crystalline أو غير متبلورة amorphous أو خليط منها.

وفي أحد التجسيدات، تكون الأملاح غير متبلورة.

وفي حالة صلبة غير متبلورة، لا تكون البنية ثلاثية الأبعاد three dimensional structure الموجودة عادة على شكل بلوري موجودة وتكون مواقع الجزيئات بالنسبة لبعضها في الشكل غير المتبلور عشوائية random بشكل أساسي، انظر على سبيل المثال ما جاء عن هانكوك Hancock ومعاونيه في مجلة بعنوان J. Pharm. Sci. (١٩٩٧م)، الطبعة ٨٦، ص ١.

وفي تجسيد آخر، تكون الأملاح بلورية بشكل جوهري، أي تتراوح درجة تبلورها من ٥٠ إلى ١٠٠%، وبصفة خاصة قد تكون ٥٠% على الأقل، أو ٦٠% على الأقل، أو ٧٠% على الأقل، أو ٨٠% على الأقل، أو ٩٠% على الأقل، أو ٩٥% على الأقل، أو ٩٨% على الأقل، أو ٩٩% على الأقل، أو ٩٩.٥% على الأقل، على سبيل المثال ١٠٠%.

وفي تجسيد إضافي، تختار الأملاح من المجموعة المكونة من أملاح تتراوح درجة تبلورها من ٥٠% إلى ١٠٠%، أملاح تكون درجة تبلورها ٥٠% على الأقل، ٦٠% على الأقل، ٧% على الأقل، ٨٠% على الأقل، ٩٠% على الأقل، ٩٥% على الأقل، ٩٨% على الأقل، ٩٩% على الأقل، ٩٩.٥% على الأقل، ٩٩.٩% على الأقل، على سبيل المثال ١٠٠%.

والأفضل أن تكون الأملاح من المجموعة (أو قد تكون مختارة من المجموعة المكونة من تلك) التي تتراوح درجة تبلورها من ٩٥% إلى ١٠٠%، على سبيل المثال ٩٨% على الأقل، أو ٩٩% على الأقل، أو ٩٩.٥% على الأقل، أو ٩٩.٦% على الأقل أو ٩٩.٧% على الأقل أو ٩٩.٨% على الأقل أو ٩٩.٩% على الأقل، على سبيل المثال ١٠٠%.

ومن أحد الأمثلة على الأملاح البلورية جوهرياً ملح بلوري تم تشكيله باستخدام حمض ميثان الكبريتونيك methanesulphonic acid.

ومثال آخر على ملح بلوري جوهرياً ملح بلوري تم تشكيله باستخدام حمض الأسيتيك acetic acid.

وقد تكون الأملاح وفقاً للاختراع، في الحالة الصلبة ذوابة (مثلاً مميأة hydrated) أو غير ذوابة (مثلاً لامائية anhydrous).

وفي أحد التجسيدات، تكون الأملاح غير ذوابة (مثلاً لامائية). ومن أمثلة ملح غير ذواب الملح البلوري الذي تم تشكيله باستخدام حمض ميثان الكبريتونيك methanesulphonic acid كما عُرِّف في هذا البيان.

ولا يستثني المصطلح "لامائي" كما استخدم في هذا البيان إمكانية وجود بعض الماء على الملح (مثلاً بلورة الملح) أو فيه. فعلى سبيل المثال، يمكن أن يوجد بعض من الماء على سطح الملح (مثلاً بلورة ملحية salt crystal)، أو مقادير ثانوية ضمن كتلة الملح (مثلاً بلورة). وعادةً، يحتوي شكل لامائي على أقل من ٠.٤ جزيء من الماء لكل جزيء من المركب، والأفضل أن يحتوي على أقل من ٠.١ جزيء من الماء لكل جزيء من المركب، على سبيل المثال أن لا تحتوي على الماء.

وفي تجسيد آخر، تكون الأملاح ذوابة. وحيثما تكون الأملاح مميأة، قد تحتوي، على سبيل المثال، على ما لا يزيد عن ثلاث جزيئات ماء ناتجة من عملية التبلور crystallization، والأكثر اعتيادياً أن لا يزيد عن اثنين، مثلاً جزيء ماء واحد أو اثنين. وقد تتشكل مركبات هيدرات غير منضبطة التركيب non-stoichiometric hydrates بحيث يكون عدد جزيئات الماء الموجودة أقل من جزيء واحد، وإلاّ يكون عدداً غير صحيحاً. فعلى سبيل المثال، عند وجود أقل من جزيء واحد من الماء، فإنه قد يكون على سبيل المثال ٠.٤، أو ٠.٥، أو ٠.٦، أو ٠.٧، أو ٠.٨،أو ٠.٩ جزيء من الماء موجود لكل جزيء من المركب.

وتشمل ذوابات أخرى مركبات كحولات alcoholates مثل مركبات إيثانولات ethanolates ومركبات أيزوبروبانولات isopropanolates.

ويمكن تخليق الأملاح وفقاً للاختراع الراهن من المركب الأم بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide بواسطة طرق كيميائية تقليدية مثل الطرق الموصوفة في كتاب بعنوان Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use، للمحررين بيه. هنزيك ستاهل P. Heinrich Stahl، وكاميل. جي. ويرموث Camille G. Wermuth، بالرقم القياسي الدولي للكتب International Standard Book Number (ISBN): 3-90639-026-8، الموجود على الغلاف الصلب، والمتكون من ٣٨٨ صفحة، أصدر في ١٣ أغسطس ٢٠٠٢. وبشكل عام، يمكن تحضير أملاح مثل هذه عن طريق مفاعلة المركب الأم بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide مع الحمض الملائم في ماء أو في مذيب عضوي organic solvent، أو في خليط

منهما؛ وبشكل عام، يتم استخدام أوساط غير مائية nonaqueous media مثل إيثر ether، أسيتات إثيل ethyl acetate، إيثانول ethanol، أيزوبروبانول isopropanol، أو أسيتونتريل acetonitrile.

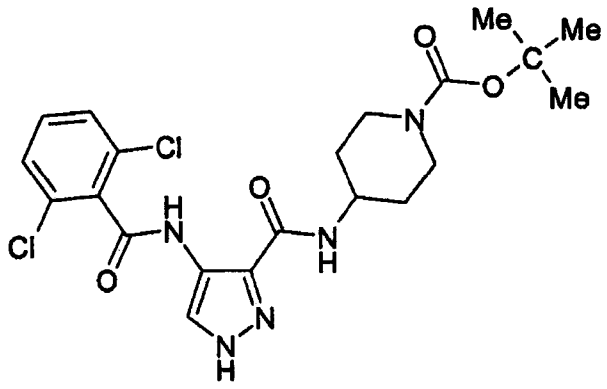
وفي وجه آخر، يزود الاختراع طريقة لتحضير ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، حيث تتضمن الطريقة تشكيل محلول من القاعدة الحرة من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide في مذيب (عادةً يكون مذيب عضوي) أو خليط من المذيبات، ومعالجة المحلول باستخدام حمض لتشكيل راسب precipitate من ملح بالإضافة إلى حمض.

ويمكن إضافة الحمض كمحلول في مذيب يكون قابلاً للامتزاج miscible مع المذيب الذي يتم فيه إذابة القاعدة الحرة. وقد يكون المذيب الذي يتم فيه إذابة القاعدة الحرة بشكل أولي عبارة عن مذيب لا يذوب فيه الملح بالإضافة إلى حمض. وبشكل بديل، قد يكون المذيب الذي يتم فيه إذابة القاعدة الحرة بشكل أولي عبارة عن مذيب يذوب فيه الملح بالإضافة إلى حمض ذائباً بشكل جزئي على الأقل، ويتم إضافة مذيب مختلف يكون فيه الملح بالإضافة إلى حمض أقل ذائبية بشكل لاحق بحيث يفصل الملح بالترسيب من المحلول.

وفي طريقة بديلة لتشكيل ملح بالإضافة إلى حمض، يتم إذابة بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide في مذيب يشتمل على حمض متطاير volatile acid واختيارياً مذيب إسهامي co-solvent، مما يؤدي إلى تشكيل محلول من الملح بالإضافة إلى حمض باستخدام الحمض المتطاير، ثم يركز المحلول الناتج أو يبخر لفصل الملح. ومن الأمثلة على صنع ملح بالإضافة إلى ملح بهذه الكيفية صنع ملح الأسيتات acetate salt.

وفي وجه آخر، يزود الاختراع طريقة لتشكيل ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-

dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عُرِّف في هذا البيان، حيث تتضمن الطريقة معالجة مركب بالصيغة (X):



(X)

باستخدام حمض عضوي أو غير عضوي كما عرف في هذا البيان، غير حمض الهيدروكلوريك hydrochloric acid، في مذيب عضوي لإزالة المجموعة ثث-بيوتيلوكسي كربونيل tert-butyloxycarbonyl وتشكيل ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide باستخدام الحمض العضوي أو غير العضوي، وبشكل اختياري فصل الملح بالإضافة إلى الحمض الذي تم تشكيله بهذه الكيفية.

وعادة يتم ترسيب الملح من المذيب العضوي كلما تشكل ومن ثم يمكن فصل المادة الصلبة من المحلول، مثلاً بالترشيح filtration.

ويمكن تحويل أحد أشكال الملح وفقاً للاختراع إلى القاعدة الحرة وبشكل اختياري إلى شكل ملح آخر بالطرق المعروفة جيداً للشخص المتمرس. فعلى سبيل المثال، يمكن تشكيل القاعدة الحرة عن طريق تمرير المحلول الملحي خلال عمود column يحتوي على طور أمين ثابت amine stationary phase (مثلاً عمود من نوع ستراتا-NH_2 column NH_2-Strata). وبشكل بديل، يمكن معالجة محلول من الملح في ماء باستخدام ثنائي كربونات الصوديوم sodium bicarbonate لتحليل الملح وفصل القاعدة الحرة بالترسيب. ثم يمكن دمج القاعدة الحرة مع حمض آخر بإحدى الطرق الموصوفة أعلاه أو في أي مكان آخر في هذا البيان.

ويكون لأملاح مثل أملاح بالإضافة إلى حمض عدداً من المزايا التي تفوق مزايا القاعدة الحرة المقابلة. فعلى سبيل المثال، ستتمتع الأملاح بميزة واحدة أو أكثر من المزايا التالية التي تفوق مزايا القاعدة الحرة بأنها:

- سيكون لها ذائبية أكبر وبالتالي ستكون أفضل للإعطاء في الوريد intravenous (i.v.) administration (مثلاً بالتسريب infusion)
- سيكون لها ثبات stability أفضل (مثلاً عمر تخزين shelf life محسن)؛
- سيكون لها ثبات حراري thermal stability أفضل؛
- سيكون لها قاعدية أقل ولذلك تكون أفضل للإعطاء في الوريد؛
- سيكون لها مزايا إنتاجية؛
- سيكون لها ذائبية محسنة في محلول مائي؛
- سيكون لها خواص كيميائية فيزيائية physicochemical properties أفضل؛
- قد يكون لها فعالية مضادة للسرطان anti-cancer activity محسنة؛ و
- قد يكون لها دليل علاجي therapeutic index محسن.

وبصفة خاصة يعتبر شكل ملح ميثان الكبريتونات methanesulphonate مفيداً لأن له ثبات جيد عند درجات حرارة مرتفعة وفي ظروف رطوبة مرتفعة نسبياً، ولأنه غير ماص للرطوبة non-hygroscopicity (كما عُرف في هذا البيان)، غياب تشكل متعدد الأشكال polymorph والهيدرات hydrate، وثبات في الظروف المائية. وعلاوة على ذلك، يكون له ذائبية ممتازة للماء وله خواص فيزيائية كيميائية أفضل (مثلا درجة انصهار melting point مرتفعة) بالنسبة لأملاح أخرى.

ويشتمل المصطلح 'ثابت' أو 'ثبات' كما استخدم في هذا البيان الثبات الكيميائي وثبات الحالة الصلبة (الفيزيائية). ويقصد بالمصطلح 'الثبات الكيميائي' أنه يمكن تخزين المركب على شكل منفصل، على شكل تركيبة يزود فيها خليط، على سبيل المثال، مع مواد ناقلة carriers، مواد مخففة diluents أو مواد مساعدة adjuvants مقبولة صيدلياً كما وصف في هذا البيان، في ظروف تخزين عادية، مع حدوث تفكك degradation أو تحلل decomposition بنسبة قليلة جداً أو عدم حدوثه. ويقصد بالمصطلح 'ثبات الحالة الصلبة' أنه يمكن تخزين المركب على شكل صلب منفصل، أو على شكل تركيبة صلبة يزود فيها خليط، على سبيل المثال، مع مواد ناقلة، مواد

مخففة ومواد مساعدة مقبولة صيدلياً كما وصف في هذا البيان، في ظروف تخزين عادية، مع حدوث تحوّل للحالة الصلبة solid state transformation أو عدم حدوثه (مثلاً تميه hydration، نزع الماء dehydration، تذوّب solvatisation، إزالة الذواب desolvatisation، تبلور crystallisation، إعادة التبلور أو تحول transition الطور في الحالة الصلبة).

ويشير المصطلحين "غير ماص للرطوبة" و"عدم امتصاص الرطوبة" والمصطلحات المتعلقة بها كما استخدمت في هذا البيان إلى المواد التي تعمل على امتصاص الماء بنسبة تقل عن ٥% وزناً (بالنسبة لوزنها) عند تعرضها لظروف رطوبة مرتفعة نسبياً، على سبيل المثال، رطوبة نسبتها ٩٠% نسبياً، و/أو لا يحدث لها تغييرات في الشكل البلوري في ظروف مرتفعة الرطوبة و/أو لا تمتص الماء إلى كتلة البلورة (الماء الداخلي) في ظروف رطوبة مرتفعة نسبياً.

ومن الأملاح المفضلة المستخدمة في تحضير التراكيب الصيدلية السائلة (مثلاً المائية) أملاح بالإضافة إلى حمض (مثل المسيلات mesylate والأسيتات acetate ومخاليط منها كما عرفت في هذا البيان) لها ذائبية في مادة ناقلة سائلة محددة (مثل الماء) تزيد عن ١٥ ملغم/ملم من المادة الناقلة السائلة (مثلاً الماء)، والأكثر اعتيادياً أن يزيد عن ٢٠ ملغم/مل، ويفضل أن يزيد عن ٢٥ ملغم/مل، والأفضل أن يزيد عن ٣٠ ملغم/مل.

وفي وجه آخر، يتم تزويد تركيب صيدلي يشتمل على محلول مائي يحتوي على ملح بالإضافة إلى حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide (مثل المسيلات mesylate والأسيتات acetate ومخاليط منهما كما عرّفت في هذا البيان، ويفضل المسيلات mesylate) بتركيز يكون أكبر من ١٥ ملغم/مل وعادة أكبر من ٢٠ ملغم/مل ويفضل أكبر من ٢٥ ملغم/مل والأفضل أكبر من ٣٠ ملغم/مل.

وفي تجسيد مفضل، يشتمل التركيب الصيدلي على محلول مائي يحتوي على ملح بالإضافة إلى حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide يختار من ملح أسيتات acetate أو ميثان

كبريتونات methanesulphonate أو مزيج منهما بتركيز يكون أكبر من ١٥ ملغم/مل وعادة أكبر من ٢٠ ملغم/مل ويفضل أكبر من ٢٥ ملغم/مل والأفضل أكبر من ٣٠ ملغم/مل.

وفي وجه آخر، يزوّد الاختراع محلولاً مائياً من ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide (مثل المسيلات mesylate والأسيتات acetate ومخاليط منهما كما عرّفت في هذا البيان) حيث يكون للمحلول المائي درجة حموضة تتراوح من ٢ إلى ١٢ مثلاً من ٢ إلى ٩ وبالأخص من ٤ إلى ٧.

وفي المحاليل المائية المعرّفة أعلاه، يمكن أن يكون الملح بالإضافة إلى حمض أي من الأملاح الموصوفة هنا لكنه يكون، في أحد التجسيدات المفضلة، عبارة عن ملح مسيلات mesylate أو أسيتات acetate كما عرّف في هذا البيان، وبالأخص ملح مسيلات mesylate.

ويزود الاختراع أيضاً محلولاً مائياً لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide على شكل بروتوني protonated form مع أيون معاكس counter ion واحد أو أكثر واختيارياً أيون معاكس إضافي واحد أو أكثر. وفي أحد التجسيدات يتم اختيار أحد الأيونات المعاكسة من ميثان كبريتونات methanesulphonate وأسيتات acetate. وفي تجسيد آخر يتوفر أحد الأيونات المعاكسة من المحلول المنظم لدرجة حموضة التركيبة كما هو موصوف هنا مثل الأسيتات acetate. وفي تجسيد آخر يمكن أن يوجد أيون معاكس آخر واحد أو أكثر مثل أيون كلوريد chloride ion (مثلاً من محلول ملحي saline).

ولذلك يزوّد الاختراع محلولاً مائياً من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide على شكل بروتوني مع أيون معاكس واحد أو أكثر يختار من ميثان كبريتونات methanesulphonate وأسيتات acetate واختيارياً مع أيون معاكس آخر واحد أو أكثر مثل أيون كلوريد chloride ion.

وفي الحالة التي يوجد فيها أكثر من أيون معاكس، من المحتمل أن يحتوي المحلول المائي من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-

ylamide الموجود على شكل بروتوني على مزيج من أيونات معاكسة، على سبيل المثال مزيج من أيونات معاكسة من ميثان كبريتونات methanesulphonate وأسيتات acetate واختيارياً أيون معاكس إضافي واحد أو أكثر مثل أيون كلوريد chloride ion.

ولذلك يزود الاختراع محلولاً مائياً من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide على شكل بروتوني مع أيون معاكس واحد أو أكثر يختار من ميثان كبريتونات methanesulphonate وأسيتات acetate واختيارياً مع أيون معاكس آخر واحد أو أكثر مثل أيون كلوريد chloride ion ومزيج منها.

ويمكن تشكيل المحاليل المائية عن طريق، من بين طرق أخرى، إذابة ملح مسيلات mesylate في محلول من أيونات الأسيتات acetate ions (مثلاً محلول منظم لدرجة الحموضة من الأسيتات acetate) أو عن طريق إذابة ملح أسيتات acetate في محلول من أيونات مسيلات mesylate ions. ويمكن أن توجد أيونات المسيلات mesylate والأسيتات acetate في المحلول بنسبة من المسيلات mesylate:الأسيتات acetate تتراوح من ١:١٠ أو أقل، مثلاً من ١:١٠ إلى ١٠:١ والأفضل أقل من ١:٨، او أقل من ١:٧ أو أقل من ١:٦ أو أقل من ١:٥ أو أقل من ١:٤ أو أقل من ١:٣ أو أقل من ١:٢ أو أقل من ١:١، وبالتحديد من ١:١ إلى ١٠:١. وفي أحد التجسيدات، توجد أيونات المسيلات mesylate والأسيتات acetate في المحلول بنسبة من المسيلات mesylate:الأسيتات acetate تتراوح من ١:١ إلى ١٠:١، مثلاً من ١:١ إلى ٨:١ أو من ١:١ إلى ٧:١ أو من ١:١ إلى ٦:١ أو من ١:١ إلى ٥:١ مثلاً حوالي ٤.٨:١.

ويمكن تنظيم درجة حموضة المحاليل المائية للأملاح أو عدم تنظيمها لكن في أحد التجسيدات يتم تنظيمها.

وفي سياق الكلام عن الملح بالإضافة إلى حمض المتشكل مع حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic، يكون المحلول المنظم لدرجة الحموضة المفضل هو عبارة عن محلول منظم يتكون من حمض الأسيتيك acetic acid وأسيتات الصوديوم sodium acetate على سبيل المثال عند درجة حموضة للمحلول تبلغ حوالي ٤.٦. وعند درجة الحموضة هذه وفي محلول منظم لدرجة الحموضة من الأسيتات acetate، يكون لملح حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic ذائبية تبلغ حوالي ٣٥ ملغم/مل.

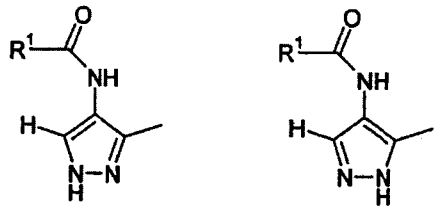
وعادة ما تكون الأملاح وفقاً للاختراع عبارة عن أملاح مقبولة صيدلياً وتوصف أمثلة على هذه الأملاح فيما جاء عن بيرغ Berge ومعاونيه، ١٩٧٧م، في بحث بعنوان "Pharmaceutically Acceptable Salts"، مجلة J. Pharm. Sci.، المجلد ٦٦، ص ١-١٩. غير أنه يمكن أيضاً تحضير الأملاح غير المقبولة صيدلياً في صورة أشكال وسيطة intermediate forms يمكن تحويلها فيما بعد إلى أملاح مقبولة صيدلياً. ولذلك فإن هذه الأشكال من الأملاح غير المقبولة صيدلياً تشكل أيضاً جزءاً من الاختراع.

ويمكن أيضاً أن يشكل المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أكاسيد نتروجينية N-oxides. ويمكن تشكيل الأكاسيد النتروجينية N-oxides عن طريق معالجة الأمين amine الملائم مع عامل أكسدة oxidizing agent مثل بيروكسيد الهيدروجين hydrogen peroxide أو حمض فوقي per-acid (مثل حمض بيروكسي كربوكسيليك peroxycarboxylic)، أنظر على سبيل المثال كتاب Advanced Organic Chemistry، باسم جيري مارتش Jerry March، الطبعة الرابعة، وايلي انترسينس Wiley Interscience. وبشكل أكثر تحديداً يمكن تحضير الأكاسيد النتروجينية N-oxides بواسطة طريقة إل. دبليو. ديدي L. W. Deady (مجلة Syn. Comm.، ١٩٧٧م، المجلد ٧، ص ٥٠٩-٥١٤) حيث يتم فيها مفاعلة مركب الأمين amine مع حمض ميتا-كلوروبيروكسي بنزويك m-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA) مثلاً في مذيب خامل inert solvent مثل ثنائي كلوروميثان dichloromethane.

وقد يوجد المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، الذي يتم منه اشتقاق الأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع في عدة أشكال زميرية تناوبية tautomeric forms مختلفة وتشمل الإشارة إلى هذا المركب في هذا الطلب جميع هذه الأشكال.

وبشكل أكثر تحديداً، يمكن أن توجد حلقة البيرازول pyrazole للمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide في الأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع في صورة الشكلين الزميريين التناوبيين A tautomeric forms

و B المبينين أدناه. وللسهولة، تبيّن الصيغ في هذا الطلب الشكل A فقط ومع ذلك تعتبر الصيغ بأنها تتضمن كل من الشكلين الزميريين التناوبيين.



A B

كما أنه في سياق الكلام عن الأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع تتضمن أيضاً الإشارة إلى بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأملاحه أشكالاً مختلفة تحتوي على بديل واحد أو أكثر من النظائر isotopes وتتضمن الإشارة إلى عنصر معين ضمن مجال الاختراع جميع نظائر هذا العنصر. فعلى سبيل المثال، تتضمن الإشارة إلى الهيدروجين hydrogen، ضمن مجال الاختراع، ^{1}H، $^{2}H(D)$، $^{3}H(T)$. وبالمثل تتضمن الإشارة إلى الكربون carbon والأكسجين oxygen ضمن مجاله بالترتيب ^{12}C، ^{13}C و^{14}C و^{16}O و^{18}O.

ويمكن أن تكون النظائر مشعة radioactive أو غير مشعة. وفي أحد تجسيدات الاختراع، لا تحتوي المركبات على نظائر مشعة. وتكون هذه المركبات مفضلة للاستخدام العلاجي. وفي تجسيد آخر، يمكن أن يحتوي المركب على نظير مشع واحد أو أكثر. ويمكن أن تكون المركبات التي تحتوي على هذه النظائر المشعة مفيدة في المجال التشخيصي diagnostic.

وكما تتضمن الإشارة إلى أملاح بالإضافة إلى حمض (مثل ملح المسيلات mesylate) لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أي أشكال متعددة (بلورية) polymorphic forms، ذوابات solvates (مثل الهيدرات hydrate)، متراكبات complexes (مثل متراكبات تضمينية inclusion complexes أو مركبات قفصية clathrates مع مركبات دكسترين حلقي cyclodextrins أو متراكبات مع فلزات metals) منها.

بنيات بلورية crystal Structures لأملاح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide.

كما وصف أعلاه، يمكن أن تكون الأملاح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير متبلورة amorphous أو بلورية crystalline جوهرياً. وفي تجسيد خاص، تكون الأملاح بلورية جوهرياً ويكون للمصطلح "بلوري جوهرياً substantially crystalline" المعنى المعرَّف أعلاه. وبشكل خاص تكون أملاح المسيلات mesylate والأسيتات acetate لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide بلورية جوهرياً.

وتشكّل الأملاح الموصوفة هنا وبنياتها البلورية أوجهاً أخرى للاختراع.

ويمكن تمييز البلورات وبنياتها البلورية باستخدام عدة تقنيات تتضمن دراسة بلورة واحدة بالأشعة السينية single crystal X-ray crystallography، حيود الأشعة السينية للمسحوق X-ray powder diffraction (XRPD)، قياس الحرارة بالمسح التفاضلي differential scanning calorimetry (DSC)، وقياس طيف الأشعة تحت الحمراء infra red spectroscopy مثل قياس طيف الأشعة تحت الحمراء وفقاً لمحوّل فورييه Fourier Transform infra-red spectroscopy (FTIR). ولكن يمكن تحليل سلوك البلورات في ظروف متفاوتة الرطوبة humidity عن طريق دراسات امتصاص البخار الثقالي gravimetric vapour sorption studies وكذلك عن طريق XRPD.

ويمكن تحديد البنية البلورية لمركب معين عن طريق دراسة البلورات بالأشعة السينية التي يمكن إجراؤها وفقاً للطرق التقليدية مثل تلك الموصوفة هنا وفي كتاب Fundamentals of Crystallography باسم سي. جياكوفازو C. Giacovazzo، إتش.إل. موناكو H. L. Monaco، دي. فيتربو D. Viterbo، إف. سكورداري F. Scordari، جي. جلي G. Gilli، جي. زانوتي G. Zanotti وإم. كاتي M. Catti (الاتحاد الدولي لدراسة البلورات International Union of Crystallography/أكسفورد يونيفيرسيتي برس Oxford University Press، ١٩٩٢م، رقم الكتاب وفقاً

للمعيار الدولي international standard book number (ISBN) هو (P/b) 0-19-855578-4، 0-19-85579-2 (h/b). وتتضمن هذه التقنية تحليل وتفسير حيود الأشعة السينية لبلورة واحدة.

ولقد تم تحديد البنية البلورية لملح حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide عن طريق دراسة البلورات بالأشعة السينية-انظر المثال ٢ أدناه.

ويبين الجدول ٢ بيانات إحداثية coordinate data لبلورات من ملح مسيلات لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide في نموذج لملف Crystallographic Information File (CIF) (انظر ما جاء عن هال Hall، ألن Allen وبراون Brown، في مجلة Acta Cryst (١٩٩١م)، المجلد A47، ص ٦٥٥-٦٨٥، عنوان البريد الإلكتروني http://www.iucr.ac.uk./iucr-top/cif/home.html). ويمكن استخدام نماذج ملفات بديلة مثل نموذج ملف PDB (مثلاً نموذج متفق مع قاعدة بيانات البنية الجزيئية الكبيرة EBI Macromolecular Structure Database EBI (مدينة هنكستون Hinxton، المملكة المتحدة) أو قد تكون مفضلة من قبل أشخاص آخرين متمرسين في التقنية. غير أنه من الواضح أن استخدام نموذج مختلف للملف لعرض أو معالجة الإحداثيات المبينة في الجداول هو من ضمن مجال الاختراع الراهن. ويوضح الشكلان ١ و٢ البنية البلورية لملح المسيلات mesylate salt.

ومن دراسات البلورات بالأشعة السينية، وجد أن لملح المسيلات mesylate salt بنية بلورية تنتمي إلى مجموعة فراغية معينية orthorhombic space group مثل Pbca (رقم ٦١) ووسائط للشبكة البلورية crystal lattice parameters عند ٩٣ كلفن تتمثل في a= ٨.٩٠(١٠)، b= ١٢.٤٤(١٠)، c= ٣٨.٤٩(٤) وحدة انغستروم angstrom unit (A°)، حيث $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$.

وعليه، يزوّد الاختراع، في تجسيد آخر، ملحاً من حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt من ملح مسيلات لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide الذي يكون بلورياً ويكون له ما يلي:

(أ) بنية بلورية crystal structure كما هو مبين في الشكلين ١ و٢؛ و/أو

(ب) بنية بلورية crystal structure كما عرفت بواسطة الإحداثيات coordinates المبينة في المثال ٢ في هذا البيان؛ و/أو

(جـ) وسائط للشبكة البلورية crystal lattice parameters عند ٩٣ كلفن Kelvin تتمثل في a= ٨.٩٠(١٠)، b= ١٢.٤٤(١٠)، c= ٣٨.٤٩(٤) وحدة انغستروم Angstrom unit، حيث ∝=β=γ=٩٠°؛ و/أو

(د) بنية بلورية crystal structure تنتمي إلى مجموعة فراغية معينية orthorhombic space group مثل Pbca (رقم ٦١).

وبشكل بديل، يمكن تحليل البنية البلورية لمركب معين بتقنية الحالة الصلبة solid state technique لحيود الأشعة السينية للمسحوق X-ray Powder Diffraction(XRPD). ويمكن إجراء XRPD وفقاً لطرق تقليدية مثل تلك الموصوفة هنا (انظر المثال ٦) وفي مقدمة كتاب بعنوان X-ray Powder Diffraction، باسم رون جنكنز Ron Jenkins وروبرت إل. سنيدر Robert L. Snyder (إصدار جون وايلي آند صنز John Wiley & Sons، نيويورك، ١٩٩٦م). ويشير وجود ذروات محددة (بعكس ضجيج الخلفية العشوائي random background noise) في مخطط حيود الأشعة السينية للمسحوق أن المركب له درجة من التبلور degree of crystallinity.

ويتميز نمط الأشعة السينية لمسحوق لمركب بالوسائط: زاوية الحيود diffraction angle (θ٢) والمسافة الفاصلة بين المستويات interplanar spacing (d) لطيف حيود الأشعة السينية. وترتبط هذ الوسائط بمعادلة براغ Bragg's equation، nλ =2dSinθ (حيث n= ١، λ= طول موجة wavelength الكاثود cathode المستخدم، d= المسافة الفاصلة بين المستويات و θ= زاوية الحيود). وهنا، تكون المسافات الفاصلة بين المستويات، زاوية الحيود والنمط الكلي مهمة لتمييز بلورة في حيود الأشعة السينية للمسحوق، بسبب مميزات البيانات. وينبغي عدم تفسير الشدة النسبية relative intensity تماماً حيث أنها قد تتغير اعتماداً على اتجاه نمو البلورة crystal growth، أحجام الجسيمات particle sizes وظروف القياس. وعادة ما يقصد بزوايا الحيود أيضاً تلك الزوايا التي تكون موافقة للمدى θ٢ ± ٠.٢°. ويقصد بالذروات الذروات الرئيسية وتتضمن ذروات لا تكون أكبر من الوسطى عند زوايا حيود غير تلك المذكورة أعلاه.

ويتم تمييز كل من أملاح حمض الأسيتيك acetic acid وحمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide بواسطة XRPD.

ويكون لملح حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide نمط حيود للأشعة السينية للمسحوق كما هو مبين في الشكل ٣ بصفة أساسية.

ويكون لملح حمض أسيتيك acetic acid بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide نمط حيود للأشعة السينية للمسحوق كما هو مبين في الشكل ٤ بصفة أساسية.

وفي كل حالة، يتم التعبير عن أنماط حيود الأشعة السينية للمسحوق بدلالة زاوية الحيود (θ٢)، المسافة بين المستويات (d) والشدات النسبية.

وعليه، يزود الاختراع في تجسيد آخر ملحاً من حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide يكون بلورياً بصفة جوهرية وله نمط حيود للأشعة السينية للمسحوق يتميز بوجود ذروات رئيسية عند زوايا الحيود (θ٢) والمسافات الفاصلة بين المستويات (d) المبينة في الجدول أ.

الجدول أ

°/Θ٢	d/وحدة أنغستروم
١٦.٦	٥.٣٤
١٨.٣	٤.٨٥
١٨.٤٥	٤.٨١
١٩.٤٥	٤.٥٦

٢٢.٩	٣.٨٨

ومن المفضل أن يتميز نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق بشكل إضافي بوجود ذروات إضافية عند زوايا الحيود (θ٢) والمسافات الفاصلة بين المستويات (d) المبينة في الجدول ب.

٥

الجدول ب

°/Θ٢	d/ وحدة أنغستروم
١٢.٨	٦.٩١
٢١.٤٠	٤.١٥
٢٢.٠٠	٤.٠٤
٢٣.٥٠	٣.٧٨
٢٥.٠٠	٣.٥٦

ويمكن أيضاً أن يتميز نمط الحيود الأشعة السينية للمسحوق بوجود ذروات عند زوايا الحيود (θ٢) والمسافات الفاصلة بين المستويات (d) ويفضل الشدات المبينة في الجدول جـ.

الجدول جـ

°/Θ٢	d/ وحدة أنغستروم	I
٤.٥٥	١٩.٤١	١٢
١٠.٨٠	٨.١٩	٩
١٢.٢٥	٧.٢٢	١٥
١٢.٨٠	٦.٩١	٥٦
١٣.٤٠	٦.٦٠	١٢
١٣.٥٥	٦.٥٣	٢٦
١٤.٠٠	٦.٣٢	٧
١٤.٧٥	٦.٠٠	٨
١٥.٥٠	٥.٧١	٢٥
١٦.٦٠	٥.٣٤	١٠٠

١٧.٣٠	٥.١٢	١٥
١٧.٧٥	٤.٩٩	١٦
١٨.٣٠	٤.٨٥	٩٠
١٨.٤٥	٤.٨١	٦٥
١٩.٤٥	٤.٥٦	٦٥
٢٠.٨٠	٤.٢٧	١٨
٢١.٤٠	٤.١٥	٤٠
٢٢.٠٠	٤.٠٤	٤٢
٢٢.٩٠	٣.٨٨	٧١
٢٣.٥٠	٣.٧٨	٤٥
٢٣.٩٠	٣.٧٢	٢٧
٢٤.٤٠	٣.٦٥	٣٢
٢٥.٠٠	٣.٥٦	٦١
٢٦.٠٠	٣.٤٣	١٨
٢٦.٥٠	٣.٣٦	٢٠
٢٧.٠٠	٣.٣٠	٣٠
٢٨.٠٠	٣.١٨	١٤
٢٨.٤٠	٣.١٤	١٤
٢٨.٧٠	٣.١١	١٧

ويزود الاختراع أيضاً مادة بلورية جوهرياً من ملح من حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide لها ذروات عند زوايا حيود مماثلة لتلك في نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق المبين في الشكل ٣. ومن المفضل أن يكون لهذه الذروات شدة نسبية مماثلة لتلك للذروات المبينة في الشكل ٣.

وفي تجسيد مفضل، يزود الاختراع مادة بلورية جوهرياً من ملح من حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide لها نمط لحيود الأشعة السينية للمسحوق كما هو مبين في الشكل ٣ جوهرياً.

ويزود الاختراع أيضاً مادة بلورية جوهرياً من ملح من حمض أسيتيك acetic acid لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide لها ذروات عند زوايا حيود مماثلة لتلك في نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق المبين في الشكل ٤. ومن المفضل أن يكون لهذه الذروات شدة نسبية مماثلة لتلك للذروات المبينة في الشكل ٤.

وفي تجسيد مفضل، يزود الاختراع مادة بلورية جوهرياً من ملح من حمض أسيتيك acetic acid لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide لها نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق كما هو مبين في الشكل ٤ جوهرياً.

ويمكن تمييز الأملاح بالإضافة إلى حمض البلورية crystalline acid addition salts وفقاً للاختراع بقياس الحرارة بالمسح التفاضلي differential scanning calorimetry (DSC).

وقد تم تمييز ملح المسيلات mesylate salt بواسطة DSC وأظهر ذروة عند ٣٧٩.٨°م بسبب تحلل decomposition المركب.

وعليه يزود الاختراع في وجه آخر ملح مسيلات mesylate salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide يكون لامائياً anhydrous ويظهر ذروة ماصة للحرارة endothermic peak عند درجات حرارة تتراوح من ٣٧٩ إلى ٣٨٠°م، مثلاً ٣٧٩.٨°م عند إخضاعه لـ DSC.

وقد تم تحليل ملح الأسيتات acetate salt بواسطة DSC وأظهر ذروة عند ٢٣١.٥°م بسبب فقد حمض الأسيتيك acetic acid وذروة أخرى عند ٢٩٢.٨٨°م بسبب تحلل المركب. ويشير عدم وجود ذروات عند درجات حرارة منخفضة إلى أن ملح الأسيتات acetate salt يكون لامائياً.

وعليه يزود الاختراع في وجه آخر ملحاً من حمض أسيتيك acetic acid لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide يكون لامائياً

ويظهر ذروات ماصة للحرارة endothermic peaks عند درجات حرارة تتراوح من ٢٣١ إلى ٢٣٢°م (مثلاً ٢٣١.٥°م) ودرجات حرارة تتراوح من ٢٩٢ إلى ٢٩٣°م (مثلاً ٢٩٢.٨٨°م) عند إخضاعه لـ DSC.

وعندما يكون الملح بالإضافة إلى حمض acid addition salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide بلورياً بصفة جوهرية، فإنه يمكن أن يسود شكل بلوري واحد، مع أنه قد توجد أشكال بلورية أخرى بكميات قليلة ويفضل بكميات مهملة.

وفي تجسيد مفضل، يزوّد الاختراع ملحاً بالإضافة إلى حمض acid addition salt يكون بلورياً بصفة جوهرية (مثلاً ملح مسيلات mesylate أو أسيتات acetate كما عرّف هنا) من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide يشتمل على شكل بلوري واحد من الملح بالإضافة إلى حمض وما لا يزيد عن ٥% وزناً من أشكال بلورية أخرى من الملح بالإضافة إلى الحمض.

ومن المفضل أن يرافق الشكل البلوري المفرد أشكال بلورية أخرى بنسبة تقل عن ٤% أو تقل عن ٣% أو تقل عن ٢%، وبالأخص أن يحتوي على أشكال بلورية أخرى بنسبة لا تزيد عن حوالي ١% وزناً. والأفضل أن يرافق الشكل البلوري المفرد أشكال بلورية أخرى بنسبة تقل عن ٠.٩% أو تقل عن ٠.٨% أو تقل عن ٠.٧% أو تقل عن ٠.٦% أو تقل عن ٠.٥% أو تقل عن ٠.٤% أو تقل عن ٠.٣% أو تقل عن ٠.٢% أو تقل عن ٠.١% أو تقل عن ٠.٠٥% أو تقل عن ٠.٠١% وزناً، على سبيل المثال صفر% وزناً.

ومن المفضل أن تكون الأملاح بالإضافة إلى حمض البلورية جوهرياً خالية جوهرياً من أي بقايا لمذيب عضوي organic solvent مستخدم، وذلك من أجل، مثلاً، إعادة تبلور أو تنقية الملح، أو مذيب آخر مثل الماء.

ولذلك تكون، في أحد التجسيدات، بلورات الأملاح بالإضافة إلى حمض (مثل أملاح ميثان-كبريتونات methane-sulphonate أو أسيتات acetate) لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-

1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide عبارة عن بلورات تحتوي على بقايا من المذيب (مثلاً الماء أو مذيب عضوي) بنسبة تقل عن ١٠% وزناً، وعلى سبيل المثال بنسبة تقل عن ٥%، مثلاً تقل عن ٤% أو تقل عن ٣% أو تقل عن ٢% أو تقل عن ١% أو تقل عن ٠.٥%.

وفي أحد التجسيدات، تكون الأملاح بالإضافة إلى حمض البلورية (مثلاً أملاح ميثان-كبريتونات methane-sulphonate أو أسيتات acetate) لا بلورية، ويكون للمصطلح "لا بلوري anhydrous" المعنى المحدَّد أعلاه.

ويمكن أن يوجد ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt على شكل بلوري لامائي مستقر لا تتغير بنيته البلورية في ظروف الرطوبة النسبية المرتفعة مع أنه يمتص جزء من الماء السطحي في مثل هذه الظروف.

ويمكن تحليل سلوك الأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع في ظروف الرطوبة المرتفعة بطرق امتصاص البخار الثقالي العياري standard gravimetric vapour sorption (GVS)، كما وصف في المثال ٧ مثلاً.

ويمكن أيضاً تمييز الأملاح بالإضافة إلى حمض عن طريق قياس طيف الأشعة تحت الحمراء infra-red spectroscopy مثلاً قياس طيف الأشعة تحت الحمراء وفقاً لمحول فورييه Fourier transform infra-red spectroscopy (FTIR).

ويحتوي طيف الأشعة تحت الحمراء لملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt (وفقاً لطريقة قرص KBr disc method KBr) على ذروات مميزة عند ٣٢٣٣، ٣٠٠٢، ٢٨٢٩، ١٦٧٩، ١٦٣٢، ١٥٦٠، ١٤٣٠، ١١٩٨، ١٠٣٧، ٩٠٩ و٧٨٤ سم$^{-١}$.

وعليه يزود الاختراع وفقاً لتجسيد آخر ملحاً من حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt (يفضل أن يكون بلورياً بصفة جوهرية) من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide له طيف للأشعة تحت الحمراء، عند تحليله باستخدام طريقة قرص KBr، يشتمل على الذروات المميزة عند ٣٢٣٣، ٣٠٠٢، ٢٨٢٩، ١٦٧٩، ١٦٣٢، ١٥٦٠، ١٤٣٠، ١١٩٨، ١٠٣٧، ٩٠٩ و٧٨٤ سم$^{-١}$.

وسيكون واضحاً من الفقرات السابقة أنه يمكن تمييز الأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع بعدة وسائط كيميائية فيزيائية physicochemical parameters مختلفة. وعليه يزود الاختراع في تجسيد مفضل ملحاً لحمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt من ملح مسيلات mesylate salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide يكون بلورياً ويتميز بوسيط واحد أو أكثر (في أية توليفة) من الوسائط التالية أو بجميعها، وبالتحديد يكون للملح ما يلي:

(أ) بنية بلورية crystal structure كما هو مبين في الشكلين ١ و٢؛ و/أو

(ب) بنية بلورية كما عرفت بواسطة الإحداثيات المبينة في المثال ٢؛ و/أو

(جـ) وسائط للشبكة البلورية عند ٩٣ كلفن تتمثل في a= ٨.٩٠(١٠)، b= ١٢.٤٤(١٠)، c= ٣٨.٤٩(٤) وحدة انغستروم، حيث $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$؛ و/أو

(د) بنية بلورية تنتمي إلى مجموعة فراغية معينية مثل Pbca (رقم ٦١)؛ و/أو

(هـ) نمط حيود أشعة سينية للمسحوق يتميز بوجود ذروات رئيسية عند زوايا الحيود ($\theta 2$) والمسافات الفاصلة بين المستويات (d) المبينة في الجدول أ، واختيارياً الجدول ب، فعلى سبيل المثال حيث يتميز نمط حيود اظلشعة السينية للمسحوق بوجود ذروات رئيسية عند زوايا الحيود ($\theta 2$)، المسافات الفاصلة بين المستويات (d) والشدات المبينة في الجدول جـ أعلاه؛ و/أو

(و) ذروات عند زوايا حيود مماثلة لتلك في نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق المبين في الشكل ٣ واختيارياً حيث يكون للذروات شدة نسبية مماثلة لتلك للذروات المبينة في الشكل ٣؛ و/أو

(ز) نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق كما هو مبين في الشكل ٣ جوهرياً؛ و/أو

(ح) حالة لامائية وذروة ماصة للحرارة عند درجات حرارة تتراوح من ٣٧٩ إلى ٣٨٠°م، مثلاً ٣٧٩.٨°م عند إخضاعه لـ DSC؛ و/أو

(ط) طيف الأشعة تحت الحمراء، عند تحليله باستخدام طريقة قرص KBr، يحتوي على الذروات مميزة عند ٣٢٣٣، ٣٠٠٢، ٢٨٢٩، ١٦٧٩، ١٦٣٢، ١٥٦٠، ١٤٣٠، ١١٩٨، ١٠٣٧، ٩٠٩ و٧٨٤ سم$^{-1}$.

عمليات لتحضير بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide

في المثال ٢٣٧ من الطلب البريطاني السابق باسم مقدمي الطلب رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع (طلب براءة الاختراع الدولي ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦)، كشف أنه يمكن تحضير بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide عن طريق سلسلة الخطوات التالية:

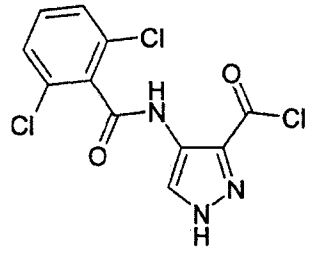
(i) مفاعلة حمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid مع ٤-أمينو-١-ثث-بيوتيلوكسي كربونيل-بيبريدين 4-amino-1-tert-butyloxycarbonyl-piperidine في وجود ١-إثيل-٣-(٣'-ثنائي مثيل أمينو بروبيل)-كربوثنائي إيميد 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) و١-هيدروكسي بنزوتريازول 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) في ثنائي مثيل فورماميد dimethyl formamide (DMF) لإنتاج الشكل الموقى بـ Boc عند ذرة النتروجين N-Boc protected من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide؛ و

(ii) إزالة المجموعة الواقية Boc عن طريق المعالجة بحمض الهيدروكلوريك hydrochloric acid.

ولقد وجد حالياً أنه بدلاً من استخدام EDC و HOBt لتعزيز تكوُّن رابطة الأميد amide bond، فإنه يمكن مفاعلة كلوريد الحمض acid chloride من حمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid مع ٤-أمينو بيبريدين 4-aminopiperidine حيث يتم وقاية ذرة النتروجين في البيبريدين piperidine nitrogen.

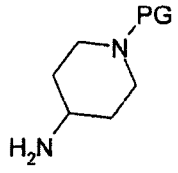
وعليه يزود الاختراع في وجه آخر عملية لتحضير بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-

1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح منه، حيث تتضمن هذه العملية مفاعلة المركب بالصيغة (XI):



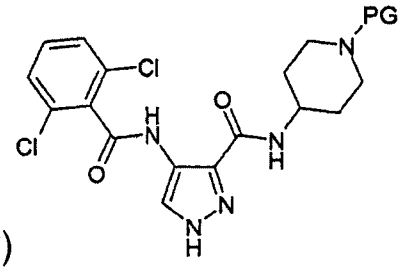
(XI)

مع مركب بالصيغة (XII):



(XII)

حيث يمثل PG مجموعة واقية للأمين amine-protecting group، في مذيب عضوي في وجود قاعدة غير دخيلة non-interfering base مثل ثلاثي إثيل أمين triethylamine لإنتاج مركب بالصيغة (XIII):



(XIII)

ثم إزالة المجموعة الواقية PG لإنتاج بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح منه؛ واختياريا إعادة تبلور الملح لإنتاج شكل بلوري مثلاً شكل بلوري كما عرِّف هنا.

ويمكن أن تكون المجموعة الواقية للأمين PG أي مجموعة واقية يعرف استخدامها كمجموعات واقية للأمين amine في الظروف المستخدمة في العملية السابقة. وتوجد أمثلة على

مجموعات واقية وطرق لإضافة المجموعة الواقية إلى مجموعات وظيفية functional groups ونزعها عنها في كتاب بعنوان Protective Groups in Organic Synthesis (تي. غرين T. Green و بيه. وتس P. Wuts، الطبعة الثالثة، إصدار جون وايلي آند صنز John Wiley and Sons، ١٩٩٩م). وهكذا يمكن، على سبيل المثال، وقاية النتروجين في حلقة البيبريدين piperidine ring nitrogen في صورة أميد (NCO-R) amide أو يوريثان (-NCO-OR) urethane، على سبيل المثال، مثل: أميد المثيل (-NCO-CH_3) methyl amide؛ أميد بنزيلوكسي benzyloxy amide (-NCO-$OCH_2C_6H_5$، -NH-Cbz)؛ مثل أميد ثث-بيوتوكسي t-butoxy amide (-NCO-$OC(CH_3)_3$، -N-Boc)؛ أميد ٢-ثنائي فنيل-٢-بروبوكسي 2-biphenyl-2-propoxy amide (-NHCO-$OC(CH_3)_2C_6H_4C_6H_5$، -NH-Bpoc)، مثل أميد ٩-فلورينيل مثوكسي 9-fluorenylmethoxy amide (-N-Fmoc)، مثل أميد ٦-نتروفيراتريلوكسي 6-nitroveratryloxy amide (-N-Nvoc)، مثل أميد ٢-ثلاثي مثيل سليل إثيلوكسي 2-trimethylsilylethyloxy amide (-N-Teoc)، مثل أميد ٢، ٢، ٢-ثلاثي كلوروإثيلوكسي 2,2,2-trichloroethyloxy amide (-N-Troc)، مثل أميد أليلوكسي allyloxy amide (N-Alloc)، أو مثل أميد ٢ (-فنيل كبريتونيل) إثيلوكسي 2(-phenylsulphonyl)ethyloxy amide (-N-Psec). وتشتمل مجموعات أخرى واقية للأمينات amines على مجموعات تولوين كبريتونيل toluenesulphonyl (توسيل tosyl) وميثان كبريتونيل methansulphonyl (مسيل mesyl) ومجموعات بنزيل benzyl مثل مجموعة بارا-مثوكسي بنزيل para-methoxy benzyl (PMP). والمجموعات الواقية للأمين amine protecting groups المفضلة هي مجموعة اليوريثان urethane (NCO-OR)، على سبيل المثال أميد بنزيلوكسي benzyloxy amide (-NCO-$OCH_2C_6H_5$، -NH-Cb_z) أو أميد ثث-بيوتوكسي tert-butoxy amide (-NCO-$OC(CH_3)_3$، N-Boc)؛ أميد أليلوكسي allyloxy amide (N-Alloc) أو بارا-مثوكسي بنزيل para-methoxybenzyl (PMB). والمجموعة الواقية المفضلة بشكل خاص PG هي ثث-بيوتيلوكسي كربونيل tert-butyloxycarbonyl التي يمكن إزالتها في ظروف حمضية.

وعندما تكون المجموعة الواقية PG عبارة عن مجموعة يمكن إزالتها في ظروف حمضية، فإنه يمكن اختيار الحمض الذي يستخدم لإزالة المجموعة الواقية PG بحيث يزوِّد بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide على شكل ملح

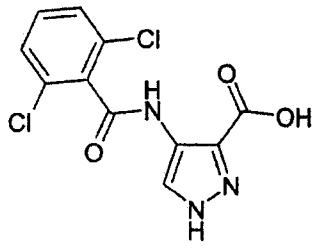
معين. وهكذا، على سبيل المثال، عندما تكون المجموعة الواقية عبارة عن مجموعة Boc، فإن حمض الهيدروكلوريك hydrochloric acid يستخدم من أجل شق المجموعة الواقية Boc وإنتاج ملح هيدروكلوريد hydrochloride salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide. وبشكل بديل ومفضل، يمكن استخدام حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid من أجل شق المجموعة Boc وإنتاج ملح لحمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide.

ويزوّد الاختراع أيضاً طريقة لتحضير مركب وسيط intermediate بالصيغة (XIII) عن طريق مفاعلة المركب بالصيغة (XI) مع المركب بالصيغة (XII) في الظروف المحدَّدة هنا.

ويزوّد الاختراع أيضاً مركب كيميائي وسيط يكون جديداً بحد ذاته بالصيغة (XI).

وفي وجه آخر، يزود الاختراع عملية لتحضير بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح منه، حيث تتضمن العملية:

(أ) معالجة مركب بالصيغة (XIV):



(XIV)

مع كلوريد ثيونيل thionyl chloride في مذيب عضوي لابروتوني non-protic organic solvent، واختيارياً مع التسخين؛

(ii) مفاعلة المنتج من الخطوة (i) مع مركب بالصيغة (XII) في وجود قاعدة غير دخيلة مثل ثلاثي إثيل أمين triethylamine اختيارياً مع التسخين، لإنتاج مركب بالصيغة (XIII)؛ و

(iii) إزالة المجموعة الواقية PG عن المركب بالصيغة (XIII) لإنتاج بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح منه؛ واختيارياً

(iv) إعادة تبلور الملح لإنتاج شكل بلوري، مثلاً شكل بلوري كما عرِّف هنا.

وفي الخطوة (i)، يمكن إجراء التفاعل مع كلوريد الثيونيل thionyl chloride مع التسخين إلى درجة حرارة تتراوح مثلاً من ٨٠ إلى ١٠٠°م. ويكون المذيب الذي تجرى فيه الخطوة (i) عبارة عن مذيب عضوي لابروتوني non-protic organic solvent ويمكن أن يكون، مثلاً، عبارة عن مذيب هيدروكربوني عطري aromatic hydrocarbon solvent مثل التولوين toluene. وبعد اكتمال التفاعل في الخطوة (i)، كما يتم الحكم عليه مثلاً من اختفاء المادة الأولية starting material (XIV)، يمكن إزالة المذيب العضوي، عن طريق، مثلاً، التبخير تحت ضغط منخفض لإنتاج ركاز residue يمكن أن يجفف بشكل إضافي، عن طريق مثلاً التجفيف الازيوتروبي azeotropic drying، لإنتاج ركاز. ثم يمكن مفاعلة الركاز مع المركب بالصيغة (XII) في الخطوة (ii).

وفي الخطوة (ii)، تستخدم قاعدة غير دخيلة. ويقصد بالمصطلح "قاعدة غير دخيلة non-interfering base" في السياق الحالي قاعدة مثل ثلاثي إثيل أمين triethylamine لا تشكل أميد amide مع الحمض (XIII) أو مع كلوريد الحمض acid chloride (XI).

وتجرى الخطوة (ii) عادة مع التسخين المعتدل، إلى درجة حرارة تصل مثلاً إلى حوالي ٥٥°م، وعادة إلى ٥٠°م، مثلاً إلى درجة حرارة في المدى من ٤٥ إلى ٥٠°م.

وفي الخطوة (ii)، يجرى التفاعل في مذيب قطبي لابروتوني polar aprotic solvent مثل رباعي هيدروفوران tetrahydrofuran.

وفي الخطوة (iii)، من المفضل أن تكون المجموعة الواقية عبارة عن مجموعة مثل Boc يمكن إزالتها عن طريق المعالجة بحمض acid، ويتم اختيار الحمض لإنتاج ملح مرغوب من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، على سبيل المثال ملح لحمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt.

وبعد الخطوة (iii)، يمكن إخضاع المنتج لعملية إعادة تبلور (مثلاً باستخدام ٢-بروبانول 2-propanol كمذيب) لزيادة النقاوة وإنتاج شكل بلوري.

وعندما تكون المجموعة الواقية PG عبارة عن مجموعة ثث-بيوتيلوكسي كربونيل tert-butyloxycarbonyl، فإن معدل الإنتاج الكلي overall yield من الخطوات (i)، (ii) و(iii) في العملية بدون أي خطوة من خطوات إعادة التبلور، يكون أكبر من ٨٥%. كما أن العملية تكون مفيدة من حيث أنها تستخدم مواد مفاعلة reagents ومذيبات بسيطة وغير مكلفة نسبياً، وتنتج منتجاً له نقاوة تزيد عن ٩٩% باستخدام تقنيات بسيطة لإعادة التبلور والغسل بمذيب بدون الحاجة للاستشراب chromatography.

ويمكن إجراء إعادة تبلور لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأملاحه بطرق معروفة للشخص المتمرس-انظر على سبيل المثال ما جاء عن المؤلفين بيه. هئينرتيش ستال P. Heinrich Stahl وكاميل. جي. ورموث Camille G. Wermuth، في الكتيب Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use، ISBN: 3-90639-026-8، الفصل ٨، إصدار وايلي-في سي إتش Wiley-VCH. ونادراً ما تكون المنتجات الناتجة من تفاعل عضوي نقية عند فصلها مباشرة من مزيج التفاعل. فإذا كان المركب (أو ملحه) صلباً، فمن الممكن تنقيته و/أو بلورته عن طريق إعادة التبلور في مذيب ملائم. وينبغي أن يؤدي مذيب جيد مستخدم لإعادة التبلور إلى إذابة كمية متوسطة من المادة المراد تنقيتها عند درجات حرارة مرتفعة ولكنه يؤدي إلى إذابة كمية قليلة من المادة عند درجة حرارة منخفضة. وينبغي أن يذيب الشوائب بسرعة عند درجات حرارة منخفضة أو لا يذيبها مطلقاً. وأخيراً، ينبغي أن يزيل المذيب بسهولة من المنتج النقي. وهذا يعني عادة أن للمذيب درجة غليان boiling point منخفضة نسبياً وسيعرف الشخص المتمرس في التقنية مذيبات تستخدم لإعادة التبلور لمادة معينة، وإذا لم تتوفر هذه المعلومات لديه، فعليه اختبار مذيبات عديدة. وللحصول على معدل إنتاج جيد من المادة النقية، يستخدم أقل مقدار من المذيب الساخن لإذابة كل المادة الشائبة. وعملياً، تستخدم كمية من المذيب أكبر بحوالي ٣-٥% من الكمية الضرورية حتى لا يكون المحلول مشبعاً. وإذا احتوى المركب غير النقي على شوائب غير قابلة للذوبان في المذيب، فعندئذ يمكن إزالتها بالترشيح ثم ترك المحلول يتبلور. وبالإضافة لذلك، إذا

احتوى المركب غير النقي على مقادير ضئيلة من مادة ملونة ليست موجودة أصلاً في المركب، فإنه يمكن إزالتها عن طريق إضافة مقدار قليل من فحم مزيل للون decolorizing charcoal إلى المحلول الساخن، ترشيحه ثم السماح له بالتبلور. وعادة ما يحدث التبلور تلقائياً عند تبريد المحلول، وإذا لم يحدث التبلور، فإنه يمكن أن يحث عن طريق تبريد المحلول إلى درجة حرارة أقل من درجة حرارة الغرفة أو بإضافة بلورة واحدة من المادة النقية (بلورة بذرية seed crystal). ويمكن أيضاً إجراء إعادة التبلور و/أو استمثال معدل الإنتاج باستخدام مضاد-للمذيب anti-solvent. وفي هذه الحالة، يتم إذابة المركب في مذيب ملائم عند درجة حرارة مرتفعة، ترشيحه ثم إضافة مقدار إضافي من المذيب الذي يكون للمركب المطلوب ذائبية solubility منخفضة فيه للمساعدة على التبلور. ثم تفصل البلورات عادة باستخدام الترشيح الخوائي vacuum filtration، تغسل ثم تجفف، على سبيل المثال في فرن oven أو بواسطة التجفيف desiccation.

وفي بعض الحالات، يمكن أن تبقى مقادير ضئيلة من المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide الموقى بـ Boc حتى بعد إعادة التبلور ويمكن أن تشكل هذه المقادير راسباً precipitate عند إذابة الملح بالإضافة إلى حمض acid addition salt وفقاً للاختراع في الماء، على سبيل المثال، في محلول منظَّم درجة الحموضة buffered solution. ولذلك يمكن إخضاع المحاليل المائية للأملاح بالإضافة إلى حمض acid addition salts لعملية ترشيح خلال مرشح دقيق microfilter، مثلاً مرشح فتحه عيونه تبلغ ٠.٥ ميكرومتر أو ٠.٤ ميكرومتر أو ٠.٣ ميكرومتر والأفضل ٠.٢ ميكرومتر لإزالة أي راسب من هذا القبيل.

وكبديل عن الترشيح (أو بشكل إضافي له)، يمكن إخضاع محلول مائي للملح للتسخين في وجود حمض، وعادة نفس الحمض (مثلاً حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid في حالة ملح المسيلات mesylate salt) الذي تشكل منه الملح. وتؤدي المعالجة الإضافية بالحمض إلى حلمأة hydrolysis المركب المتبقي من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide الموقى بواسطة Boc وتحويله إلى الملح المرغوب.

ويمكن أيضاً استخدام عمليات استخلاص بالمذيب–الماء Solvent-aqueous extractions أو الاستشراب chromatography كما هو مبين في الأمثلة أدناه لإزالة الرواسب من المركب المتبقي الموقى بـ Boc أو منع تكونها.

الفعالية الحيوية biological activity

يكون المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤–(٢، ٦–ثنائي كلورو–بنزويل أمينو)–H١–بيرازول–٣–كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأملاحه عبارة عن مثبطات لانزيمات كيناز معتمدة على السيكلين cyclin dependent kinases. فعلى سبيل المثال، تكون عبارة عن مثبطات لانزيمات كيناز معتمدة على السيكلين cyclin dependent kinases تختار من CDK1، CDK2، CDK3، CDK4، CDK5، CDK6 و CDK9، وخاصة CDK1، CDK2، CDK3، CDK4، CDK5 و CDK9، وبالأخص CDK1، CDK2، CDK4 و CDK9. وتكون أيضاً عبارة عن مثبطات لـ CDK8 و CDK11.

ويكون للمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤–(٢، ٦–ثنائي كلورو–بنزويل أمينو)–H١–بيرازول–٣–كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأملاحه أيضاً فعالية ضد غليكوجين سينثاز كيناز–٣ glycogen (GSK-3) synthase kinase-3.

ونتيجة لفعاليتها في تعديل أو تثبيط CDK وغليكوجين سينثاز كيناز glycogen synthase kinase، من المتوقع أن يكون المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤–(٢، ٦–ثنائي كلورو–بنزويل أمينو)–H١–بيرازول–٣–كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأملاحه مفيدة في تزويد وسيلة لإيقاف، أو استعادة التحكم بـ، دورة الخلايا cell cycle في الخلايا المنقسمة بشكل غير سوي abnormally dividing cells. ولذلك من المتوقع أن يثبت فائدتها في معالجة أو الوقاية من اضطرابات تكاثرية proliferative disorders مثل السرطانات cancers. ومن المتصور أيضاً أنها تكون مفيدة في معالجة حالات مرضية مثل الإصابة بعدوى فيروسية viral infections، داء السكري من النوع II type II diabetes mellitus أو داء السكري غير المعتمد على الأنسولين non-insulin dependent diabetes mellitus، الأمراض ذاتية المناعة autoimmune diseases، إصابة الرأس head trauma، السكتة الدماغية stroke، الصرع epilepsy، أمراض الانحلال العصبي neurodegenerative diseases مثل مرض

الزهايمر Alzheimer's، مرض العصبون الحركي motor neurone disease، شلل فوق نووي متقدم progressive supranuclear palsy، انحلال قشري قاعدي corticobasal degeneration ومرض بك Pick's disease، على سبيل المثال الأمراض ذاتية المناعة وأمراض الانحلال العصبي مثلاً.

وتتكون إحدى المجموعات الفرعية من الأمراض والحالات المرضية، حيث من المتصور أن تكون الأملاح وفقاً للاختراع مفيدة، من الإصابة بعدوى فيروسية، الأمراض ذاتية المناعة وأمراض الانحلال العصبي.

وتقوم انزيمات CDK بدور تنظيم دورة الخلايا، موت الخلايا المبرمج apoptosis، النسخ transcription، التمايز differentiation وعمل الجهاز العصبي المركزي (CNS) central nervous system. ولذلك تكون مثبطات CDK مفيدة في معالجة الأمراض حيث يوجد اضطراب في التكاثر، موت مبرمج للخلايا أو تمايز مثل السرطان. وتكون الأورام RB+ve شديدة التأثر بمثبطات CDK بشكل خاص. وتكون الأورام RB-ve أيضاً شديدة التأثر بمثبطات CDK.

وتتضمن أمثلة الأمراض السرطانية التي يمكن تثبيطها، على سبيل المثال لا الحصر، السرطانة carcinoma، على سبيل المثال سرطانة المثانة bladder، الثديي breast، القولون colon (مثلاً سرطانات القولون والمستقيم colorectal carcinomas مثل سرطانة غدية قولونية colon adenocarcinoma وورم غدي قولوني colon adenoma)، الكلية kidney، بشرة الجلد epidermis، الكبد liver، الرئة lung، على سبيل المثال السرطانة الغدية adenocarcinoma، سرطان الرئة صغير الخلايا small cell lung cancer وسرطان الرئة غير صغير الخلايا non-small cell lung carcinomas، المريء oesophagus، المرارة gall bladder، المبيض ovary، البنكرياس pancreas، مثلاً سرطانة الغدة القنوية البنكرياسية pancreatic carcinoma، المعدة stomach، عنق الرحم cervix، الغدة الدرقية thyroid، البروستات prostate، أو الجلد، مثلاً سرطانة الخلايا الحرشفية squamous cell carcinoma، الورم المساعد لتكون الدم hematopoietic tumour من السلالة الليمفوانية lymphoid lineage، على سبيل المثال سرطان الدم leukaemia، سرطان الدم الحاد الذي يصيب الخلايا الليمفاوية B-cell lymphoma، ورم الخلايا B الليمفاوية B-cell lymphoma، ورم الخلايا T الليمفاوية T-cell lymphoma، ورم هودجكن الليمفي Hodgkin's lymphoma، ورم غير ورم هودجكن الليمفي non-Hodgkin's lymphoma، ورم الخلايا الشعرية الليمفي hairy cell lymphoma، أو ورم بوركت الليمفي Burkett's lymphoma، ورم مساعد على تكون الدم من

السلالة النخاعانية myeloid lineage، على سبيل المثال سرطان الدم نخاعي المنشأ myelogenous Leukaemias الحاد أو المزمن، متلازمة سوء النمو النخاعي myelodysplastic syndrome، أو سرطان الدم الذي يصيب الخلايا النخاعية الأولية promyelocytic leukaemia، سرطان جريبي درقي thyroid follicular cancer، ورم منشأه من الطبقة الوسطى mesenchymal origin، على سبيل المثال سركومة ليفية fibrosarcoma أو سركومة عضلية مخططة rabdomyosarcoma، ورم الجهاز العصبي المركزي أو المحيطي central or peripheral nervous system، على سبيل المثال ورم الخلايا النجمية astrocytoma، ورم الخلايا البدائية العصبية neuroblastoma، الورم الدبقي glioma أو ورم غمد العصب schwannoma، الورم الميلانيني melanoma؛ ورم الظهارة النطفية seminoma، سرطانة مسيخة teratocarcinoma، سركومة العظام osteosarcoma، جفاف الجلد xeroderma pigmentosum؛ ورم حسكي قرني keratoctanthoma، سرطان جريبي درقي thyroid follicular cancer؛ أو سركومة كابوزي Kaposi's sarcoma.

ويمكن أن تكون الأمراض السرطانية عبارة أمراض شديدة التأثر بتثبيط واحد أو أكثر من انزيمات الكيناز المعتمدة على السيكلين cyclin dependent kinases التي تختار من CDK1، CDK2، CDK4، CDK6 و CDK9، على سبيل المثال واحد أو أكثر من انزيمات كيناز CDK التي تختار من CDK1، CDK2، CDK4 و CDK9، مثلاً CDK1 و/أو CDK2.

ويمكن تحديد فيما إذا كان سرطان معين شديد التأثر بتثبيط كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو لا عن طريق معايرات نمو الخلايا cell growth assay المبينة في الأمثلة أدناه أو بطريقة مبينة في الفقرة التي عنوانها "طرق التشخيص Methods of Diagnosis".

ومن المعروف أن CDKs تقوم أيضاً بدور في موت الخلايا المبرمج، التكاثر، التمايز والنسخ ولذلك من الممكن أيضاً أن تكون مثبطات CDK مفيدة في معالجة الأمراض التالية غير السرطان: الإصابة بعدوى فيروسية، على سبيل المثال بفيروس الحلأ herpes virus، فيروس الجدري pox virus، فيروس ابشتاين–بار Epstein-Barr virus، فيروس سيندبيز Sindbis virus، فيروس غدي adenovirus، HIV، HPV، HCV وHCMV؛ الوقاية من تطور ألـ AIDS في أفراد مصابين بعدوى بـ HIV؛ الأمراض الإلتهابية المزمنة، على سبيل المثال الذئبة الاحمرارية الجهازية systemic lupus erythematosus، التهاب كبيبات الكلى بسبب مرض ذاتي المناعة autoimmune mediated glomerulonephritis، التهاب المفاصل شبه الروماتزمي rheumatoid

arthritis، الصدفية psoriasis، مرض التهاب الأمعاء inflammatory bowel disease، داء السكري ذاتي المناعة autoimmune diabetes mellitus، أمراض وعائية قلبية cardiovascular diseases على سبيل المثال ضمور عضلة القلب cardiac hypertrophy، معاودة التضيق restenosis، التصلب العصيدي atherosclerosis، اضطرابات الانحلال العصبي neurodegenerative disorders، على سبيل المثال مرض الزهايمر Alzheimer's disease، العته المرتبط بألـ-AIDS، مرض باركنسون Parkinson's disease، تصلب ضموري جانبي amyotropic lateral sclerosis، التهاب الشبكية الخضابي retinitis pigmentosa، ضمور عضلي شوكي spinal muscular atropy والانحلال المخيخي cerebellar degeneration، التهاب كبيبات الكلى glomerulonephritis، متلازمات سوء النمو النخاعي myelodysplastic syndromes، الإصابة بقلة الدموية الموضعية ischemic injury المقترنة باحتشاء عضلة القلب myocardial infarctions، السكتة الدماغية stroke وإصابة إعادة التروية reperfusion injury، عدم انتظام إيقاع القلب arrhythmia، التصلب العصيدي atherosclerosis، أمراض الكبد المستحثة بالتوكسين toxin أو المرتبطة بالكحول alcohol، أمراض الدم haematological diseases، على سبيل المثال الأنيميا المزمنة chronic anemia والأنيميا اللاتكوينية aplastic anemia؛ الأمراض الانحلالية للجهاز الهيكلي العضلي musculoskeletal system، على سبيل المثال هشاشة العظام osteoporosis والتهاب المفاصل arthritis، التهاب الجيب الأنفي الحساس للأسبيرين aspirin-sensitive rhinosinusitis، التليف الحويصلي cystic fibrosis، التصلب المتعدد multiple sclerosis، أمراض الكلية kidney diseases والألم السرطاني cancer pain.

ولقد اكتشف أيضاً أنه يمكن استخدام بعض مثبطات الكيناز المعتمد على السيكلين cyclin-dependent kinase مع عوامل أخرى مضادة للسرطان anticancer agents. فعلى سبيل المثال استخدم مثبط الكيناز المعتمد على السيكلين cyclin-dependent kinase، فلافوبيريدول flavopiridol مع عوامل أخرى مضادة للسرطان في علاج مؤتلف combination therapy.

وهكذا في التراكيب الصيدلية، الاستخدامات أو الطرق وفقاً لهذا الاختراع المستخدمة لمعالجة مرض أو حالة مرضية تشتمل على نمو الخلايا غير السوي abnormal cell growth، يكون المرض أو الحالة المرضية الذي يتضمن نمو الخلايا غير السوي في أحد التجسيدات عبارة عن السرطان.

وتتضمن مجموعة على الأمراض السرطانية سرطان الثديي عند البشر human breast cancers (مثلاً أورام الثديي الأولية primary breast tumours، سرطان الثديي سالب العقد node-negative breast cancer، سرطانات غدية مجروية غزوية invasive duct adenocarcinomas للثديي، سرطان الثديي المتعلق بشبه بطانة الرحم non-endometrioid breast cancers)، الأورام الليمفية لخلايا قشرة المخ mantle cell lymphomas. ومن الأمراض السرطانية الأخرى سرطان القولون والمستقيم colorectal وسرطان بطانة الرحم endometrial.

وتتضمن مجموعة فرعية أخرى للأمراض السرطانية الأورام المساعدة على تكون الدم من السلالة الليمفوانية، على سبيل المثال، سرطان الدم leukemia، سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia، ورم خلايا قشرة المخ الليمفاوية mantle cell lymphoma وورم الخلايا-B الليمفاوية (مثل ورم الخلايا B الليمفاوية الكبيرة المنتشر diffuse large B cell lymphoma).

ومن الأمراض السرطانية المحدَّدة سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية.

ومن الأمراض السرطانية المحددة الأخرى ورم خلايا قشرة المخ الليمفاوية.

ومن الأمراض السرطانية المحددة الأخرى ورم الخلايا B الليمفاوية الكبيرة المنتشر diffuse large B cell lymphoma.

وتتضمن مجموعة فرعية أخرى للأمراض السرطانية سرطان الثدي breast cancer، سرطان المبيض ovarian cancer، سرطان القولون colon cancer، سرطان البروستات prostate cancer، سرطان المريء oesophageal cancer، السرطان الحرشفي squamous cancer، وسرطانات الرئة غير صغيرة الخلايا non-small cell lung carcmomas.

ويمكن قياس فعالية الأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع كمثبطات لانزيمات كيناز معتمدة على السيكلين cyclin dependent kinases وغليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3 باستخدام المعايرات المبينة في الأمثلة أدناه ويمكن تحديد مستوى الفعالية الظاهرة بدلالة القيمة IC_{50} (التركيز المثبط للنصف).

وهكذا من المتصور، مثلاً، أن تكون الأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع مفيدة في تخفيف أو تقليل حدوث السرطان.

ويزود الاختراع أيضاً من بين أمور أخرى:

- ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt حيث يستخدم للوقاية prophylaxis أو المعالجة من مرض disease أو حالة مرضية condition يسببها كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3.
- طريقة للوقاية prophylaxis أو المعالجة من مرض disease أو حالة مرضية condition يسببها كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3، حيث تتضمن الطريقة إعطاء شخص بحاجة إلى هذه المعالجة ملحاً بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt.
- طريقة لتخفيف alleviating أو تقليل حدوث مرض disease أو حالة مرضية condition يسببها كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3، حيث تتضمن الطريقة إعطاء شخص بحاجة إلى هذه المعالجة ملحاً بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt.
- طريقة لمعالجة مرض disease أو حالة مرضية condition تتضمن أو تنشأ من نمو الخلايا غير السوي abnormal cell growth في ثديي، حيث تتضمن الطريقة إعطاء الثديي ملحاً بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt، بمقدار فعال في تثبيط نمو الخلايا غير السوي.

- طريقة لتخفيف alleviating أو تقليل حدوث مرض disease أو حالة مرضية condition تتضمن أو تنشأ من نمو الخلايا غير السوي abnormal cell growth في ثديي، حيث تتضمن الطريقة إعطاء الثديي ملحاً بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt، بمقدار فعال في تثبيط نمو الخلايا غير السوي.
- طريقة لمعالجة مرض disease أو حالة مرضية condition تتضمن أو تنشأ من نمو الخلايا غير السوي abnormal cell growth في ثديي، حيث تتضمن الطريقة إعطاء الثديي ملحاً بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt، بمقدار فعال في تثبيط نشاط كيناز cdk (مثلاً cdk1 أو cdk2) أو نشاط غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3.
- طريقة لتخفيف alleviating أو تقليل حدوث مرض disease أو حالة مرضية condition تتضمن أو تنشأ من نمو الخلايا غير السوي abnormal cell growth في ثديي، حيث تتضمن الطريقة إعطاء الثديي ملحاً بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt، بمقدار فعال في تثبيط نشاط كيناز cdk (مثلاً cdk1 أو cdk2) أو نشاط غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3.
- طريقة لتثبيط كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3، حيث تتضمن الطريقة ملامسة الكيناز kinase مع ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt.

- طريقة لتعديل modulating عملية خلوية cellular process (مثلاً انقسام الخلايا cell division) عن طريق تثبيط نشاط كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3، باستخدام ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt.
- ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt، حيث يستخدم للوقاية prophylaxis أو المعالجة من مرض disease أو حالة مرضية condition كما وصف في هذا البيان.
- استخدام ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt، في صنع دواء medicament، حيث يكون لهذا الدواء استخدام واحد أو أكثر من الاستخدامات المعرفة في هذا البيان.
- تركيب صيدلي pharmaceutical composition يشتمل على ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt، ومادة حاملة مقبولة صيدلياً pharmaceutically acceptable carrier.
- تركيب صيدلي pharmaceutical composition لإعطائه في صورة محلول مائي aqueous solution حيث يشتمل هذا التركيب الصيدلي على ملح بالإضافة إلى حمض acid addition salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt ويكون للملح ذائبية

solubility تزيد عن ١٥ ملغم/مل mg/ml، وعادة تزيد عن ٢٠ ملغم/مل، ويفضل أن تزيد عن ٢٥ ملغم/مل، والأفضل أن تزيد عن ٣٠ ملغم/مل.

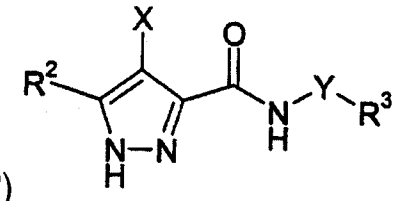
- ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt، حيث يستخدم في الدواء.
- ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt، حيث يعد لأي من الاستخدامات والطرق المذكورة أعلاه، ويكون كما وصف في أي مكان في هذا البيان.

ويمكن أن تكون الأملاح بالإضافة إلى حمض في الأوجه السابقة للاختراع عبارة، مثلاً، عن أي من الأملاح الموصوفة هنا وخاصة ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt وملح أسيتات acetate salt ومخاليط منهما والأفضل ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt.

معالجة ورم الخلايا-B الليمفاوية، سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية وورم الخلايا-B الكبيرة الليمفاوية المنتشر

يزود الاختراع أيضاً استخدامات جديدة (وبالتحديد استخدام في معالجة ورم الخلايا-B الليمفاوية، سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية وورم الخلايا-B الكبيرة الليمفاوية المنتشر) للمركبات المذكورة في الطلب البريطاني السابق باسم مقدمي الطلب رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع (طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦)، ولقد ذكرت محتوياتهما في هذا البيان للإحالة إليها كمرجع.

وبشكل أكثر تحديداً يزود الاختراع استخداماً لمركب بالصيغة (I^0):



(I^0)

ومجموعات فرعية sub-groups، تجسيدات embodiments وأمثلة عليه كما عرف في براءة الاختراع البريطانية رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع (طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦)، وحيث تكون الرموز R^2، R^3، X و Y كما عرفت في براءة الاختراع هذه، من أجل صنع دواء لمعالجة ورم الخلايا الليمفاوية–B B-cell lymphoma، سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia أو ورم الخلايا الليمفاوية–B الكبيرة المنتشر diffuse large B-cell lymphoma.

ويزود أيضاً طرقاً لمعالجة ورم الخلايا الليمفاوية–B B-cell lymphoma، سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia وورم الخلايا الليمفاوية–B الكبيرة المنتشر diffuse large B-cell lymphoma، عن طريق إعطاء مريض بحاجة إلى هذه المعالجة مركب بالصيغة (I^0) كما عرف هنا وفي براءة الاختراع البريطانية رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع (طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦).

وتكون المركبات الخاصة بالصيغة (I^0) هي تلك المعرفة في الصيغة (Ib) في الصفحة ١٧، الصيغة (II) في الصفحة ٦٦، الصيغة (IV) في الصفحة ٧٢، الصيغة (IVa) في الصفحة ٧٤، الصيغة (Va) في الصفحة ٧٦، الصيغة (Vb) في الصفحة ٧٧، الصيغة (VIa) في الصفحة ٧٨ والصيغة (VIb) في الصفحة ٧٩ من طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦، المركبات المذكورة في الصفحة ٧٩ والمركبات المذكورة كأمثلة في فقرة الأمثلة من طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦.

ويكون المركب المفضل بالصيغة (I^0) عبارة عن بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤–(٢، ٦–ثنائي كلورو–بنزويل أمينو)–H١–بيرازول–٣–كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأملاحه (مثلاً أملاح بالإضافة إلى حمض

acid addition salts منه)، ذوابات solvates، زمراء تناوبية tautomers أو أكاسيد نتروجينية N-oxides منه.

وفي أحد التجسيدات يكون الملح عبارة عن ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt. ويمكن تحضير هذا الملح كما وصف في المثال ١٥٠ أو المثال ٢٣٧ في الطلب البريطاني السابق باسم مقدمي الطلب رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع ولقد ذكرت محتوياته المتعلقة بالمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide في هذا البيان للإحالة كمرجع. وتم تضمين المثال ٢٣٧ في الطلب البريطاني السابق باسم مقدمي الطلب رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع (طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦) في هذا الطلب على أنه المثال ١١.

وهكذا يتم تزويد ما يلي وفقاً لأحد أوجه الاختراع:

- مركب بالصيغة (I^0) ومجموعات فرعية sub-groups، تجسيدات embodiments وأمثلة عليه كما عرفت في براءة الاختراع البريطانية رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع (طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦)، وحيث تكون الرموز R^2، R^3، X و Y كما عرفت في براءة الاختراع هذه، وأملاح بالإضافة إلى حمض منه (على سبيل المثال ملح هيدروكلوريد hydrochloride salt) حيث تستخدم في معالجة ورم الخلايا الليمفاوية-B B-cell lymphoma.
- مركب بالصيغة (I^0) ومجموعات فرعية sub-groups، تجسيدات embodiments وأمثلة عليه كما عرفت في براءة الاختراع البريطانية رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع (طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦)، وحيث تكون الرموز R^2، R^3، X و Y كما عرفت في براءة الاختراع هذه، وأملاح بالإضافة إلى حمض منه (على سبيل المثال ملح هيدروكلوريد hydrochloride salt) حيث تستخدم في معالجة سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia.

- مركب بالصيغة (I^0) ومجموعات فرعية sub-groups، تجسيدات embodiments وأمثلة عليه كما عرفت في براءة الاختراع البريطانية رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع (طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦)، وحيث تكون الرموز R^2، R^3، X وY كما عرفت في براءة الاختراع هذه، وأملاح بالإضافة إلى حمض منه (على سبيل المثال ملح هيدروكلوريد hydrochloride salt) حيث تستخدم في معالجة ورم الخلايا الليمفاوية-B الكبيرة المنتشر diffuse large B-cell lymphoma.

وفي وجه آخر يزود الاختراع المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملحه (مثلاً ملح بالإضافة إلى حمض acid addition salts منه)، ذوابة solvate، زمير تناوبي tautomer أو أكسيد نتروجيني N-oxide منه حيث يستخدم في معالجة ورم الخلايا الليمفاوية-B B-cell lymphoma.

ويزود الاختراع أيضاً المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملحه (مثلاً ملح بالإضافة إلى حمض acid addition salts منه)، ذوابة solvate، زمير تناوبي tautomer أو أكسيد نتروجيني N-oxide منه حيث يستخدم في معالجة سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia.

ويزود الاختراع أيضاً المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملحه (مثلاً ملح بالإضافة إلى حمض acid addition salts منه)، ذوابة solvate، زمير تناوبي tautomer أو أكسيد نتروجيني N-oxide منه حيث يستخدم في معالجة ورم الخلايا الليمفاوية-B الكبيرة المنتشر diffuse large B-cell lymphoma.

وفي معالجة ورم الخلايا الليمفاوية-B B-cell lymphoma، سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia أو ورم الخلايا الليمفاوية-B الكبيرة المنتشر diffuse large B-cell lymphoma يمكن استخدام القاعدة الحرة لبيبريدينيل (٤) أميد

لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide والأفضل استخدام ملح بالإضافة إلى حمض. ويمكن أن يكون الملح بالإضافة إلى حمض عبارة عن ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt المذكور في طلب براءة الاختراع البريطاني السابق باسم مقدمي الطلب رقم ٢٠٠٤/٠٠٣١٧٩ وفقاً لمعاهدة التعاون في مجال براءات الاختراع (طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦)، أو يمكن أن يكون أحد الأملاح المذكورة هنا، على سبيل المثال أملاح مع أحماض ميثان كبريتونيك methanesulphonic وأسيتيك acetic.

ويزود الاختراع أيضاً طرقاً لمعالجة ورم الخلايا الليمفاوية-B B-cell lymphoma، سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia أو ورم الخلايا الليمفاوية-B الكبيرة المنتشر diffuse large B-cell lymphoma عن طريق إعطاء مريض بحاجة لهذه المعالجة المركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح بالإضافة إلى حمض منه.

تركيبات صيدلية Pharmaceutical Formulations

وبينما يمكن إعطاء مركب (مثلاً مركب بالصيغة (I^0) أو بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح بالإضافة إلى حمض acid addition salt منه مثل ملح المسيلات mesylate) كما حدد في هذا البيان، يفضل إعطاؤه في صورة تركيب صيدلي pharmaceutical composition (على سبيل المثال تركيبة) يشتمل على المركب أو ملحه مع مادة حاملة carrier، مادة مساعدة adjuvant، مادة سواغة excipient، مادة مخففة diluent، مادة مالئة filler، محلول منظم لدرجة الحموضة buffer، مادة مثبتة stabiliser، مادة حافظة preservative، مادة مزلقة lubricant واحدة أو أكثر مقبولة صيدلياً pharmaceutically acceptable، أو مواد أخرى معروفة لأولئك المتمرسين في التقنية. وقد يشمل التركيب أيضاً عوامل علاجية therapeutic أو وقائية prophylactic أخرى، مثلاً عوامل تقلل من أو تخفف بعض التأثيرات الجانبية side effects المقترنة بالعلاج الكيميائي chemotherapy.

وتشمل أمثلة محددة على هذه العوامل العوامل المضادة للتقيؤ anti-emetic agents والعوامل التي تمنع أو تقلل فترة الإصابة بنقص الكريات البيضاء المتعادلة neutropenia المقترن بالعلاج الكيميائي والتي تمنع حدوث المضاعفات الناتجة عن انخفاض مستويات خلايا الدم الحمراء red blood cells أو خلايا الدم البيضاء white blood cells، على سبيل المثال بوئيتين أحمر erythropoietin (EPO)، عامل تنبيه مستعمرات الخلايا البلعمية الكبيرة والكريات المحببة granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) وعامل تنبيه مستعمرات الكريات المحببة granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF).

وهكذا، يوفر الاختراع الراهن أيضاً تراكيب صيدلية، كما ذكر أعلاه، وطرق لتحضير تراكيب صيدلية تشمل مزج ملح بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide (وخصوصاً ملح المسيلات mesylate) كما حدد في هذا البيان مع مادة حاملة، مادة سواغة، محلول منظم لدرجة الحموضة، مادة مساعدة، مادة مثبتة مقبولة صيدلياً واحدة أو أكثر، أو مواد أخرى، كما وصف في هذا البيان.

ويشير المصطلح "مقبول صيدلياً" كما استخدم في هذا البيان إلى مركبات، مواد، تراكيب، و/أو أشكال جرعة dosage forms، تكون ضمن القرار الطبي الصائب، ملائمة للاستخدام عند تلامسها مع أنسجة tissues الكائنات الخاضعة للمعالجة subject (مثل الإنسان human) بدون سمية toxicity، تهيج irritation، استجابة تحسسية allergic response مفرطة، أو مشاكل أو مضاعفات أخرى، تتوافق مع نسبة معقولة من الفائدة/المخاطرة benefit/risk ratio. وينبغي أيضاً أن تكون كل مادة حاملة، سواغة .. إلخ "مقبولة" من حيث انسجامها مع المقومات ingredients الأخرى في التركيبة.

ويمكن أن تكون التراكيب الصيدلية في أي شكل ملائم لإعطائه عن طريق الفم oral، عن غير طريق القناة الهضمية parenteral، موضعياً topically، داخل الأنف intranasal، في العين ophthalmic، في الأذن otic، في المستقيم rectal، داخل المهبل intra-vaginal، أو عبر الأدمة transdermal. وعندما يراد إعطاء التراكيب عن غير طريق القناة الهضمية، فإنه يمكن إعدادها للإعطاء داخل الوريد intravenous، داخل العضل intramuscular، داخل الصفاق intraperitoneal، تحت الجلد subcutaneous أو يتم تصريفها مباشرة إلى العضو المستهدف أو

النسيج المستهدف target organ or tissue بواسطة الحقن injection، التسريب infusion أو بطرق تصريف أخرى. ويمكن أن يتم التصريف عن طريق حقن جرعات كبيرة في الوريد bolus injection، تسريب قصير الأمد short term infusion أو تسريب طويل الأمد longer term infusion ويمكن أن يكون بواسطة التصريف المنفعل passive delivery أو بواسطة استخدام مضخة تسريب infusion pump ملائمة.

وتشمل التركيبات الصيدلية المعدة للإعطاء عن غير طريق القناة الهضمية محاليل حقن مائية وغير مائية معقمة aqueous and non aqueous sterile injection solutions يمكن أن تحتوي على مضادات تأكسد anti-oxidants، محاليل منظمة لدرجة الحموضة، مواد كابحة لنمو الجراثيم bacteriostats، مذيبات إسهامية co-solvents، مزائج من مذيبات عضوية organic solvent mixtures، عوامل لتشكيل متراكبات مع الدكسترين الحلقي cyclodextrin complexation agents، عوامل استحلاب emulsifying agents (لتكوين وتثبيت التركيبات التي تكون على شكل مستحلبات)، مكونات جسيمية شحمية لتكوين الجسيمات الشحمية liposome components for forming liposome، بوليمرات قابلة للتهلم لتكوين مواد هلامية بوليمرية gellable polymers for forming polymeric gels، مواد واقية للتراكيب المجفدة lyophilisation protectants وتوليفات من عوامل مستخدمة، من جملة استخدامات أخرى، لتثبيت المقومات الفعالة في صورة قابلة للذوبان وجعل التركيبة سوية التوتر isotonic مع دم متلقي العلاج المقصود. وتكون التركيبات الصيدلية المعدة للإعطاء عن غير طريق القناة الهضمية أيضاً على شكل معلقات suspensions مائية وغير مائية معقمة يمكن أن تشتمل على عوامل تعليق suspending agents وعوامل لتغليظ القوام thickening agents (انظر ما جاء عن آر. جي. ستريكلي R. G. Strickly، في مقالة بعنوان solubilizing excipients in oral and injectable formulations، مجلة Pharmaceutical Research، المجلد ٢١، العدد ٢، ص: ٢٠١-٢٣٠، ٢٠٠٤م).

ويمكن تذويب جزيء العقار القابل للتأين حتى يتم الحصول على التركيز المرغوب عن طريق ضبط درجة الحموضة (pH) إذا كانت قيمة pK_a للعقار بعيدة بدرجة كافية عن قيمة درجة حموضة التركيبة. ويكون المدى المقبول لدرجة الحموضة بين ٢ و ١٢ في حالة الإعطاء داخل الوريد وداخل العضل، بينما يكون المدى بين ٢.٧ و ٩.٠ في حالة الإعطاء تحت الجلد. ويتم ضبط درجة حموضة المحلول إما بواسطة الشكل الملحي للعقار salt form of the drug،

الأحماض/القواعد القوية strong acids/bases مثل حمض الهيدروكلوريك hydrochloric acid أو هيدروكسيد الصوديوم sodium hydroxide أو بواسطة المحاليل المنظمة لدرجة الحموضة solutions of buffers التي تشمل على سبيل المثال لا الحصر محاليل تنظيم درجة الحموضة المتشكلة من الغليسين glycine، السترات citrate، الأسيتات acetate، الماليات maleate، السكسينات succinate، الهستيدين histidine، الفوسفات phosphate، ثلاثي (هيدروكسي مثيل) أمينو ميثان (TRIS) tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS)، أو الكربونات carbonate.

وغالباً ما تستخدم توليفة من محلول مائي aqueous solution ومزيج من مذيب عضوي/مادة خافضة للتوتر السطحي قابل للذوبان في الماء water soluble organic solvent/surfactant (أي، مذيب إسهامي cosolvent) في التركيبات القابلة للحقن. وتشمل المذيبات العضوية وخوافض التوتر السطحي القابلة للذوبان في الماء المستخدمة في التركيبات القابلة للحقن على سبيل المثال لا الحصر غليكول البروبيلين propylene glycol، الإيثانول ethanol، غليكول متعدد الإثيلين ٣٠٠ polyethylene glycol 300، غليكول متعدد الإثيلين ٤٠٠ polyethylene glycol 400، الغليسرين glycerin، ثنائي مثيل أسيتاميد (DMA) dimethylacetamide (DMA)، N-مثيل-٢-بيروليدون N-methyl-2-pyrrolidone (NMP؛ من شركة فارماسولف Pharmasolve)، ثنائي مثيل كبريتوكسيد (DMSO) dimethylsulphoxide (DMSO)، سوليوتول إتش إس ١٥ Solutol HS 15، كريموفور ئي إل Cremophor EL، كريموفور آر إتش ٦٠ Cremophor RH 60، ومتعدد سوربات ٨٠ polysorbate 80. ويمكن أن يتم عادة، لكن ليس دائماً، تخفيف هذه التركيبات قبل حقنها.

ويعتبر كل من الغليكول متعدد الإثيلين polyethylene glycol، PEG 300، الإيثانول ethanol، كريموفور ئي إل Cremophor EL، كريموفور آر إتش ٦٠ Cremophor RH 60، ومتعدد السوربات ٨٠ polysorbate 80 مذيبات وخوافض توتر سطحي عضوية قابلة للامتزاج بالماء water-miscible بشكل كلي ويتم استخدامها في تركيبات قابلة للحقن متوفرة تجارياً ويمكن استخدامها في توليفات مع بعضها البعض. وعادة ما يتم تخفيف التركيبات العضوية الناتجة بضعفين على الأقل قبل إعطائها بالتسريب داخل الوريد IV infusion أو حقنها على شكل جرعات كبيرة داخل الوريد IV bolus.

وبشكل بديل، يمكن تحقيق ذائبية solubility عالية في الماء عن طريق تشكيل متراكبات جزيئية مع مركبات الدكسترين الحلقي cyclodextrins.

وتعتبر الجسيمات الشحمية عبارة عن حويصلات كروية مغلقة closed sperical vesicles تتكون من أغشية شحمية خارجية ثنائية الطبقة outer lipid bilayer membranes وجزء مركزي مائي داخلي inner aqueous core ويقل قطرها الإجمالي overall diameter عن ١٠٠ ميكرومتر. وبالاعتماد على مستوى عدم الألفة للماء hydrophobicity، يمكن تذويب العقاقير غير الأليفة للماء بشكل معتدل moderately hydrophobic drugs بواسطة الجسيمات الشحمية إذا أصبح العقار موضوعاً ضمن غلاف encapsulated من الجسيمات الشحمية أو مدمجاً intercalated فيها. ويمكن أيضاً تذويب العقاقير غير الأليفة للماء بواسطة الجسيمات الشحمية إذا أصبحت جزيئات العقار جزءاً متكاملاً من الغشاء الشحمي ثنائي الطبقة، وفي هذه الحالة، يتم إذابة العقار غير الأليف للماء في الجزء الشحمي للغشاء الشحمي ثنائي الطبقة. وتحتوي تركيبة الجسيمات الشحمية النموذجية على ماء مع شحم فوسفوري phospholipid بتركيز يتراوح من ٥ إلى ٢٠ ملغم/مل، مادة لإضفاء توتر متساوٍ isotonicifier، محلول منظم لدرجة الحموضة ما بين ٥ و ٨، وبشكل اختياري كولسترول cholesterol.

ويمكن أن تتواجد التركيبات في أوعية أحادية الجرعة unit-dose أو متعددة الجرعات multi-dose، مثل أمبولات وقوارير مختومة sealed ampoules and vials، ويمكن تخزينها في حالة مجففة بالتجميد freeze-dried (مجفدة lyophilised) لا تحتاج إلا لإضافة مادة حاملة معقمة سائلة، مثل ماء مستخدم للحقن، قبل استخدامها مباشرة.

ويمكن تحضير التركيبة الصيدلية عن طريق تجفيد مركب بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح منه كما حدد في هذا البيان. ويشير مصطلح التجفيد إلى طريقة التجفيف بالتجميد لتركيب معين. ولذلك يستخدم مصطلح التجفيف بالتجميد ومصطلح التجفيد في هذا البيان بصفتهما مصطلحين مترادفين. وتتمثل طريقة نموذجية للتجفيد في تذويب المركب وترويق التركيبة الناتجة، ترشيحها ترشيحاً معقماً ونقلها في ظروف معقمة إلى أوعية مناسبة للتجفيد (مثلاً قوارير). وفي حالة استخدام القوارير، يتم سد هذه القوارير بشكل جزئي بواسطة سدادات خاصة بالمواد المجفدة lyo-stoppers. ويمكن تبريد التركيبة حتى التجمد وتعريضها لعملية تجفيد تحت ظروف عيارية ثم سدها بإحكام لتشكيل تركيبة مجفدة جافة ثابتة. وعادة ما يكون للتركيب محتوى منخفض من

الماء المتبقي residual water، مثلاً يقل عن ٥٪ على سبيل المثال أقل من ١٪ وزناً على أساس وزن المادة المجفدة lyophile.

ويمكن أن تحتوي التركيبة المجفدة على سواغات أخرى مثل عوامل تغليظ القوام thickening agents، عوامل التشتيت dispersing agents، عوامل تنظيم درجة الحموضة buffers، مضادات التأكسد antioxidants، المواد الحافظة preservatives ومواد ضبط التوترية tonicity adjusters. وتشمل عوامل تنظيم درجة الحموضة النموذجية الفوسفات phosphate، الأسيتات acetate، السترات citrate والغليسين glycine. وتشمل أمثلة مضادات التأكسد حمض الأسكوربيك ascorbic acid، ثنائي كبريتيت الصوديوم sodium bisulphite، ميتا ثنائي كبريتيت الصوديوم sodium metabisulphite، أحادي ثيو غليسرول monothioglycerol، ثيويوريا thiourea، هيدروكسي تولوين بيوتيلي butylated hydroxytoluene، وهيدروكسيل أنيسول بيوتيلي butylated hydroxyl anisole وأملاح حمض الإثيلين ثنائي أمينو رباعي الأسيتيك ethylenediaminetetra acetic acid salts. وقد تشمل المواد الحافظة حمض البنزويك benzoic acid وأملاحه، حمض السوربيك sorbic acid وأملاحه، إسترات الألكيل لحمض بارا-هيدروكسي بنزويك alkyl esters of parahydroxybenzoic acid، الفنول phenol، كلوروبيوتانول chlorobutanol، كحول البنزيل benzyl alcohol، الثيميروسال thimerosal، كلوريد بنزالكونيوم benzalkonium chloride وكلوريد ستيل بيريدينيوم cetylpyridinium chloride. ويمكن استخدام عوامل تنظيم درجة الحموضة المذكورة سابقاً وكذلك الدكستروز dextrose وكلوريد الصوديوم sodium chloride لضبط التوترية إذا اقتضى الأمر.

وتستخدم عموماً عوامل لزيادة الحجم bulking agents في تقنية التجفيد لتسهيل العملية و/أو تزويد حجم bulk و/أو تكامل ميكانيكي mechanical integrity للقرص المجفد lyophilized cake. ويقصد بعامل زيادة الحجم مادة مخففة دقائقية صلبة قابلة للذوبان بسهولة في الماء تعمل عند تجفيدها إسهامياً مع المركب أو ملحه على تزويد قرص مجفد ثابت فيزيائياً، عملية تجفيف بالتجميد أفضل وإعادة تكوين reconstitution سريع وتام. ويمكن أيضاً استخدام عامل زيادة الحجم لجعل المحلول سوي التوتر isotonic.

ويمكن أن يكون عامل زيادة الحجم القابل للذوبان في الماء عبارة عن أي مادة صلبة خاملة مقبولة صيدلياً تستخدم في التجفيد عادة. وتشمل عوامل زيادة الحجم هذه، على سبيل

المثال، المواد السكرية sugars مثل الغلوكوز glucose، الملتوز maltose، السكروز sucrose، واللاكتوز lactose؛ الكحولات متعددة الهيدروكسيل polyalcohols مثل السوربيتول sorbitol والمانيتول mannitol؛ الأحماض الأمينية amino acids مثل الغليسين glycine؛ البوليمرات مثل بيروليدون متعدد الفينيل polyvinyl pyrrolidine؛ والمركبات متعددة السكريد polysaccharides مثل الدكسترات dextran.

وعادة ما تكون نسبة وزن عامل زيادة الحجم إلى وزن المركب الفعال ضمن المدى من حوالي ١ إلى حوالي ٥، على سبيل المثال من حوالي ١ إلى حوالي ٣، مثلاً في المدى من حوالي ١ إلى ٢.

وبشكل بديل يمكن تزويد عوامل زيادة الحجم في صورة محلول يمكن تركيزه ووضعه في قارورة ملائمة محكمة السد. وقد يتم تعقيم أشكال الجرعات بواسطة ترشيحها أو تحمية القوارير ومحتوياتها في محم موصد عند مراحل مناسبة من عملية التشكيل. وقد تحتاج التركيبة المزودة إلى تخفيف أو تجهيز إضافي قبل تصريفها مثلاً تخفف في عبوات تسريب معقمة ملائمة.

ويمكن تحضير محاليل حقن ومعلقات غير معدة سابقاً من مساحيق powders، حبيبات granules وأقراص tablets معقمة.

وفي تجسيد مفضل للاختراع، يكون التركيب الصيدلي بشكل ملائم لإعطائه داخل الوريد مثلاً بالحقن أو بالتسريب.

ويمكن أن تشمل التراكيب الصيدلية وفقاً للاختراع الراهن والمعدة للحقن عن غير طريق القناة الهضمية أيضاً محاليل solutions، مشتتات dispersions، معلقات suspensions أو مستحلبات emulsions معقمة مائية أو غير مائية مقبولة صيدلياً بالإضافة إلى مساحيق معقمة لإعادة تكوينها في محاليل أو مشتتات معقمة قابلة للحقن قبل استخدامها مباشرة. وتشمل أمثلة المواد الحاملة، المواد المخففة، المذيبات أو المواد الناقلة vehicles المائية وغير المائية الملائمة للماء، الإيثانول ethanol، متعددات الهيدروكسيل polyols (مثل الغليسرول glycerol، غليكول البروبيلين propylene glycol، غليكول متعدد الإثيلين polyethylene glycol وما شابه)، كربوكسي مثيل السليلوز carboxymethylcellulose ومزائج ملائمة منها، الزيوت النباتية vegetable oils (مثل زيت الزيتون olive oil)، وإسترات عضوية قابلة للحقن injectable organic esters مثل أوليات الإثيل ethyl oleate. ويمكن الحفاظ على درجة سيولة fluidity مناسبة، مثلاً باستخدام مواد تغليف

coating materials مثل اللسيتين lecithin، بالمحافظة على الحجم الجسيمي particle size المطلوب في حالة المشتتات وباستخدام خوافض التوتر السطحي.

ويمكن أن تحتوي التراكيب وفقاً للاختراع الراهن على مواد مساعدة adjuvants مثلاً مواد حافظة، عوامل ترطيب wetting agents، عوامل استحلاب emulsifying agents وعوامل تشتيت dispersing agents. ويمكن ضمان منع تأثير الكائنات الدقيقة microorganisms عن طريق إضافة عوامل مختلفة مضادة للبكتيريا antibacterial ومضادة للفطريات antifungal، على سبيل المثال، البارابن paraben، الكلوروبيوتانول chlorobutanol، حمض فنول السوربيك phenol sorbic acid وما شابه ذلك. وقد يكون من المرغوب أيضاً إضافة عوامل متساوية التوتر isotonic agents مثل السكريات sugars، كلوريد الصوديوم sodium chloride وما شابه ذلك. ويمكن إطالة فترة امتصاص الشكل الصيدلي القابل للحقن بإضافة عوامل تعمل على تأخير الامتصاص مثل أحادي ستيارات الألومنيوم aluminum monostearate والجيلاتين gelatin.

وإذا كان المركب غير ثابت في الأوساط المائية aqueous media أو كانت ذائبيته منخفضة في الأوساط المائية، يمكن إعداده في التركيبة على شكل ركاز concentrate في المذيبات العضوية. وبعد ذلك يمكن تخفيف الركاز للحصول على تركيز منخفض في النظام المائي، ويمكن أن يكون ثابتاً بشكل كافٍ لفترة زمنية قصيرة أثناء إعطاء الجرعات. ولذلك ووفقاً لوجه آخر، يتم توفير تركيب صيدلي يشتمل على محلول غير مائي مكون بالكامل من مذيب عضوي واحد أو أكثر، يمكن إعطاء جرعات منه كما هو أو الأكثر شيوعاً تخفيفه بسواغ ملائم يعطى داخل الوريد (مثل محلول ملحي saline، دكستروز dextrose، منظم أو غير منظم درجة الحموضة buffered or not buffered) قبل الإعطاء (انظر ما جاء في مقالة بعنوان solubilizing excipients in oral and injectable formulations، مجلة Pharmaceutical Research، المجلد ٢١، العدد ٢، ص: ٢٠١-٢٣٠، ٢٠٠٤م). وتشمل أمثلة المذيبات وخوافض التوتر السطحي غليكول البروبلين propylene glycol، PEG300، PEG400، إيثانول ethanol، ثنائي مثيل أسيتاميد dimethylacetamide (DMA)، N-مثيل-٢-بيروليدون N-methyl-2-pyrrolidone (NMP)، من شركة فارماسولف Pharmasolve)، الغليسرين glycerin، كريموفور ئي إل Cremophor EL، كريموفور آر إتش ٦٠ Cremophor RH 60 ومتعدد السوربات polysorbate. وتتكون المحاليل غير المائية الخاصة من غليكول بروبيلين propylene glycol بنسبة تتراوح من ٧٠-٨٠٪، وإيثانول

ethanol بنسبة تتراوح من ٢٠-٣٠٪. ويتكون محلول غير مائي خاص من غليكول بروبيلين propylene glycol بنسبة ٧٠٪، وإيثانول ethanol بنسبة ٣٠٪. ويتكون محلول غير مائي آخر من غليكول بروبيلين propylene glycol بنسبة ٨٠٪ وإيثانول ethanol بنسبة ٢٠٪. وعادة ما تستخدم هذه المذيبات بشكل متوالف ويتم تخفيفها عادة بمقدار ضعفين على الأقل قبل حقنها داخل الوريد في صورة جرعات كبيرة أو تسريبها داخل الوريد. وتبلغ المقادير النموذجية للغليسرين glycerin، غليكول البروبيلين propylene glycol، PEG300، PEG400 حوالي ٥٠٪ وتبلغ المقادير النموذجية للإيثانول ethanol حوالي ٢٠٪ بالنسبة للتركيبات التي تعطى بالحقن في الوريد في صورة جرعات كبيرة. أما في التركيبات التي تعطى بالتسريب في الوريد فيبلغ المقدار النموذجي للغليسرين glycerin حوالي ١٥٪، لِـ DMA حوالي ٣٪، ولغليكول البروبيلين propylene glycol و PEG300 و PEG400 والإيثانول ethanol حوالي ١٠٪.

وفي أحد التجسيدات المفضلة للاختراع، يكون التركيب الصيدلي في صورة ملائمة للإعطاء داخل الوريد، مثلاً بالحقن أو بالتسريب. وبالنسبة للإعطاء داخل الوريد، يمكن إعطاء جرعات من المحلول كما هو، أو يمكن حقنه في كيس تسريب infusion bag (يحتوي على سواغ مقبول صيدلياً، مثلاً محلول ملحي saline تركيزه ٠.٩٪ أو دكستروز dextrose تركيزه ٥٪)، قبل الإعطاء.

وفي تجسيد مفضل آخر، يكون التركيب الصيدلي في صورة ملائمة للإعطاء تحت الجلد sub-cutaneous (s.c.).

وتشمل أشكال الجرعات الصيدلية الملائمة للإعطاء عن طريق الفم oral الأقراص tablets، الكبسولات capsules، الأقراص الكبسولية caplets، الحبوب pills، الأقراص الدوائية lozenges، الأشربة syrups، المحاليل solutions، المساحيق powders، الحبيبات granules، الأكاسير elixirs والمعلقات suspensions، الأقراص التى تعطى تحت اللسان sublingual tablets، رقاقات wafers أو لطخات patches ولطخات تعطى في الخد buccal patches.

ويمكن إعداد التراكيب الصيدلية التي تحتوي على مركب بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح بالإضافة إلى حمض منه وفقاً لتقنيات معروفة، انظر مثلاً ما جاء في كتاب Remington's Pharmaceutical Sciences، إصدار شركة ماك ببليشنغ كومباني Mack Publishing Company، مدينة إيستون Easton، ولاية بنسلفانيا، الولايات المتحدة الأمريكية.

ويمكن إعداد تراكيب تحتوي على المركبات بالصيغة (I^0) وصيغ فرعية منها كما حدد في طلب براءة الاختراع الدولي رقم ٢٠٠٥/٠١٢٢٥٦ بالكيفية الموصوفة فيه وفي هذا الطلب.

وبالتالي، يمكن أن تحتوي تراكيب الأقراص على جرعات وحدية من المركب الفعال active compound مع مادة مخففة diluent أو حاملة carrier خاملة مثل السكر sugar أو الكحول السكري sugar alcohol، على سبيل المثال اللاكتوز lactose، السكروز sucrose، السوربيتول sorbitol أو المانيتول mannitol؛ و/أو مادة مخففة مشتقة من مادة غير سكرية non-sugar derived diluent مثل كربونات الصوديوم sodium carbonate، فوسفات الكالسيوم calcium phosphate، كربونات الكالسيوم calcium carbonate أو السليلوز cellulose أو مشتقات منه مثل مثيل السليلوز methyl cellulose، إثيل السليلوز ethyl cellulose، هيدروكسي بروبيل مثيل السليلوز hydroxypropyl methyl cellulose ومواد نشوية starches مثل نشا الذرة corn starch. وقد تحتوي الأقراص كذلك على مقومات قياسية مثل عوامل الربط binding agents وعوامل تكوين الحبيبات granulating agents على سبيل المثال بيروليدون متعدد الفينيل polyvinylpyrrolidone، مواد مفتتة disintegrants (مثل بوليمرات متقاطعة الروابط قابلة للانتفاخ swellable crosslinked polymers مثلاً كربوكسي مثيل سليلوز متقاطع الروابط crosslinked carboxymethylcellulose)، عوامل تزليق lubricating agents (مثل مركبات الستيارات stearates)، مواد حافظة preservatives (مثل مركبات البارابن parabens)، مضادات تأكسد antioxidants (مثل BHT)، عوامل منظمة لدرجة الحموضة buffering agents (مثل المحاليل المنظمة لدرجة الحموضة الفوسفاتية phosphate أو الستراتية citrate)، وعوامل فوارة effervescent agents مثل مزائج من الستارات والبيكربونات citrate/bicarbonate mixtures. وهذه السواغات معروفة جيداً ولا حاجة لعرضها بالتفصيل في هذا البيان.

وقد تشكل تركيبات الكبسولات من مركبات جيلاتينية صلبة hard gelatin أو لينة soft gelatin مختلفة ويمكن أن تحتوي على المكون الفعال في صورة صلبة solid، شبه صلبة semi-solid أو سائلة liquid. ويمكن أن تُشكَّل الكبسولات الجيلاتينية gelatin capsules من جيلاتين حيواني animal gelatin أو مكافئات منه مشتقة من النبات أو اصطناعية.

ويمكن أن تكون أشكال الجرعات الصلبة (مثل الأقراص، الكبسولات ..الخ) مغلفة coated أو غير مغلفة un-coated، لكن عادة تشتمل على غلاف مثل غلاف غشائي واقٍ

protective film coating (على سبيل المثال غلاف شمعي wax أو راتنجي صقيل varnish) أو غلاف لضبط الإطلاق release controlling coating. ويمكن إعداد الغلاف (مثل الغلاف المصنوع من بوليمر من نوع إيودراجيت Eudragit (علامة تجارية)) لإطلاق المكون الفعال عند الموقع المرغوب في القناة المعدية المعوية gastro-intestinal tract. وبالتالي، يمكن اختيار الغلاف بحيث ينحل تحت ظروف محددة من درجة الحموضة داخل القناة المعدية المعوية، وبالتالي يتم إطلاق المركب في المعدة stomach أو في المعي اللفائفي ileum أو الإثني عشر duodenum بشكل انتقائي.

وبدلاً من، أو بالإضافة إلى، الغلاف يمكن أن يتواجد العقار في مادة أساس صلبة solid matrix تشتمل على عامل لضبط الإطلاق release controlling agent، مثل عامل لتأخير الإطلاق release delaying agent يمكن إعداده لإطلاق المركب بشكل انتقائي تحت ظروف متغيرة الحموضة acidity أو القلوية alkalinity في القناة المعدية المعوية. وبشكل بديل، يمكن أن تكون مادة الأساس أو الغلاف المؤخر للإطلاق release retarding coating على شكل بوليمر قابل للحت erodible polymer (مثل بوليمر أنهيدريد المالئيك maleic anhydride polymer) يمكن أن ينحت بشكل متواصل جوهرياً عندما يمر شكل الجرعة خلال القناة المعدية المعوية. وكبديل آخر، يمكن إعداد المركب الفعال في نظام تصريف delivery system يعمل على تزويد ضبط تناضحي osmotic release لإطلاق المركب. ويمكن تحضير التركيبات ذات الإطلاق التناضحي وغيرها من التركيبات الأخرى ذات الإطلاق المتأخر أو طويل الأجل sustained release وفقاً للطرق المعروفة لأولئك المتمرسين في التقنية.

ويمكن إعطاء التركيبات الصيدلية إلى المريض في صورة "عبوات مخصصة للمرضى patient packs" تحتوي على كمية العلاج الكلية في عبوة واحدة، عادة عبوة منفطة blister pack. وللعبوات المخصصة للمرضى ميزة تفوق الوصفات الطبية التقليدية، حيث يقسم الصيدلي الشكل الصيدلي المزود للمريض من مصدر سائب bulk supply، وتتمثل في أن المريض يتوصل دائماً إلى محتوى العبوة الموجود ضمن عبوة المريض، وهذا مفقود عادة في الوصفات الطبية التي تصرف للمريض. ولقد تبين أن تضمين محتوى العبوة يحسن استجابة المريض لتعليمات الطبيب.

وتشمل التراكيب المستخدمة موضعياً المراهم ointments، الكريمات creams، الرذاذات sprays، اللطخات patches، الهلامات gels، القطرات السائلة liquid drops والمواد المدخلة inserts

(مثل المواد المدخلة التي تعطى داخل العين intraocular inserts). ويمكن إعداد هذه التراكيب وفقاً للطرق المعروفة.

وعادة ما تعطى التراكيب المعدة للاستخدام عن غير طريق القناة الهضمية في صورة محاليل مائية أو زيتية معقمة أو معلقات دقيقة fine suspensions، أو يمكن أن تزود على شكل مسحوق معقم دقيق التجزئة finely divided sterile powder form يتم تشكيله بصورة غير معدة سابقاً باستخدام ماء معقم معد للحقن.

وتشمل أمثلة التركيبات المعدة للإعطاء في المستقيم rectal أو داخل المهبل intra-vaginal الفرزجات pessaries والتحاميل suppositories التي يمكن أن تشكل مثلاً من مادة شمعية waxy material أو مادة قابلة للتشكيل تحتوي على المركب الفعال.

ويمكن أن تكون التراكيب المعدة للإعطاء بالاستنشاق في صورة تراكيب من مساحيق قابلة للاستنشاق inhalable powder compositions أو رذاذات من مادة سائلة أو مسحوق liquid or powder sprays، ويمكن أن تعطى بصورة مألوفة باستخدام أجهزة استنشاق مسحوق powder inhaler devices أو أجهزة تصريف حلالة هوائية aerosol dispensing devices. وهذه الأجهزة معروفة جيداً. وللإعطاء بالاستنشاق، عادة ما تشتمل التركيبات التي تكون في صورة مسحوق على المركب الفعال مع مسحوق من مادة مخففة صلبة خاملة مثل اللاكتوز lactose.

وعموماً يتم إعطاء المركبات بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح بالإضافة إلى حمض منها في صورة جرعات وحدية وبهذه الصفة، فإنها تحتوي عادة على كمية كافية من المركب للحصول على مستوى مرغوب من الفعالية الحيوية biological activity. فعلى سبيل المثال، قد تحتوي تركيبة على المقوم الفعال بمقدار يتراوح من ١ نانوغرام إلى ٢ غرام، مثلاً من ١ نانوغرام إلى ٢ مليغرام. وتستخدم أمداء فرعية معينة للمركب ضمن هذا المدى بحيث يتراوح مقدار المقوم الفعال من ٠.١ مليغرام إلى ٢ غرام (وعادة أكثر من ١٠ مليغرام إلى ١ غرام، مثلاً من ٥٠ مليغرام إلى ٥٠٠ مليغرام)، أو من ١ ميكروغرام إلى ٢٠ مليغرام (مثلاً من ١ ميكروغرام إلى ١٠ مليغرام، على سبيل المثال من ٠.١ مليغرام إلى ٢ مليغرام).

ويتم إعطاء المركب الفعال إلى مريض بحاجة إليه (مثلاً مريض من إنسان أو حيوان) بمقدار يكفي للحصول على التأثير العلاجي المرغوب.

طرق المعالجة Methods of Treatment

ومن المدرك أن مركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأملاحه بالإضافة إلى حمض، وبصفة خاصة أملاح المسيلات mesylate، الأسيتات acetate والهيدروكلوريد hydrochloride (وبصفة أخص ملحي المسيلات mesylate والأسيتات acetate ومخاليط منهما)، أو المركبات بالصيغة (I^0) كما حدد في هذا البيان تكون مفيدة في معالجة أو الوقاية من مجموعة من الحالات المرضية التي تتوسطها انزيمات الكيناز المعتمدة على السيكلين cyclin dependent kinases و غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3. وأمثلة الحالات المرضية هذه موضحة أعلاه.

وعموماً يتم إعطاء المركب وأملاحه إلى كائن خاضع للمعالجة بحاجة لمثل هذا الإعطاء، مثلاً مريض من إنسان أو حيوان ويفضل إنسان.

وعادة يتم إعطاء المركب وأملاحه بمقادير مفيدة علاجياً أو وقائياً وغير سامة عموماً. إلا أنه في بعض الحالات (مثلاً في حالة الأمراض التي تهدد الحياة)، قد تفوق فوائد إعطاء المركب أو أملاحه عيوب أي تأثيرات سامة أو جانبية، وفي هذه الحالة قد يكون من المرغوب إعطاء المركب أو أملاحه بمقادير مقترنة بدرجة السمية degree of toxicity.

ويمكن إعطاء المركب أو ملحه كما حدد في هذا البيان خلال فترة زمنية طويلة للحفاظ على التأثيرات العلاجية المفيدة أو يمكن إعطاؤه لفترة زمنية قصيرة فحسب. وبشكل بديل يمكن إعطاؤه بكيفية متواصلة continuous أو متقطعة pulsatile.

ويمكن أن يتراوح مقدار الجرعة اليومية daily dose النموذجية للمركب أو ملحه من ١٠٠ بيكوغرام إلى ١٠٠ مليغرام لكل كيلوغرام من وزن الجسم، وعادة أكثر من ٥ نانوغرام إلى ٢٥ مليغرام لكل كيلوغرام من وزن الجسم، وعادة أكثر من ١٠ نانوغرام إلى ١٥ مليغرام لكل كيلوغرام (مثلاً من ١٠ نانوغرام إلى ١٠ مليغرام، وعادة أكثر من ١ ميكروغرام لكل كيلوغرام إلى ٢٠ مليغرام لكل كيلوغرام، مثلاً من ١ ميكروغرام إلى ١٠ مليغرام لكل كيلو غرام) من وزن الجسم ومع ذلك يمكن إعطاء جرعات بمقادير أعلى أو أقل حسب الحاجة. ويمكن إعطاء المركب أو ملحه بشكل يومي daily basis أو بشكل متكرر كل يومين، أو ٣، أو ٤، أو ٥، أو ٦، أو ٧، أو ١٠، أو ١٤، أو ٢١، أو ٢٨ يوماً مثلاً.

ويشمل مثال لجرعة يتم إعطاؤها لشخص يبلغ وزنه ٦٠ كيلوغرام إعطاء المركب بالصيغة (I) كما حدد في هذا البيان، مثلاً القاعدة الحرة free base للمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide بجرعة ابتدائية تتراوح من ٤.٥ إلى ١٠.٨ ملغم/٦٠ كغم/يوم (ما يكافىء ٧٥ إلى ١٨٠ ميكروغرام/كغم/يوم) ثم إعطاؤه جرعة فعالة تتراوح من ٤٤ إلى ٩٧ ملغم/٦٠ كغم/يوم (ما يكافىء ٠.٧ إلى ١.٦ ملغم/كغم/يوم) أو إعطاؤه جرعة فعالة تتراوح من ٧٢ إلى ٢٧٤ ملغم/٦٠ كغم/يوم (ما يكافىء ١.٢ إلى ٤.٦ ملغم/كغم/يوم) ومع ذلك يمكن إعطاء جرعات بمقادير أعلى أو أقل حسب الحاجة. وتعطى الجرعة بوحدة ملغم/كغم بالتناسب مع أي وزن جسم معين.

ويشمل مثال لجرعة من ملح المسيلات mesylate إعطاءه بجرعة ابتدائية تتراوح من ٥.٦ إلى ١٣.٥ ملغم/٦٠ كغم/يوم (ما يكافىء ٩٣ إلى ٢٢٥ ميكروغرام/كغم من وزن الشخص/يوم) ثم جرعة فعالة تتراوح من ٥٥ إلى ١٢٢ ملغم/٦٠ كغم/يوم (ما يكافىء ٠.٩ إلى ٢.٠ ملغم/كغم من وزن الشخص/يوم) أو جرعة فعالة تتراوح من ٩٠ إلى ٣٤٥ ملغم/٦٠ كغم/يوم (ما يكافىء ١.٥ إلى ٥.٨ ملغم/كغم من وزن الشخص/يوم) ومع ذلك يمكن إعطاء جرعات بمقادير أعلى أو أقل حسب الحاجة. وفي النهاية، تتناسب كمية المركب المعطى ونوع التركيب المستخدم مع طبيعة المرض أو الحالة الفسيولوجية المعالجة وتكون حسب تقدير الطبيب المعالج.

ووفقاً لجدول إعطاء جرعات معين، يتم تسريب المركب أو ملحه في المريض لفترات تبلغ ساعة واحدة يومياً لمدة ١٠ أيام على الأكثر وبصفة خاصة لمدة ٥ أيام على الأكثر لمدة أسبوع، وتكرر المعالجة على فترات مرغوبة تتراوح مثلا من أسبوعين إلى أربعة أسابيع، وبشكل خاص كل ٣ أسابيع.

وبصفة أخص، يتم تسريب المركب أو ملحه في المريض لفترات تبلغ ساعة واحدة يومياً لمدة ٥ أيام وتكرر المعالجة كل ٣ أسابيع.

وفي جدول إعطاء جرعة خاص آخر، يتم تسريب العلاج في المريض خلال فترة تتراوح من ٣٠ دقيقة إلى ساعة واحدة ثم يتم المحافظة على جرعات تسريب لفترات متفاوتة، على سبيل المثال من ساعة إلى خمس ساعات، مثلاً ٣ ساعات.

وفي جدول إعطاء جرعة خاص آخر، يتم تسريب العلاج في المريض بشكل متواصل لفترة تتراوح من ١٢ ساعة إلى ٥ أيام، وبشكل خاص يتم التسريب بشكل متواصل لفترة تتراوح من ٢٤ ساعة إلى ٧٢ ساعة.

وفي جدول جرعات آخر، يمكن استخدامه مثلاً في معالجة سرطان الدم اللمفي المزمن chronic lymphocytic leukaemia، يُسرَّب العلاج في المريض لمدة تتراوح من ساعتين إلى ٦ ساعات (وعادة من ٣ إلى ٥ ساعات)، ويُكرر هذا التسريب على فترات تتراوح من ٦ إلى ٨ أيام لمدة ٣، ٤ أو ٥ أسابيع. وفي تجسيد مفضل لهذا الجدول، يُسرَّب العلاج في المريض لمدة ٤ ساعات، مرة واحدة أسبوعياً، لمدة ٤ أسابيع.

ومع ذلك تتناسب كمية المركب المعطى ونوع التركيب المستخدم في النهاية مع طبيعة المرض أو الحالة الفسيولوجية المعالجة وتكون حسب تقدير الطبيب المعالج.

ويمكن إعطاء المركب أو أملاحه بصفتها العامل العلاجي الوحيد أو يمكن إعطاؤها في صورة علاج متوالف مع مركب آخر واحد أو أكثر لمعالجة الحالة المرضية الخاصة، على سبيل المثال مرض ورمي neoplastic disease مثل السرطان cancer كما حدد أعلاه. وتشمل أمثلة العوامل العلاجية الأخرى أو العلاجات الأخرى التي يمكن إعطاؤها أو استخدامها مع (سواء تم إعطاؤها بشكل متزامن أو على فترات زمنية مختلفة) المركبات وفقاً للاختراع على سبيل المثال لا الحصر مثبطات توبوأيزوميراز topoisomerase inhibitors، عوامل الألكلة alkylating agents، مضادات النواتج الأيضية antimetabolites، رابطات الـ DNA DNA binders، مثبطات النبيبات الدقيقة microtubule inhibitors (عوامل استهداف التوبولين tubulin targeting agents)، الأجسام المضادة أحادية النسيلة monoclonal antibodies ومثبطات تحويل الإشارة signal transduction inhibitors، وتكمن أمثلة خاصة عليها في السيسبلاتين cisplatin، الفوسفاميد الحلقي cyclophosphamide، الدوكسوروبيسين doxorubicin، الإرينوتيكان irinotecan، الفلودارابين fludarabine، 5FU، مركبات التاكسان taxanes، الميتوميسين mitomycin C C والعلاج بالإشعاع radiotherapy.

وعندما يتم إعطاء المركب بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح بالإضافة إلى حمض منه في صورة علاج متوالف مع عامل علاجي آخر واحد، اثنين، ثلاثة، أربعة أو أكثر (ويفضل واحد أو اثنين والأفضل واحد)، يمكن إعطاء المركبات بشكل متزامن simultaneously أو متعاقب

sequentially. وعند إعطائها بشكل متعاقب، يمكن إعطاء المركبات على فترات متقاربة (مثلاً خلال فترة تتراوح من ٥ إلى ١٠ دقائق) أو على فترات متباعدة (مثلاً متباعدة بمقدار ساعة واحدة، ساعتين، ثلاث، أربع ساعات أو أكثر، أو فترات متباعدة أكثر حسب الحاجة)، ويتناسب نظام الجرعات الدقيق مع خواص العامل (العوامل) العلاجي.

ويمكن أيضاً إعطاء المركب بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح بالإضافة إلى حمض منه بالاقتران مع علاجات غير كيميائية non-chemotherapeutic treatments مثل العلاج بالإشعاع radiotherapy، العلاج الدينامي الضوئي photodynamic therapy، العلاج بالجينات gene therapy؛ الجراحة surgery والحميات المضبوطة controlled diets.

ولاستخدامه في علاج متوالف مع عامل علاج كيميائي آخر، يمكن إعداد المركب بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح بالإضافة إلى حمض منه وعامل علاجي واحد، اثنين، ثلاثة، أربعة أو أكثر من العوامل العلاجية الأخرى، على سبيل المثال، معاً في شكل جرعة يحتوي على عاملين علاجيين، أو ثلاثة، أو أربعة عوامل علاجية أو أكثر. وبشكل بديل، يمكن إعداد العوامل العلاجية المنفردة بشكل منفصل وتقديمها معاً على شكل طقم kit، مزود اختيارياً بتعليمات لاستخدامها.

وسيدرك الشخص المتمرس في التقنية من خلال معرفته العامة أنظمة إعطاء الجرعة والعلاجات المتوالفة التي سيستخدمها.

طرق التشخيص Methods of Diagnosis

قبل إعطاء المركب بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح بالإضافة إلى حمض منه، يمكن فحص المريض لتحديد ما إذا كان بالإمكان معالجة المرض أو الحالة التي يعاني منها أو قد يعاني منها باستخدام مركب له فعالية مضادة لانزيمات الكيناز المعتمدة على السيكلين cyclin dependent kinases.

فعلى سبيل المثال، يمكن أخذ عينة إحيائية biological sample من المريض وتحليلها لتحديد ما إذا كانت حالة أو مرض، مثل السرطان، يعاني أو قد يعاني منها المريض تتميز بالشذوذ الجيني genetic abnormality أو التعبير البروتيني الشاذ abnormal protein expression الذي يؤدي إلى فرط تنشيط over-activation انزيمات CDK أو سرعة تأثر المسارات المؤدية إلى الفعالية الطبيعية normal activity لـ CDK. وتشمل أمثلة هذه الحالات الشاذة التي تؤدي إلى

تنشيط أو سرعة تأثر إشارة CDK2 زيادة تنظيم سيكلين up-regulation of cyclin E E، (انظر ما جاء عن هارويل آر إم Harwell RM، مُل بي بي Mull BB، بورتر دي سي Porter DC، كيومارسي كيه Keyomarsi K.؛ في مجلة J Biol Chem؛ الصادرة في ٢٦ مارس ٢٠٠٤م؛ المجلد ٢٧٩؛ العدد ١٣؛ ص: ١٢٦٩٥-١٢٧٠٥) أو فقدان p21 أو p27، أو وجود أشكال متغايرة variants من CDC4 (انظر ما جاء عن راجاجوبالان إتش Rajagopalan H، جاليبالي بيه في Jallepalli PV، راجو سي Rago C، فلكوليسكو في ئي Velculescu VE، كنزلر كيه دبليو Kinzler KW، فوجلشتين بي Vogelstein B، لنغور سي Lengauer C؛ في مجلة Nature؛ الصادرة في ٤ مارس ٢٠٠٤م؛ المجلد ٤٢٨؛ العدد ٦٩٧٨؛ ص: ٧٧-٨١). وقد تكون الأورام tumours المقترنة بطوافر mutants من CDC4 أو زيادة تنظيم، وبصفة خاصة فرط التعبير عن سيكلين E cyclin E أو فقدان p21 و p27 سريعة التأثر بصفة خاصة بمثبطات CDK. ويشمل مصطلح زيادة التنظيم up-regulation كما استخدم في هذا البيان التعبير المتزايد elevated expression أو فرط التعبير over-expression، بما في ذلك التضخيم الجيني gene amplification (أي نسخ جينية متعددة multiple gene copies) وزيادة التعبير بفعل تأثير الانتساخ transcriptional effect وفرط النشاط hyperactivity والتنشيط activation، بما في ذلك التنشيط بواسطة الطفرات mutations.

وهكذا، يمكن إخضاع المريض لاختبار تشخيصي للكشف عن واسم marker يميز زيادة تنظيم سيكلين cyclin E E أو فقدان p21 أو p27 أو وجود أشكال متغايرة من CDC4. ويشمل مصطلح التشخيص عملية الفحص. ويقصد بالواسم الواسمات الجينية genetic markers بما فيها على سبيل المثال قياس تركيب الـ DNA لتحديد وجود طفرات من CDC4. ويشمل مصطلح الواسم أيضاً واسمات مميزة لزيادة تنظيم سيكلين cyclin E E، بما في ذلك الفعالية الانزيمية enzyme activity، مستويات الانزيم، حالة الانزيم (مثلاً مضاف إليه فوسفوريل phosphorylated أو لا) ومستويات mRNA للبروتينات المذكورة مسبقاً. وقد تكون الأورام المقترنة بزيادة تنظيم سيكلين cyclin E E أو فقدان p21 أو p27 بصفة خاصة سريعة التأثر بمثبطات CDK. وقد يكون من المفضل فحص الأورام لتحديد زيادة تنظيم سيكلين cyclin E E أو فقدان p21 أو p27 قبل المعالجة. وبالتالي، يمكن إخضاع المريض لاختبار تشخيصي للكشف عن الواسم المميز لزيادة تنظيم سيكلين cyclin E E أو فقدان p21 أو p27.

وعادة تجرى الاختبارات التشخيصية على عينات إحيائية تختار من عينات خزعة ورم tumour biopsy samples، عينات دم (عزل وإغناء خلايا ورمية معزولة shed tumour cells)، عينات براز stool biopsies، بصاق sputum، تحليل كروموسومي chromosome analysis، سائل غشاء الرئة pleural fluid، سائل صفاقي peritoneal fluid أو بول urine.

ولقد وجد راجاجوبالان Rajagopalan ومعاونوه في مجلة Nature؛ الصادرة في ٤ مارس ٢٠٠٤م؛ المجلد ٤٢٨؛ العدد ٦٩٧٨؛ ص: ٧٧-٨١ أن ثمة طفرات موجودة في CDC4 (يُعرف أيضاً بـ Fbw7 أو أرتشيبيلاغو Archipelago) في سرطانات القولون والمستقيم colorectal cancers وسرطانات بطانة الرحم endometrial cancers البشرية (انظر ما جاء عن سبراك Spruck ومعاونيه، في مجلة Cancer Res.، الصادرة في ١٥ أغسطس ٢٠٠٢م؛ المجلد ٦٢؛ العدد ١٦؛ ص: ٤٥٣٥-٤٥٣٩). وقد يعني تمييز شخص يحمل طفرة في CDC4 أن المريض يصلح بصفة خاصة للمعالجة بمثبط CDK. وقد يفضل فحص الأورام لتحديد وجود شكل متغاير من CDC4 قبل المعالجة. وتتضمن عملية الفحص عادة تتبع السياق بشكل مباشر direct sequencing، التحليل الصفيفي الدقيق لقليلات النيوكليوتيد oligonucleotide microarray analysis، أو استخدام جسم مضاد متخصص بالطافرة mutant specific antibody.

وتعتبر طرق تمييز وتحليل الطفرات وزيادة تنظيم البروتينات معروفة جيداً للأشخاص المتمرسين في التقنية. وقد تشمل طرق الفحص، على سبيل المثال لا الحصر، الطرق القياسية مثل تفاعل البلمرة الانزيمية المتسلسل بالانتساخ العكسي reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) أو التهجين اللابد in-situ hybridisation.

وفي عملية الفحص بواسطة RT-PCR، يُقدر مستوى mRNA في الورم بتكوين نسخة cDNA من mRNA ثم تضخيم cDNA بواسطة تفاعل PCR. وتعرف طرق التضخيم بواسطة PCR، انتقاء البوادىء selection of primers، وظروف التضخيم للأشخاص المتمرسين في التقنية. وتجرى عمليات المعالجة بالحمض النووي nucleic acid و PCR بطرق قياسية، كما وصف مثلاً فيما جاء عن إف.إم. أوسوبيل Ausubel, F.M. ومعاونيه، في كتاب بعنوان Current Protocols in Molecular Biology، إصدار شركة جون وايلي آند صنز إنك John Wiley & Sons Inc، ٢٠٠٤م، أو ما جاء عن إم. إيه. إنيس Innis, M.A. ومعاونيه في كتاب بعنوان PCR Protocols: a guide to methods and applications، إصدار شركة أكاديميك برس Academic Press، سان

دييغو San Diego، ١٩٩٠م. وتوصف أيضاً التفاعلات وعمليات المعالجة التي تتضمن تقنيات الحمض النووي nucleic acid فيما جاء عن سامبروك Sambrook ومعاونيه في كتاب بعنوان Molecular Cloning: A Laboratory Manual، الطبعة الثالثة، إصدار شركة كولد سبرينغ هاربر لابوراتوري برس Cold Spring Harbor Laboratory Press، ٢٠٠١م. وبشكل بديل يمكن استخدام طقم متوفر تجارياً لتفاعل RT-PCR (على سبيل المثال مزود من شركة روتش موليكيولار بيوكيميكالز Roche Molecular Biochemicals)، أو المنهجية المذكورة في براءات الاختراع الأمريكية أرقام ٤.٦٦٦.٨٢٨؛ ٤.٦٨٣.٢٠٢؛ ٤.٨٠١.٥٣١؛ ٥.١٩٢.٦٥٩؛ ٥.٢٧٢.٠٥٧؛ ٥.٨٨٢.٨٦٤؛ و ٦.٢١٨.٥٢٩، المذكورة في هذا البيان للإحالة إليها كمرجع.

ومن أمثلة تقنيات التهجين اللابد المستخدمة لتقدير مستوى تعبير mRNA طريقة التهجين اللابد الفلوري (FISH) (انظر ما جاء عن أنجيرر Angerer، في مجلة Meth. Enzymol.، المجلد ١٥٢، ص: ٦٤٩، ١٩٨٧م).

وعموماً، تتضمن طريقة التهجين اللابد الخطوات الرئيسية التالية: (١) تثبيت النسيج المراد تحليله؛ (٢) إجراء معالجة قبل التهجين prehybridization treatment للعينة لزيادة إمكانية الوصول إلى الحمض النووي nucleic acid المستهدف ولتقليل الربط اللانوعي nonspecific binding؛ (٣) تهجين مزيج الأحماض النووية hybridization of the mixture of nucleic acids للحصول على الحمض النووي nucleic acid في البنية الحيوية أو النسيج الحيوي؛ (٤) إجراء عمليات غسل بعد التهجين لإزالة أجزاء الحمض النووي nucleic acid fragments التي لم ترتبط في عملية التهجين؛ و (٥) الكشف عن أجزاء الحمض النووي المهجنة. وعادة تكون المسابير probes المستخدمة في هذه التطبيقات موسومة labeled، مثلاً بنظائر مشعة radioisotopes أو مجموعات مقررة فلورية fluorescent reporters. وتكون المسابير المفضلة طويلة بما يكفي، مثلاً تحتوي من حوالي ٥٠، ١٠٠، أو ٢٠٠ نيوكليوتيد إلى حوالي ١٠٠٠ نيوكليوتيد أو أكثر، للسماح بإجراء تهجين نوعي specific hybridization بواسطة الحمض (الأحماض) النووي nucleic acid المستهدف تحت ظروف شديدة. وتوصف الطرق القياسية لإجراء FISH فيما جاء عن إف.إم. أوسوبيل Ausubel, F.M. ومعاونيه، في كتاب بعنوان Current Protocols in Molecular Biology، إصدار شركة جون وايلي آند صنز إنك John Wiley & Sons Inc، ٢٠٠٤م، ومقالة بعنوان Fluorescence In Situ Hybridization: Technical Overview باسم جون إم. إس. بارتليت John M.

S. Bartlett. في كتاب Molecular Diagnosis of Cancer, Methods and Protocols، الطبعة الثانية؛ برقم كتاب قياسي دولي (ISBN): 1-59259-760-2؛ صادر في مارس ٢٠٠٤م، الملحق الإضافي: 077-088؛ سلسلة Methods in Molecular Medicine.

وبشكل بديل، يمكن معايرة النواتج البروتينية protein products المعبر عنها من جزيئات الـ mRNA بواسطة دراسة الكيمياء النسيجية المناعية immunohistochemistry للعينات الورمية tumour samples، المعايرة المناعية في الطور الصلب solid phase immunoassay باستخدام صفائح عيارية دقيقة microtiter plates، تنشيف ويسترن Western blotting، الرحلان الكهربائي ثنائي البعد على هلام متعدد أكريل أميد باستخدام كبريتات دوديسيل الصوديوم 2-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis، المعايرة المناعية الإشرابية المرتبطة بالانزيم (ELISA) Enzyme-Linked ImmunoSorption Assay، قياس الخلايا التدفقي flow cytometry وطرق أخرى معروفة في التقنية للكشف عن بروتينات معينة. وقد تشمل طرق الكشف استخدام أجسام مضادة نوعية الموضع site specific antibodies. وسيدرك الأشخاص المتمرسون أنه يمكن استخدام كل هذه التقنيات المعروفة للكشف عن زيادة تنظيم سيكلين cyclin E E أو فقدان p21 أو p27 أو الكشف عن الأشكال المتغايرة من CDC4 في الحالة الراهنة.

وعليه، يمكن أيضاً استخدام كل هذه التقنيات لتمييز الأورام وخصوصاً تلك الملائمة بصفة خاصة للمعالجة بواسطة مركبات الاختراع.

وقد تكون الأورام المقترنة بطوافر من CDC4 أو زيادة تنظيم وبصفة خاصة فرط التعبير عن سيكلين cyclin E E أو فقدان p21 و p27 سريعة التأثر بصفة خاصة بمثبطات CDK. وقد يكون من المفضل فحص الأورام لتحديد زيادة تنظيم، وبصفة خاصة فرط التعبير عن سيكلين E cyclin E (انظر ما جاء عن هارويل آر إم Harwell RM، مُل بي بي Mull BB، بورتر دي سي Porter DC، كيومارسي كيه Keyomarsi K.؛ في مجلة J Biol Chem.؛ الصادرة في ٢٦ مارس ٢٠٠٤م؛ المجلد ٢٧٩؛ العدد ١٣؛ ص: ١٢٦٩٥-١٢٧٠٥) أو فقدان p21 أو p27، أو وجود أشكال متغايرة من CDC4 قبل المعالجة (انظر ما جاء عن راجاجوبالان إتش Rajagopalan H، جاليبالي بيه في Jallepalli PV، راجو سي Rago C، فلكوليسكو في ئي Velculescu VE، كنزلر كيه دبليو Kinzler KW، فوجلشتين بي Vogelstein B، لنغور سي Lengauer C؛ في مجلة Nature؛ الصادرة في ٤ مارس ٢٠٠٤م؛ المجلد ٤٢٨؛ العدد ٦٩٧٨؛ ص: ٧٧-٨١).

ويمكن اختيار مرضى مصابين بورم لمفي في خلايا قشرة المخ mantle cell lymphoma (MCL) لمعالجتهم بالمركب وفقاً للاختراع باستخدام الاختبارات التشخيصية الموضحة أعلاه. ويعتبر MCL عنصر سريري أمراضي clinicopathologic entity مميز لأورام لمفية غير أورام هودجكن اللمفية non-Hodgkin's lymphoma، التي تتميز بتكاثر proliferation الخلايا اللمفية صغيرة إلى متوسطة الحجم والتي تعبر بشكل مفرط عن CD5 و CD20، وهي فترة سريرية تتميز بصعوبة المعالجة وسرعة انتشار الورم، وتغير الموقع translocation بشكل متكرر t(11;14)(q13;q32). ويعتبر فرط التعبير عن mRNA لِـ سيكلين cyclin D1 D1، الموجود في الورم اللمفي لخلايا قشرة المخ (MCL)، واسم تشخيصي مهم. واقترح ياتاب Yatabe ومعاونوه في مجلة Blood، المجلد ٩٥، العدد ٧، ص: ٢٢٥٣-٢٢٦١، الصادرة بتاريخ ١ أبريل ٢٠٠٠م أنه يجب اعتبار وجود سيكلين cyclin D1 D1 أحد المعايير القياسية لوجود MCL وأنه يجب دراسة طرق العلاج الجديدة لهذا المرض العضال على أساس المعايير الجديدة. وقد طور جونز Jones ومعاونوه في مجلة J Mol Diagn.، المجلد ٦، العدد ٢، ص: ٨٤-٨٩، الصادرة في مايو ٢٠٠٤م معايرة كمية آنية الاستجابة بواسطة PCR بالانتساخ العكسي لتحديد التعبير عن سيكلين cyclin D1 D1 (CCND1) للمساعدة في تشخيص الورم اللمفي لخلايا قشرة المخ (MCL). واستخدم هاو Howe ومعاونوه (كما جاء في مجلة Clin Chem.، المجلد ٥٠، العدد ١، ص: ٨٠-٨٧، الصادرة في يناير ٢٠٠٤م) طريقة RT-PCR الكمية آنية الاستجابة لتقييم التعبير عن mRNA لِـ سيكلين cyclin D1 D1 ووجد أنه يمكن استخدام طريقة RT-PCR الكمية لـ mRNA لِـ سيكلين cyclin D1 D1 المعاير بالنسبة لِـ CD19 mRNA لِـ سيكلين cyclin D1 D1 في تشخيص MCL في الدم، النخاع marrow والأنسجة. وبشكل بديل، يمكن اختيار مريضات مصابات بسرطان الثدي breast cancer لمعالجتهم بمثبط CDK باستخدام الاختبارات التشخيصية الموضحة أعلاه. وتعبر الخلايا الورمية عادة بشكل مفرط عن سيكلين cyclin E E وقد تبين أن سيكلين E cyclin E معبر عنه بإفراط في سرطان الثدي (انظر ما جاء عن هارويل Harwell ومعاونيه، في مجلة Cancer Res، المجلد ٦٠، ص: ٤٨١-٤٨٩، ٢٠٠٠م). ولذلك يمكن معالجة سرطان الثدي تحديداً باستخدام مثبط CDK كما وضح في هذا البيان.

الاستخدام المضاد للفطريات Antifungal Use

يكفل الاختراع في وجه آخر استخدام ملح بالإضافة إلى حمض لمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، عدا عن ملح الهيدروكلوريد hydrochloride، كعامل مضاد للفطريات antifungal agent.

ويمكن استخدام الملح بالإضافة إلى حمض للمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide (عدا عن ملح الهيدروكلوريد hydrochloride)، في معالجة الحيوانات (مثلاً في معالجة الثدييات mammals مثل الإنسان)، أو في معالجة النباتات (مثلاً في الزراعة agriculture والبستنة horticulture)، أو كعوامل مضادة للفطريات بشكل عام مثل المواد الحافظة والمواد المعقمة disinfectants.

وفي أحد التجسيدات، يوفر الاختراع ملح بالإضافة إلى حمض لمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، عدا عن ملح الهيدروكلوريد hydrochloride، لاستخدامه في معالجة أو الوقاية من إصابة فطرية fungal infection في ثديي مثل الإنسان.

ويكفل الاختراع أيضاً استخدام ملح بالإضافة إلى حمض لمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، عدا عن ملح الهيدروكلوريد hydrochloride، لصنع دواء بهدف استخدامه في معالجة أو الوقاية من إصابة فطرية في ثديي مثل الإنسان.

فعلى سبيل المثال، يمكن إعطاء الأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع إلى مرضى بشريين يعانون من، أو معرضون لإصابات فطرية موضعية topical fungal infections تسببها من بين كائنات حية organisms أخرى، أنواع الكانديدا (المبيضات) Candida، التريكوفيتون (الفطر الشعروي) Trichophyton، الميكروسبورم (البويغاء) Microsporum أو الإبيديرموفيتون (الفطر البشروي) Epidermophyton، أو إصابات متعلقة بالغشاء المخاطي mucosal infections تسببها فطريات من نوع كانديدا ألبيكانز (المبيضات البيض) Candida

albicans (مثل القلاع thrush وداء المبيضات المهبلي vaginal candidiasis). ويمكن أيضاً إعطاء الأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع لمعالجة أو الوقاية من الإصابات الفطرية الجهازية systemic fungal infections التي تسببها، على سبيل المثال، أنواع الكانديدا ألبيكانز (المبيضات البيض) Candida albicans، كريتوكوكس نيوفورمانز (مكورات خفية حديثة التكوين) Cryptococcus neoformans، أسبيرجيليس فلافوس Aspergillus flavus، أسبيرجيليس فوميغاتوس (الرشاشية الدخناء) Aspergillus fumigatus، كوكيديوديز (الفطور الكرويانية) Coccidiodies، باراكوكيديودس (الفطور نظيرة الكرويانية) Paracoccidioides، هستوبلازما (الفطور الطفيلية) Histoplasma أو بلاستومايسز (الفطور البرعمية) Blastomyces.

وفي وجه آخر، يوفر الاختراع تركيب مضاد للفطريات antifungal composition لاستخدامه في مجال الزراعة (بما فيها البستنة)، يشتمل على ملح بالإضافة إلى حمض لمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، عدا عن ملح الهيدروكلوريد hydrochloride مع مادة مخففة أو حاملة مقبولة زراعياً.

ويزود الاختراع كذلك طريقة لمعالجة حيوان (بما في ذلك ثديي مثل الإنسان)، نباتات أو بذور مصابة بعدوى فطرية، حيث تتضمن معالجة الحيوان، النباتات أو البذور المذكورة، أو المواقع في النباتات أو البذور المذكورة، بمقدار فعال من ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، آخر غير ملح حمض الهيدروكلوريد hydrochloride.

ويزود الاختراع كذلك طريقة لمعالجة الإصابة بعدوى فطرية في نباتات أو بذور حيث تتضمن معالجة النباتات أو البذور بمقدار فعال مضاد للفطريات من تركيب مبيد للفطريات يحتوي على ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، آخر غير ملح حمض الهيدروكلوريد hydrochloride.

ويمكن استخدام معايرات غربلة تفاضلية differential screening assays لتحديد تخصص الأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع بانزيمات CDK غير البشرية. ويمكن استخدام

الأملاح التي تعمل بشكل متخصص على انزيمات CDK للممرضات حقيقية النواة كعوامل مضادة للفطريات أو الطفيليات. ويمكن استخدام مثبطات كيناز CDK للكانديدا (المبيضات) Candida CDK kinase، CKSI، لمعالجة داء المبيضات candidiasis. ويمكن استخدام العوامل المضادة للفطريات لمعالجة الإصابات بالعدوى من النوع المعرف مسبقاً في هذا البيان، أو الإصابة بعدوى الكائنات الانتهازية opportunistic infections التي تحدث عادة في المرضى الضعفاء والمكبوتين مناعياً debilitated and immunosuppressed patients مثل المرضى المصابين بسرطانات الدم leukemias والأورام الليمفية lymphomas، المرضى الذين يتلقون علاج كابت للمناعة، والمرضى ذوي الاستعداد المسبق للإصابة بمثل هذه الحالات مثل داء السكري diabetes mellitus أو متلازمة نقص المناعة المكتسبة Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)، بالإضافة إلى المرضى غير المكبوتين مناعياً.

ويمكن استخدام المعايرات الموصوفة في التقنية لتحديد صلاحية في تثبيط فطر واحد على الأقل يسبب مرض فطري mycosis مثل داء المبيضات، داء الرشاشيات aspergillosis، داء فطور الميكور mucormycosis، داء فطري جرثومي blastomycosis، داء الفطور الأرضية المشعرة geotrichosis، داء المكورات الخفية cryptococcosis، داء الفطور البرعمية الملونة chromoblastomycosis، داء الفطور الكروية coccidiodomycosis، داء بوغ غباري conidiosporosis، الهستوبلازمية histoplasmosis، فطرية مادورة madduromycosis، التهاب الغشاء المخاطي الأنفي الفطري rhinosporidosis، الإصابة بالنوكارديا nocardiosis، داء الفطر الشعاعي الكاذب para-actinomycosis، البنسيلية penicilliosis، داء الطوقيات moniliasis، أو داء الشعريات المبوغة sporotrichosis. ويمكن استخدام معايرات الغربلة التفاضلية لتحديد الفاعلية المضادة للفطريات التي قد تكون ذات أهمية علاجية في معالجة داء الرشاشيات باستخدام جينات CDK منسولة من خميرة yeast مثل أسبرجيليس فوميغاتوس (الرشاشية الدخناء) Aspergillus fumigatus، أسبرجيليس فلافوس Aspergillus flavus، أسبرجيليس نيغر (الرشاشية السوداء) Aspergillus niger، أسبرجيليس نيديولانز Aspergillus nidulans، أو أسبرجيليس تيريوس Aspergillus terreus، أو عندما تكون الإصابة بالعدوى الفطرية عبارة عن داء فطور الميكور، ويمكن إجراء معايرة لتحديد فعالية CDK باستخدام خميرة yeast مثل ريزوبس أريزوس Rhizopus arrhizus، ريزوبس أوريزا Rhizopus oryzae، أبسيديا كوريمبيفيرا Absidia corymbifera، أبسيديا راموزا Absidia

ramosa، أو موكوربوسيلوس Mucorpusillus. وتشمل مصادر لانزيمات CDK أخرى الممرض نيموسستس كارينييايي pneumocystis carinii.

فعلى سبيل المثال، يمكن تقييم الفعالية المضادة للفطريات للأملاح بالإضافة إلى حمض وفقاً للاختراع في أنبوب الاختبار بتحديد أدنى تركيز مثبط minimum inhibitory concentration (M.I.C.) وهو تركيز مركبات الاختبار، في وسط ملائم، الذي لا يحدث عنده نمو لكائنات حية دقيقة معينة. وعملياً، تلقح سلسلة من أطباق تحتوي على أغار agar plates، يحتوي كل منها على مركب الاختبار بتركيز محدد بمستنبت عياري standard culture من، على سبيل المثال، كانديدا ألبيكانزا (المبيضات البيض) candida albicans ثم يحضن كل طبق لفترة ملائمة عند ٣٧°م. ثم تفحص الأطباق لتحديد وجود نمو للفطر أو عدمه وتدوّن قيمة M.I.C الملائمة. وبشكل بديل، يمكن إجراء معايرة لتحديد الكدورة turbidity assay في مستنبتات سائلة ويمكن إيجاد بروتوكول يوضح مثالاً على هذه المعايرة في الأمثلة أدناه.

ويمكن تقييم الأملاح بالإضافة إلى حمض داخل الجسم الحي عن طريق سلسلة من مستويات جرعة تعطى بواسطة حقنة داخل الصفاق أو داخل الوريد intraperitoneal or intravenous injection أو تعطى عن طريق الفم oral administration، إلى فئران ملقحة بفطر، مثل، سلالة strain من الكانديدا ألبيكانز (المبيضات البيض) Candida albicans أو أسبرجيليس فلافوس Aspergillus flavus. ويمكن تقييم فعالية الأملاح بمراقبة حدوث الإصابة بالعدوى الفطرية في مجموعات الفئران المعالجة وغير المعالجة (عن طريق فحص الأنسجة أو استعادة الفطر من الفئران المصابة بعدوى به). ويمكن قياس الفعالية بدلالة مستوى الجرعة التي يزود عندها المركب حماية من التأثير المميت lethal effect للإصابة بالعدوى بنسبة ٥٠% (PD_{50}).

ولاستخدامها كعوامل مضادة للفطريات في البشر، يمكن إعطاء ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، لوحدها أو في صورة خليط مع مادة حاملة صيدلية تختار وفقاً لطريقة الإعطاء المرغوبة والاستخدام الصيدلي النموذجي. وهكذا، على سبيل المثال، يمكن إعطاء الأملاح عن طريق الفم، بطريقة غير معوية parenterally، داخل الوريد intravenously، داخل العضل

intramuscularly، أو تحت الجلد subcutaneously بواسطة التركيبات الموصوفة أعلاه في القسم المعنون بـ "تركيبات صيدلية".

وللإعطاء الفموي وغير المعوي لمرضى من البشر، قد يتراوح مستوى الجرعة اليومي من الأملاح من ٠.٠١ إلى ١٠ ملغم/كغم milligram/kilogram (mg/kg) (بجرعات مقسمة)، اعتماداً على من جملة أمور أخرى فعالية الأملاح عند إعطائها بطريقة فموية أو غير معوية. وقد تحتوي أقراص أو كبسولات من الأملاح، على سبيل المثال، على المركب الفعال بمقدار يتراوح من ٥ ملغم إلى ٠.٥غم gram (g) يعطى مرة واحدة أو مرتين أو أكثر كما هو ملائم. ويحدد الطبيب في أي حالة مقدار الجرعة الفعلي (المقدار الفعال) الأكثر ملائمة لمريض معين ويتفاوت باختلاف عمره age، وزنه weight واستجابته.

وعلى نحو بديل، يمكن إعطاء الأملاح في صورة تحميلة suppository أو فرزجة pessary، أو قد تستخدم موضعيا topically في صورة غسول lotion، محلول solution، كريم cream، مرهم ointment، أو مسحوق تعفير dusting powder. فعلى سبيل المثال، قد تكون مدمجة في كريم يتكون من مستحلب مائي aqueous emulsion من مركبات غليكول متعددة الإثيلين polyethylene glycols أو برافين سائل liquid paraffin؛ أو قد تكون مدمجة، بتركيز يتراوح ما بين ١ و ١٠% في مرهم يتكون من قاعدة شمع أبيض أو برافيين لين أبيض white wax or white soft paraffin مع مواد مثبتة stabilizers ومواد حافظة preservatives كما هو مطلوب.

وبالإضافة إلى الاستخدامات العلاجية الموصوفة أعلاه، يمكن استخدام العوامل المضادة للفطريات المطورة بواسطة معايرات غربلة تفاضلية من هذا القبيل، على سبيل المثال، كمواد حافظة في المواد الغذائية foodstuff، مكمل غذائي feed supplement لتعزيز الزيادة في الوزن في المواشي livestock، أو في تركيبات مطهرة disinfectant formulations لمعالجة مواد غير حية non-living matter، مثلاً، لتطهير المعدات والغرف في المستشفيات. وبطريقة مماثلة، تتيح مقارنة تثبيط CDK لثديي جنباً إلى جنب مع CDK لحشرة، مثل جينة CDK5 في ذباب الندى Drosophilia (انظر ما جاء عن هِلميتش Hellmich ومعاونيه في مجلة FEBS Lett، المجلد ٣٥٦، ص: ٣١٧-٣٢١ (١٩٩٤م))، اختيار المثبطات ضمن المركبات في هذا البيان التي تميز بين انزيمات البشر/الثدييات والحشرات. ووفقاً لذلك، يتضمن الاختراع الراهن على نحو

واضح استخدام وتشكيل الأملاح وفقاً الاختراع في المبيدات الحشرية insecticides، مثل استخدامها في السيطرة على الحشرات مثل ذبابة الفاكهة fruit fly.

وفي تجسيد آخر كذلك، يمكن اختيار بعض من الأملاح وفقاً للاختراع على أساس التثبيط المتخصص بانزيمات CDK نباتية بالنسبة للانزيم في ثديي. فعلى سبيل المثال، يمكن وضع CDK نباتي في غربال تفاضلي differential screen مع انزيم بشري واحد أو أكثر لاختيار تلك المركبات التي لها انتقائية كبيرة نحو تثبيط الانزيم النباتي. وبالتالي، يتضمن الاختراع الراهن على نحو خاص تركيبات من الأملاح وفقاً للاختراع للاستخدامات الزراعية، مثلا في صورة لاحت defoliant أو ما أشبه.

وللأغراض الزراعية والبستنة horticultural يمكن استخدام الأملاح وفقاً الاختراع في صورة تركيب مشكل بصورة ملائمة لاستخدامه المحدد والغرض المطلوب. وبالتالي يمكن استخدام الأملاح في صورة مساحيق تعفير، أو حبيبات، أسمدة للبذور seed dressings، محاليل مائية، مشتتات dispersions أو مستحلبات، محاليل غمس dips، رذاذات sprays، حلالات هوائية aerosols أو أدخنة smokes. ويمكن تزويد التراكيب كذلك في صورة مساحيق، حبيبات أو حبوب قابلة للتشتيت dispersible، أو ركازات concentrates تخفف قبل الاستخدام. وقد تحتوي هذه التراكيب على مواد حاملة، مواد مخففة diluents أو مواد مساعدة adjuvants تقليدية كما هو معروف ومقبول في الزراعة والبستنة ويمكن تصنيعها وفقاً للإجراءات التقليدية. وقد تحتوي التراكيب كذلك على مقومات فعالة أخرى، على سبيل المثال، مركبات ذات فعالية مبيدة للأعشاب أو الحشرات أو مبيدة للفطريات بشكل إضافي. ويمكن وضع الأملاح والتراكيب بعدة طرق، على سبيل المثال يمكن وضعها على أوراق النباتات plant foliage، السيقان stems، الغصون branches، البذور أو الجذور roots أو التربة أو وسط نمو growing medium آخر مباشرة، ولا تستخدم للقضاء على المرض فقط، بل لوقاية النباتات أو البذور كذلك من الهجوم. فعلى سبيل المثال، قد تحتوي التراكيب على المقوم الفعال بنسبة تتراوح من ٠.٠١ إلى ١% بالوزن. ولاستخدامها في الحقل، قد تتراوح معدلات استخدام المقوم الفعال من ٥٠ إلى ٥٠٠٠ غم/هكتار g/hectare.

ويتضمن الاختراع كذلك استخدام ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-

benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، للتحكم بالفطر الذي يسبب تعفن الخشب wood decaying fungi ولمعالجة التربة التي تنمو فيها النباتات، حقول شتلات الأرز الصغيرة، أو الماء المستخدم للتسريب perfusion. ويتضمن الاختراع كذلك استخدام ملح بالإضافة إلى حمض من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، آخر غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride، لحماية الحبوب المخزنة stored grain ومواقع غير نباتية أخرى من تفشي الفطريات فيها.

وتدل الاختصارات التالية على ما يلي:

DCM	ثنائي كلوروميثان dichloromethane
DMF	ثنائي مثيل فورماميد dimethylformamide
DMSO	ثنائي مثيل كبريتوكسيد dimethyl sulphoxide
EDC	١-إثيل-٣-(٣'-ثنائي مثيل أمينوبروبيل)-كربوثنائي إيميد 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
EtOAc	أسيتات الإثيل ethyl acetate
وفي أطياف الرنين النووي المغنطيسي ر ن م (NMR) Nuclear Magnetic Resonance تشير الرموز التالية إلى:	
ف	طيف مفرد
ز	طيف مزدوج
ع	طيف متعدد
ميغاهز	ميغاهيرتز MHz
دلتا	تدل على الفرق
M	الصيغة الجزيئية
R_t	زمن البقاء retention time
R_f	معامل البقاء retention factor
ك/ش	الكتلة/شحنة الجزيء (m/z)
LC	الاستشراب بسائل liquid chromatography

MS	قياس الطيفيات الكتلية mass spectroscopy
HPLC	الاستشراب بسائل عالي الأداء high performance liquid chromatography

الوصف التفصيلي

الأمثلة

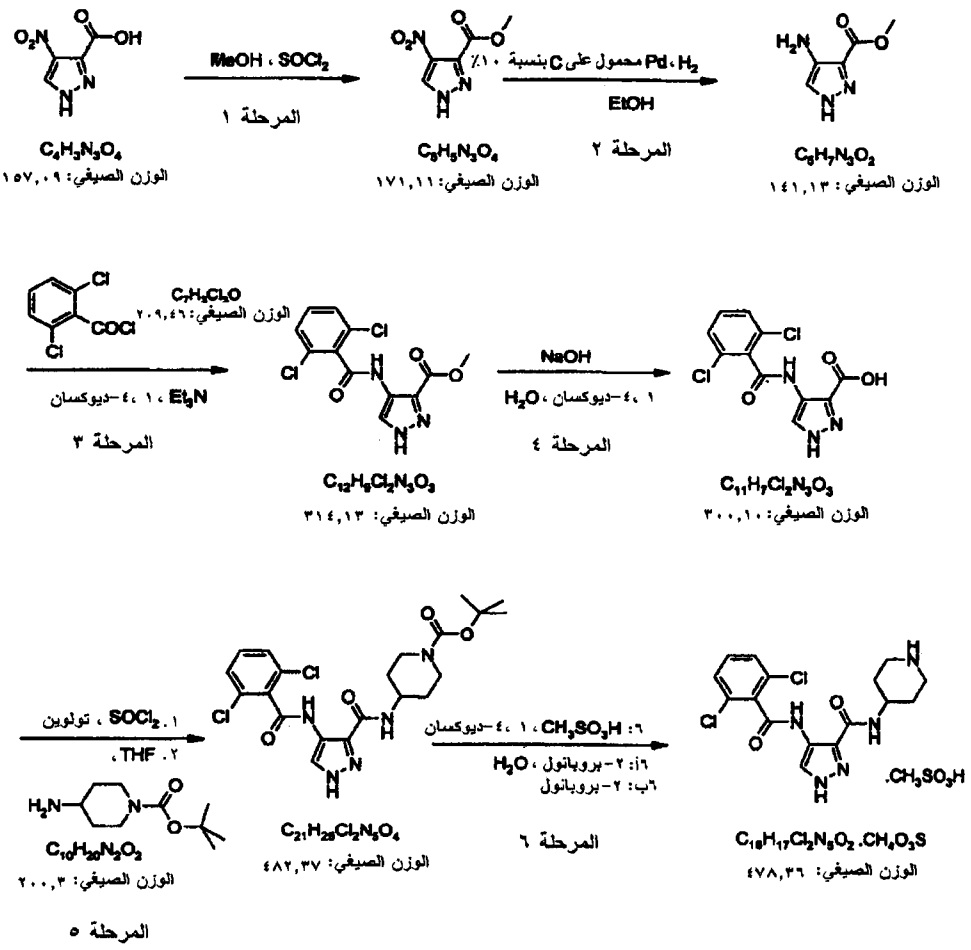
سيوضح الاختراع الآن، إنما بدون حصره بها، بالرجوع إلى التجسيدات الخاصة المذكورة في الأمثلة التالية.

المثال ١

تخليق ملح حمض ميثان الكبريتونيك لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك

methanesulphonic acid salt of 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide

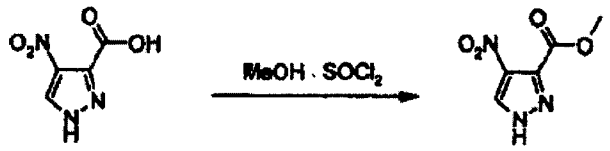
قد يحضر ملح حمض ميثان الكبريتونيك لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك methanesulphonic acid salt of 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide بواسطة الطريقة التخليقية المبينة في المخطط أدناه.



٥

المرحلة ١: تحضير مثيل إستر لحمض ٤-نترو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك

4-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester



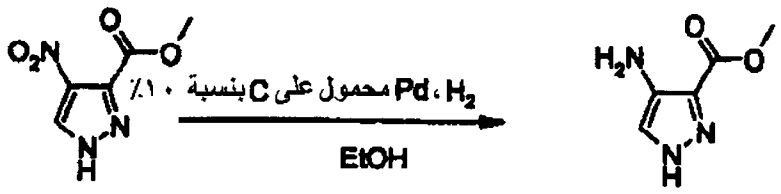
$C_4H_3N_3O_4$
الوزن الصيغي: ١٥٧,٠٩

$C_5H_5N_3O_4$
الوزن الصيغي: ١٧١,١١

شحن ١.١١٧ كغم (٧.١١ مول، ١ وزن) من حمض ٤-نترو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester و٨.٩٥ لتر (٨ حجم) من ميثانول methanol إلى وعاء تفاعل سعته ٢٠ لتر مزود بجهاز قياس حرارة رقمي digital thermometer وأداة تقليب stirrer. وقلب مزيج التفاعل في نتروجين nitrogen، برد عند درجات حرارة تراوحت من درجة الصفر المئوي إلى ٥°م، أضيف ٠.٥٨١ لتر (٨ مول، ٠.٥٢ حجم) من كلوريد ثيونيل thionyl chloride خلال ١٨٠ دقيقة وترك المزيج الناتج ليدفأ وقلب عند ١٨ إلى ٢٢°م طوال الليل، وبعد هذا الوقت أشار تحليل ^1H ر ن م ($(CD_3)_2SO$) إلى انتهاء التفاعل. وركز مزيج التفاعل في ضغط مخفض عند ٤٠ إلى ٤٥°م، عولج الركاز ثلاث مرات باستخدام ٢.٢٥ لتر من تولوين toluene وأعيد تركيزه ثلاث مرات باستخدام ٢ حجم منه في ضغط مخفض عند ٤٠ إلى ٤٥°م فنتج ١.٢١ كغم من مثيل إستر لحمض ٤-نترو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester على شكل مادة صلبة لونها أبيض ضارب إلى الصفرة (معدل الإنتاج= ٩٩.٥%).

المرحلة ٢: تحضير مثيل إستر لحمض ٤-أمينو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك

4-amino-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester



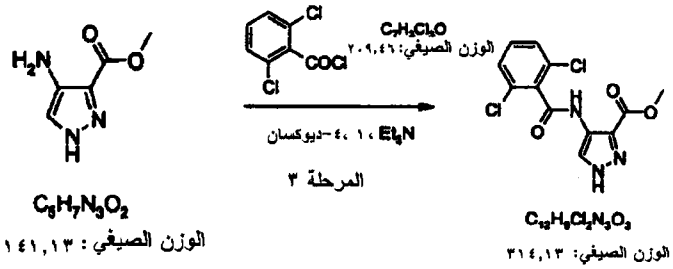
$C_5H_5N_3O_4$
الوزن الصيغي: ١٧١,١١

$C_5H_7N_3O_2$
الوزن الصيغي: ١٤١,١٣

شحن ٠.١٧ كغم (٠.١٤ وزن) من بلاديوم palladium محمول على كربون carbon بنسبة ١٠% (على شكل عجينة رطبة) إلى وعاء تفاعل سعته ٢٠ لتر مزود بجهاز قياس حرارة رقمي وأداة تقليب في نتروجين nitrogen. وفي وعاء منفصل، دفأت ردغة من ١.٢١ كغم (٧.٠٧ مول، ١ وزن) من مثيل إستر لحمض ٤-نترو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester في ١٢.١ لتر (١٠ حجم) من إيثانول ethanol إلى درجة حرارة تراوحت من ٣٠ إلى ٣٥°م لتحقيق الذوبان وأضيف المحلول إلى الحفاز في نتروجين nitrogen. وبعد إجراء سلسلة من دورات التنظيف بالنتروجين-الهيدروجين nitrogen-hydrogen purge، أضيف جو من الهيدروجين hydrogen وحوفظ على مزيج التفاعل عند درجة حرارة تراوحت من ٢٨ إلى ٣٠°م إلى حين لوحظ انتهاء التفاعل (خلال ٥ إلى ١٠ ساعات) بواسطة التحليل ^{1}H ر ن م ($(CD_3)_2SO$). وبعد انتهاء دورة تنظيف، رشح مزيج التفاعل في نتروجين nitrogen وركز الأجزاء السائلة في ضغط مخفض فنتج ٠.٩٨٧ كغم من مثيل إستر لحمض ٤-أمينو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-amino-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester (معدل الإنتاج= ٩٨.٩%).

المرحلة ٣: تحضير مثيل إستر لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك

4-(2,6-dichlorobenzoyl amino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester



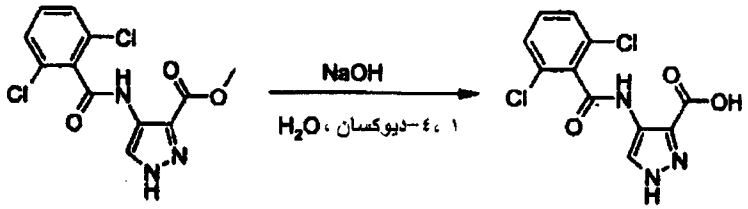
$C_5H_7N_3O_2$
الوزن الصيغي : ١٤١,١٣

$C_{12}H_9Cl_2N_3O_3$
الوزن الصيغي: ٣١٤,١٣

عولج محلول من ٠.٦٣٤ كغم (٤.٤٩ مول، ١ وزن) من مثيل إستر لحمض ٤-أمينو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-amino-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester في ٨.٩ لتر (٩ حجم) من ١، ٤-ديوكسان 1,4-dioxane في نتروجين nitrogen باستخدام ٠.٧٦١ لتر (٥.٤٦ مول، ١.٢ حجم) من ثلاثي إثيل أمين triethylamine من ثم ٠.٧١ لتر (٤.٩٦

مول، ٠.٧٢ حجم) من كلوريد ٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل 2,6-dichlorobenzoyl chloride بحيث حوفظ على درجة الحرارة الداخلية عند ٢٠ إلى ٢٥°م. وغسل كلوريد ٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل 2,6-dichlorobenzoyl chloride المتبقي بغسول من ٠.٩٩ لتر (١ حجم) من ١، ٤-ديوكسان 1,4-dioxane وقلب مزيج التفاعل عند ١٨ إلى ٢٥°م إلى حين انتهاء التفاعل (خلال ١٦ ساعة) الذي كشف عنه بواسطة تحليل الاستشراب على طبقة رقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) (بالتصويل باستخدام مزيج من أسيتات إثيل ethyl acetate: هبتانات heptanes بنسبة ١:٣؛ R_f أمين ٠.٢٥، R_f منتج ٠.٦٥) ورشح مزيج التفاعل، غسل الراشح-اللزنة مرتين باستخدام ٠.٩٩ لتر من ١، ٤-ديوكسان 1,4-dioxane ومرتين باستخدام ١ حجم منه وتقدمت نواتج الترشيح بعد دمجها (حمراء اللون) إلى المرحلة ٤ بدون فصل إضافي.

المرحلة ٤: تحضير حمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoyl amino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid



$C_{12}H_8Cl_2N_2O_3$
الوزن الصيغي: ٣١٤,١٣

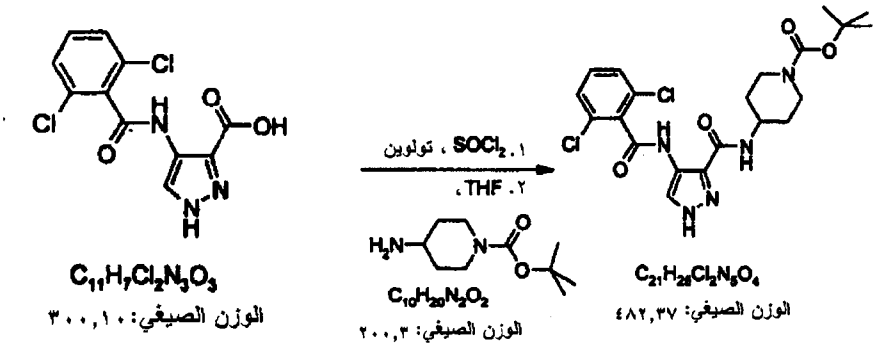
$C_{11}H_7Cl_2N_3O_3$
الوزن الصيغي: ٣٠٠,١٠

شحن محلول من الإستر ester الناتج من المرحلة ٣ في جزء واحد: (١.٠٩٩ كغم، ٣.٥ مول في ٦ لتر) إلى محلول من ٠.٤٨٤ كغم (١٢.١ مول) من هيدروكسيد الصوديوم sodium hydroxide في ٦.٠٥ لتر من الماء. وقلب مزيج التفاعل إلى حين انتهائه عند ٢٠ إلى ٢٥°م كما حدد بواسطة تحليل TLC (بالتصويل باستخدام مزيج من أسيتات إثيل ethyl acetate:هبتانات heptanes بنسبة ١:٣؛ R_f إستر، خط القاعدة لـ R_f منتج المرحلة ٤). وركز مزيج التفاعل في ضغط مخفض عند ٤٥ إلى ٥٠°م، وخفف الركاز الزيتي باستخدام ٩.٩ لتر من الماء وحمض إلى درجة حموضة بلغت ١ باستخدام حمض هيدروكلوريك hydrochloric acid مركز بحيث حوفظ على درجة الحرارة عندما يقل عن ٣٠°م. جمع الراسب الناتج بواسطة الترشيح، غسل باستخدام ٥ لتر من الماء، نقل في صورة جافة على الراشح وغسل بشكل متعاقب باستخدام ٥ لتر من

هبتانات heptanes. وشحن الراشح-اللزنة إلى دورق تبخير دوار سعته ٢٠ لتر وأكمل التجفيف في صورة مزيج ثابت درجة الغليان مرتين مع ٤.٥ لتر من تولوين toluene فنتج ١.٠٤٤ كغم من حمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoyl amino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid في صورة مادة صلبة صفراء اللون (معدل الإنتاج= حوالي ٩٩.٩%).

المرحلة ٥: تحضير ثث-بيوتيل إستر لحمض ٤-{[٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربونيل] أمينو} بيبريدين-١-كربوكسيليك

4-{[4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carbonyl]amino}piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester



شحن منتج المرحلة ٤ (١ وزن) وتولوين toluene (١٠ حجم) إلى دورق ذي شفة محددة القياس بشكل ملاءم مزود بأداة تقليب ميكانيكية، قمع تقطير وجهاز قياس حرارة. وقلبت المحتويات في نتروجين nitrogen عند ١٦ إلى ٢٥°م وأضيف كلوريد ثيونيل thionyl chloride (٠.٣ حجم) بشكل بطيء. ومن ثم سخنت المحتويات إلى درجة حرارة تراوحت من ٨٠ إلى ١٠٠°م وقلبت عند درجة الحرارة هذه إلى حين حكم على انتهاء التفاعل وفقاً لتحليل ^1H ر ن م. وكان من الممكن إضافة مقدار إضافي من التولوين toluene (يصل إلى ١٠ حجم) في هذه المرحلة إذا أصبحت المحتويات كثيفة جداً بحيث لا يمكن تقليبها. وعند انتهاء التفاعل، برد المزيج إلى درجة حرارة تراوحت من ٤٠ إلى ٥٠°م ومن ثم ركز في خواء عند ٤٥ إلى ٥٠°م حتى الجفاف. ومن ثم جفف الركاز في صورة مزيج ثابت درجة الغليان ثلاث مرات مع تولوين toluene (٢ حجم).

ونقلت المادة الصلبة التي تم فصلها إلى دورق محدد القياس بشكل ملاءم وشحن رباعي هيدروفوران tetrahydrofuran (٥ حجم). وقلبت المحتويات في نتروجين nitrogen عند ١٦ إلى ٢٥°م. وأضيف ثلاثي إثيل أمين triethylamine (٠.٥١٢ حجم). وشحن ثث-بيوتيل إستر لحمض ٤-أمينو-بيبريدين-١-كربوكسيليك 4-amino-piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester ٠.٧٠٤ ورباعي هيدروفوران tetrahydrofuran (٥ حجم). وقلبت المحتويات إلى حين أجري ذوبان كامل ومن ثم شحن المحلول إلى دورق التفاعل، مع المحافظة على درجة الحرارة من ١٦ إلى ٣٠°م. ومن ثم سخن مزيج التفاعل إلى درجة حرارة تراوحت من ٤٥ إلى ٥٠°م وقلبت المحتويات إلى حين حكم على إكتمال التفاعل بواسطة تحليل ^{1}H ر ن م. ومن ثم بردت المحتويات إلى درجة حرارة تراوحت من ١٦ إلى ٢٥°م وشحن ماء (٥ حجم). وأضيفت هبتانات heptanes مخلطة (٥ حجم)، وقلبت المحتويات لمدة بلغت ١٠ دقائق وفصلت الطبقات. ومن ثم استخلص الطور المائي ثلاث مرات باستخدام مزيج من رباعي هيدروفوران tetrahydrofuran:هبتانات heptanes مخلطة بنسبة ١:٩ [٥ حجم]. ومزجت الأطوار العضوية، غسلت باستخدام الماء (٢.٥ حجم) ومن ثم ركزت في خواء عند درجة حرارة تراوحت من ٤٠ إلى ٤٥°م. وسخن الركاز في صورة مزيج ثابت درجة الغليان ثلاث مرات مع تولوين toluene (٥ حجم) وركز حتى الجفاف لإنتاج منتج المرحلة ٥ الخام.

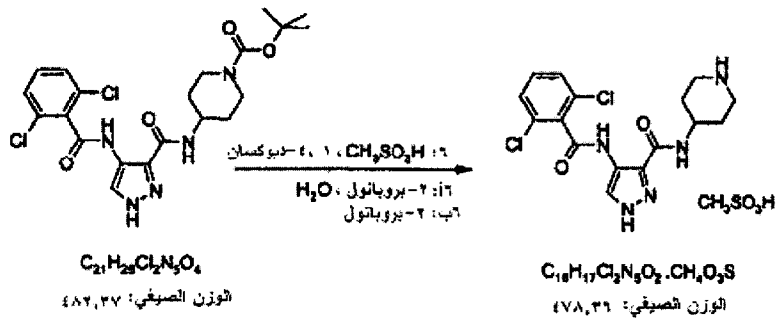
ومن ثم نقلت المادة الصلبة إلى دورق محدد القياس بشكل ملاءم، وأضيف مزيج من ميثانول methanol: تولوين toluene بنسبة ٢.٥:٩٧.٥ [٥ حجم] وقلبت الردغة في نتروجين nitrogen لمدة تراوحت من ٣ إلى ١٨ ساعة. ورشحت المحتويات، غسل الراشح-اللزنة مرتين باستخدام تولوين toluene (٧ حجم) ومن ثم جففت المادة الصلبة في خواء عند درجة حرارة تراوحت من ٤٠ إلى ٥٠°م لإنتاج ثث-بيوتيل إستر لحمض ٤-{[٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربونيل] أمينو} بيبريدين-١-كربوكسيليك 4-{[4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carbonyl]amino}piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester في صورة مادة صلبة لونها أبيض ضارب إلى الصفرة.

وتمت معالجة دفعتان من منتج المرحلة ٤ (٠.٨٣١ كغم في كل دفعة) في هذه الكيفية فنتج ما مجموعه ٢.٣٦٦ كغم من ثث-بيوتيل إستر لحمض ٤-{[٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربونيل] أمينو} بيبريدين-١-كربوكسيليك 4-{[4-(2,6-

dichlorobenzoylamino)1-H-pyrazole-3-carbonyl]amino}piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (معدل الإنتاج= ٨٨.٦%).

المرحلة ٦: تحضير ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك

4-(2,6-dichlorobenzolyamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate



شحن منتج المرحلة ٥ (١ وزن) و١، ٤-ديوكسان 1,4-dioxane (٣٠ حجم) إلى دورق ذي شفة محددة القياس بشكل ملاءم مزود بأداة تقليب ميكانيكية، قمع تقطير وجهاز قياس حرارة. وقلبت المحتويات في نتروجين nitrogen وسخن إلى درجة حرارة تراوحت من ٨٠ إلى ٩٠°م. وأضيف حمض ميثان كبريتونيك methansulphonate acid (٠.٥٤ حجم) بشكل بطيء خلال مدة تراوحت من ٣٠ إلى ٦٠ دقيقة ومن ثم سخنت المحتويات إلى درجة حرارة تراوحت من ٩٥ إلى ١٠٥°م وقلبت في مدى درجات الحرارة هذا إلى حين حكم علىانتهاء التفاعل وفقاً لتحليل ^{1}H ر ن م. وعند انتهاء التفاعل، برد المزيج إلى درجة حرارة تراوحت من ٢٠ إلى ٣٠°م وجمع الراسب الناتج عن طريق الترشيح. وغسل الراشح-اللزنة مرتين باستخدام ٢-بروبانول 2-propanol (٢ حجم) ونقل في صورة جافة على الراشح لمدة ٣ إلى ٢٤ ساعة فنتج ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzolyamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate في صورة مادة صلبة لونها أبيض ضارب إلى الصفرة متدفقة بشكل حر (تركيزها من ٨٠ إلى ١٢٠ % وزن/وزن، غير مصححة بالنسبة لوجود الشوائب أو المواد المذابة).

وعولجت عدة دفعات من منتج المرحلة ٥ بهذه الكيفية وتدرج تفاصيل كميات المادة الأولية والمنتج لكل دفعة في الجدول ١ أدناه.

٥ الجدول ١-معدلات الإنتاج التي حصل عليها من خطوة نزع الوقاية-المرحلة ٦

الدفعة	الكمية الداخلة (غم) من ثث-بيوتيل إستر لحمض ٤-{[٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربونيل] أمينو}-بيبريدين-١-كربوكسيليك ٤-{[٤-(٢,٦-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carbonyl]amino}piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester	الكمية الخارجة (غم) من ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك ٤-(٢,٦-dichlorobenzolyamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate	درجة النقاوة الكيميائية (% المساحة المقاسة بواسطة HPLC)
١	٥٩٠	٥٧٩.٦ ٩٩.١% نظري، ٩٨.٢% وزن/وزن	٩٧.٨٨
٢	٥٢١	٥٣٢.٧ ١٠٣.١% نظري، ١٠٢.٢% وزن/وزن	٩٨.٠٩
٣	٥٢٣.٨	٥١١.٧ ٩٨.٥% نظري، ٩٧.٧% وزن/وزن	٩٨.١٧
٤	٥١٨.٤	٥٩٦.٣ ١١٦% نظري، ١١٥% وزن/وزن	٩٨.٢٤
٥	٥٦٣.٢	٦٠٠.١ ١٠٧.٤% نظري، ١٠٦.٦% وزن/وزن	٩٨.١٦
٦	٥٦٣.١	٥٦٥.٢ ١٠١.٢% نظري، ١٠٠.٤% وزن/وزن	٩٨.٤٩
٧	٥٦٠.٤	٥٥٣.٩ ٩٩.٧% نظري، ٩٨.٨%	٩٨.٧

	وزن/وزن		
٩٨.٤١	٥٦٠.٥ ٩٩.٢% نظري، ٩٨.٤% وزن/وزن	٥٦٩.٧	٨

المرحلة ٦أ: إعادة بلورة ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك

4-(2,6-dichlorobenzolyamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate

أعيد بلورة منتج المرحلة ٦ لضمان أنه لم تزيد أية مستويات متبقية من المنتج الذي تمت وقايته بواسطة Boc الناتج من المرحلة ٥ عن ٠.٢٥%. وأعيدت بلورة ٤ دفعات من منتج المرحلة ٦.

وشحن منتج المرحلة ٦ الخام و٢-بروبانول 2-propanol إلى دورق ذي شفة محددة القياس بشكل ملاءم مزود بأداة تقليب ميكانيكية، قمع تقطير وجهاز قياس حرارة. وقلبت المحتويات في نتروجين nitrogen وسخنت عند ٧٥ إلى ٨٥°م. ومن ثم شحن ماء (بلغ ٢.٥ حجم) شحن إلى المحتويات إلى أن حصل على محلول رائق. ومن ثم بردت المحتويات إلى درجة حرارة تراوحت من ٤٠ إلى ٦٠°م وركزت في خواء عند ٤٠ إلى ٥٠°م إلى أن تم تقليل حجم مزيج التفاعل بنسبة ٥٠% تقريباً. وشحن ٢-بروبانول 2-propanol (٣ حجم) إلى الدورق وركز المحتويات عند ٤٠ إلى ٥٠°م إلى أن أزيل ٣ حجم تقريباً من المذيب. ومن ثم أعيدت هذه العملية مرتين بشكل إضافي باستخدام ٢-بروبانول 2-propanol (٣ حجم) وفحص المحتوى المائي. ومن ثم بردت الردغة الناتجة إلى درجة حرارة تراوحت من درجة الصفر المئوي إلى ٥°م وقلبت عند درجة الحرارة هذه لمدة تراوحت من ١ إلى ٢ ساعة. ورشحت المحتويات، وغسل الراشح-اللزنة مرتين باستخدام ٢-بروبانول 2-propanol (١ حجم) ومن ثم نقل في صورة جافة على الراشح لمدة بلغت ٢٤ ساعة. ونقلت المادة الصلبة إلى صواني تجفيف وجففت في خواء عند درجة حرارة تراوحت من ٤٥ إلى ٥٠°م حتى بلغت وزناً ثابتاً فنتج ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzolyamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate على شكل مادة صلبة لونها أبيض ضارب إلى الصفرة (بتركيز ٦٠ إلى ١٠٠% وزن/وزن).

وتراوحت معدلات إنتاج عملية إعادة التبلور للأربع دفعات من ٨٥.٦% إلى ٩٠.٤% وتراوحت درجات النقاوة للمنتج معاد التبلور من ٩٩.٢٩% إلى ٩٩.٣٩%. وأدى إجراء عملية إعادة تبلور ثانية إلى زيادة النقاوة بشكل إضافي كذلك.

وكان للمركب ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzolyamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate الناتج بهذه الطريقة درجة انصهار (كما قيست بواسطة مقياس الحرارة بالمسح التفاضلي Differential Scan Calorimetry (DSC)) بلغت ٣٧٩.٨°م.

واشتمل طيف الأشعة تحت الحمراء infra-red spectrum لملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt (وفقاً لطريقة قرص KBr) على ذروات peaks مميزة عند أطوال الموجات ٣٢٣٣، ٣٠٠٢، ٢٨٢٩، ١٦٧٩، ١٦٣٢، ١٥٦٠، ١٤٣٠، ١١٩٨، ١٠٣٧، ٩٠٩ و ٧٨٤ سم$^{-١}$.

ومن غير التقيد بأي نظرية، يعتقد بأنه يمكن أن تنسب ذروات الأشعة تحت الحمراء إلى المكونات البنيوية structural components للملح كالتالي:

الذروة:	السبب:
٣٢٣٣ سم$^{-١}$	N-H
٣٠٠٢ سم$^{-١}$	C-H عطري
٢٨٢٩ سم$^{-١}$	C-H أليفاتي
١٦٧٩ سم$^{-١}$	أميد C=O
١٦٣٢ سم$^{-١}$، ١٥٦٠ سم$^{-١}$	أميد
١٤٣٠ سم$^{-١}$	C-H أليفاتي
١١٩٨ سم$^{-١}$	SO_2-O
١٠٣٧ سم$^{-}$	C-Cl عطري
٩٠٩، ٧٤٨ سم$^{-١}$	C-H عطري

إزالة منتج المرحلة ٥ الموقّى بـ Boc المتبقي

في بعض الحالات، عند إذابة ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt في محلول أسيتات منظم لدرجة الحموضة acetate buffer، لوحظ وجود راسب دقيق الحجم يتالف من مقدار ضئيل متبقي من القاعدة الحرة الموقاة بـ Boc. ويمكن استخدام تقنيات مختلفة لإزالة أو منع تشكّل الراسب، كما هو موصوف أدناه.

(أ) الترشيح

تم سحب مزيج من ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt في محلول أسيتات منظم لدرجة الحموضة acetate buffer تركيزه ٢٠٠ ملي جزيئي من قنينة vial إلى محقنة تستخدم لمرة واحدة single-use syringe سعتها ٢٠ مل باستخدام إبرة معقمة sterile needle، ثم تم وصل مرشّح مقاس مسامه ٠.٢ ميكرومتر 0.2 µm filter من الصنف الطبي (وحدة ترشيح معقمة تستخدم لمرة واحدة sterile single use filter unit من نوع سارتوريوس منيسارت Sartorius Minisart). وضُغط كباس plunger المحقنة ببطء وجمع الراشح في قنينة زجاجية شفافة نظيفة. وكان محتوى القنينة عبارة عن محلول صاف عديم اللون لملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt خالٍ من المواد الجسيمية particulate matter.

(ب) التسخين في حمض مائي aqueous acid

تم تسخين مزيج من ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt و ٠.٤ مكافئ من حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid في ماء (حجمه ١٠ أضعاف) عند ١٠٠°م لمدة ٤ ساعات، ثم برّد إلى ٦٠°م. ودلّ التحليل بواسطة TLC على وجود ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt في صورة مكون واحد. وأضيف ٢-بروبانول 2-propanol (حجمه ١٠ أضعاف) وبرّد المزيج إلى ٤٠°م. وركّز المزيج في الخواء إلى أن قل حجمه بمقدار ١٠ أضعاف تقريباً، ثم أضيف إليه مقدار آخر من ٢-بروبانول 2-propanol (حجمه ١٠ أضعاف) وركّز المزيج مرة أخرى إلى أن قل حجمه بمقدار ١٠ أضعاف. وأعيدت هذه الدورة مرة أخرى ثلاث مرات. وبرّد المزيج في حمام جليدي ice-bath وجُمعت المادة الصلبة المتشكلة بالترشيح، غسلت بـ ٢-بروبانول 2-propanol (حجمه ٥ أضعاف) وجففت في خواء فنتج ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt في صورة مادة صلبة يميل لونها من الأبيض إلى الأبيض الضارب إلى الصفرة.

(ج) عمليات استخلاص عضوية-مائية

تم تسخين مزيج من ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt و ٠.٤ مكافئ من حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid في ماء (حجمه ١٠ أضعاف) عند ١٠٠°م لمدة ٣ ساعات، ثم برّد إلى درجة حرارة الجو المحيط. وإلى هذا المزيج، أضيف مزيج من THF-هبتان heptane بنسبة ١:٩ (حجمه ١٠ أضعاف) وقلّب المزيج الناتج بشدة لتشكيل محلول. وفُصلت الطبقات وغُسل الطور المائي مرتين بمزيج من THF-هبتان heptane بنسبة ١:٩ (حجمه ١٠ أضعاف) ثم مرتين بأسيتات الإثيل ethyl acetate (حجمه ١٠ أضعاف). وأضيف ٢-بروبانول 2-propanol (حجمه ١٠ أضعاف) إلى الطور المائي وركّز المحلول في خواء إلى أن قل حجمه حوالي ٥ أضعاف، ثم أضيف إليه مقدار آخر من ٢-بروبانول 2-propanol (حجمه ١٠ أضعاف) وركّز المزيج مرة أخرى إلى أن قل حجمه بمقدار ٥ أضعاف. وأعيدت هذه الدورة مرة أخرى ثلاث مرات. وجُمعت المادة الصلبة المتشكلة بالترشيح، غُسلت بـ ٢-بروبانول 2-propanol (حجمه ٥ أضعاف) وجففت في خواء فنتج ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate في صورة مادة صلبة يميل لونها من الأبيض إلى الأبيض الضارب إلى الصفرة.

الاستشراب chromatography

قد يوفر استخدام تقنيات الاستشراب طريقة لإزالة الشوائب غير القطبية non-polar impurities من ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt. ويعتقد بأن استخدام طرق عكسية الطور reverse-phase methods سيكون مفيداً بصورة خاصة.

المثال ٢

تحديد البنية البلورية crystal structure لـ ميثان كبريتونات بيبردينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxvlic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate بواسطة حيود الأشعة السينية X-ray diffraction

تم تحضير المركب ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-

pyrazole-3-carboxvlic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate كما وُصف في المثال ١. وكانت البلورة المستخدمة لتجربة الحيود في شكل لوح عديم اللون colourless plate تبلغ أبعاده ٠.٠٥×٠.٠٨×٠.١٤ ملم^{٣} تم الحصول عليه بالترسيب precipitation من محلول مائي بواسطة ٢-بروبانول 2-propanol. وجمعت البيانات البلورية crystallographic data عند ٣٦٦.١٥°م (٩٣ كلفن K) باستخدام إشعاع CuKα (λ=١.٥٤١٨ وحدة وحدة أنغستروم A°) الصادر من مصعد دوار RU3HR من نوع ريجاكو Rigaku rotating anode RU3HR، عدسات أزميومية زرقاء متحدة البؤرة Osmic blue confocal optics ومكشاف CCD من نوع ريجاكو جوبيتر Rigaku Jupiter CCD detector. وجُمعت الصور images بإجراء مسحي ω scans عند θ٢= ١٥ و ٩٠ درجة باستخدام مكشاف لقياس مسافة بلورية crystal distance حتى ٦٧ ملم. وتم التحكم بجمع البيانات بواسطة برمجيات كرستل كلير CrystalClear softwar وعولجت الصور وقيست وفقاً لدترك Dtrek. وبسبب ارتفاع معامل الامتصاص absorption coefficient (μ) الذي يبلغ ٤.٠١ ملم$^{-١}$ تم تصحيح البيانات باستخدام معادلة فورييه لتصحيح الامتصاص من الرتبة الرابعة 4th order Fourier absorption correction. وقد وُجد أن البلورات تنتمي إلى مجموعة فراغية معينية crystal lattice مع وسائط للشبكة البلورية orthorhombic space group Pbca (# 61) (٦١ #) Pbca parameters عند ٣٦٦.١٥°م (٩٣ كلفن) a =٨.٩٠ (١٠)، b= ١٢.٤٤ (١٠)، c= ٣٨.٤٩ (٤) وحدة أنغستروم، α= β= γ= ٩٠ درجة. والأعداد الموجودة بين الأقواس تمثل الانحراف deviation (الربية المعيارية standard uncertainty (s.u)).

وتمثل البلورات الموصوفة أعلاه والبنية البلورية وجهاً آخراً للاختراع.

وتم حل البنية البلورية باستخدام طرق مباشرة تنفذ بواسطة برمجيات SHELXS-97. واستخدمت بيات الشدة intensity data لمجموع كلي مقداره ٢٧١٠ انعكاس مفرد unique reflections في مدى درجة وضوح resolution range يتراوح من ٢٠ إلى ٠.٩ وحدة أنغستروم (٢.٣<θ<٥٨.٨٧) في عملية تحسين الـ ٢٧١ وسيط بلوري بواسطة برمجيات SHELXL-97. وكانت الوسائط الإحصائية statistical parameters النهائية كالتالي: wR2 =٠.٢١١٥ (كلها بيانات)، R1= ٠.٠٨٦٩ (بيانات مع σ٢<I (I)) وجودة توافقgoodness of fit (S)= ١.٢٦٤.

وقد وُجد جزيء واحد من القاعدة الحرة البروتونية protonated free base وأنيون مسيلات mesylate anion واحد في الوحدة اللاتماثلية asymmetric unit. وكان التركيب العنصري

elemental composition للوحدة اللاتماثلية عبارة عن $C_{17}H_{21}Cl_2N_5O_5S$ وبلغت الكثافة density المحسوبة للبلورات ١.٤٩ ميغاغرام/م^3. وتم تكوين ذرات الهيدروجين hydrogen على أساس هندسي geometrical grounds بينما تم تأكيد موقع ذرات الهيدروجين hydrogen المتصلة بذرة مغايرة heteroatom بمعاينة خرائط فروق Fo-Fc difference maps Fo-Fc. وكانت الوسائط الموقعية والحرارية لذرات الهيدروجين hydrogen محدودة على التراكب على الذرات غير الهيدروجينية المقابلة. وتشكلت الحركة الحرارية thermal motion للذرات غير الهيدروجينية وفقاً للعوامل الحرارية اللامتناحية anisotropical thermal factors (انظر الشكل ١).

وتحتوي البنية البلورية على رابطة هيدروجينية hydrogen bond واحدة داخل الجزيئات intramolecular (N15H...O7 ٢.٦٩٠ وحدة أنغستروم) وخمس روابط هيدروجينية بين الجزيئات intramolecular (انظر الشكل ٢ الذي يمثل شكل الترابط packing figure). وترتبط ثلاثة منها ذرة النتروجين البروتونية للبيبريدين protonated piperidine nitrogen بأنيوني مسيلات mesylate anions. حيث يرتبط أنيون المسيلات mesylate anion الأول بواسطة رابطة هيدروجينية أحادية single H-bond N12H12A...O2M، ٢.٧٧١ وحدة أنغستروم، بينما ترتبط الثانية بواسطة رابطة هيدروجينية ثنائية bifurcated H-bond مع التأثيرين المتبادلين interactions N12H12B...O1M، N12H12B...O2M و ٣.٠٥٧، ٢.٨٦٤ وحدة أنغستروم وحدة أنغستروم. وترتبط ذرة الأكسجين المتبقية في المسيلات mesylate oxygen (O3M) بواسطة رابطة هيدروجينية N8H8...O3M، ٢.٩٢٨ وحدة أنغستروم. وترتبط جزيئات القواعد الحرة البروتونية المجاورة معاً بواسطة رابطة هيدروجينية N15H15...O7، ٢.٨٧٦ وحدة أنغستروم، بالإضافة إلى الملامسة contant طويلة الأمد نسبياً N15H15...N2 ٣.٥٦٢، وحدة أنغستروم وارتصاص stacking حلقات الفنيل phenyl والبيرازول pyrazole. وتمتد التأثيرات المتبادلة على طول المحور b إلى المالانهاية. ويحتوي الترابط البلوري crystal packing على طبقات ثنائية البعد 2D layers (في المستوى ab) من أنيونات المسيلات mesylate anions مفصولة بطبقة بينية من شبكة ممتدة extensive network من الروابط الهيدروجينية المشحونة charged H-bonds مع طبقتين من كاتيونات القاعدة الحرة البروتينية protonated free base cations. والطبقات ثنائية البعد المدمجة المفصولة بطبقة بينية تتصل معاً على طول المحور c من خلال ارتصاص حلقات الفنيل phenyl والتأثير المتبادل للكلور chlorine...الفنيل phenyl مع C12...C18 ٣.٣٤١ وحدة أنغستروم.

ويزود الشكل ٢ تمثيلاً هندسياً graphical representation للبنية المتشكلة بدراسة حيود الأشعة السينية X-rag diffraction.

ويبيّن الجدول ٢ إحداثيات الذرات التي تشكّل بنية ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو) -١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate.

الجدول ٢

المجموعة الفراغية: Pbca

خلية وحدية unit cell عند ٣٦٦.١٥°م (٩٣ كلفن) بحيث يكون لـ a، b و c قيم S.U تبلغ ٥٪:

a= ٨.٩

b= ١٢.٤

c= ٣٨.٥

ألفا alpha= بيتا beta= جاما gamma= ٩٠

الإحداثيات ممثلة في نسق cif:

```
loop_
_atom_site_label
_atom_site_type_symbol
_atom_site_fract-x
_atom_site_fract_y
_atom_site_fract_z
_atom_site_U_iso_or_equiv
_atom_site_adp_type
_atom_site_occupancy
_atom_site_symmetry_multiplicity
_atom_site_calc_flag
_atom_site_refinement_flags
_atom_site_disorder_assembly
_atom_site_disorder_group
SlM S 0.13517(17) 0.18539(13) 0.03193(5) 0.0286(5) Uani 1 1 d . . .
01M 0 0.1193(5) 0.2208(3) -0.00409(14) 0.0326(13) Uani 1 1 d . . .
02M 0 0.1551(5) 0.0681(3) 0.03330(13) 0.0331(13) Uani 1 1 d . . .
03M 0 0.0151(5) 0.2217(4) 0.05453(14) 0.0368(13) Uani 1 1 d . . .
C4M C 0.3036(8) 0.2420(6) 0.0475(2) 0.0355(19) Uani 1 1 d . . .
H4M1 H 0.3855 0.2197 0.0329 0.053 Uiso 1 1 calc R . .
H4M2 H 0.3212 0.2181 0.0708 0.053 Uiso 1 1 calc R . .
H4M3 H 0.2959 0.3189 0.0471 0.053 Uiso 1 1 calc R . .
Cll Cl 0.26158(17) 0.18137(12) 0.34133(5) 0.0325(5) Uani 1 1 d . . .
C12 Cl 0.75698(19) 0.16766(13) 0.26161(5) 0.0366(6) Uani 1 1 d . . .
N1 N 0.6277(6) -0.2419(4) 0.34903(16) 0.0276(14) Uani 1 1 d . . .
H1 H 0.5932 -0.3064 0.3484 0.033 Uiso 1 1 calc R . .
N2 N 0.7505(5) -0.2150(4) 0.36663(16) 0.0286(15) Uani 1 1 d
C3 C 0.7635(7) -0.1082(5) 0.36163(19) 0.0265(17) Uani 1 1 d
C4 C 0.6453(7) -0.0708(5) 0.34039(18) 0.0211(16) Uani 1 1 d
C5 C 0.5616(7) -0.1594(5) 0.3322(2) 0.0277(18) Uani 1 1 d . . .
```

H5 H 0.4770 -0.1623 0.3181 0.033 Uiso 1 1 calc R . .
C6 C 0.8878(7) -0.0454(5) 0.3760(2) 0.0269(17) Uani 1 1 d . . .
07 0 0.9037(5) 0.0506(3) 0.36722(14) 0.0368(13) Uani 1 1 d . . .
N8 N 0.9821(6) -0.0939(4) 0.39821(15) 0.0267(14) Uani 1 1 d . . .
H8 H 0.9626 -0.1584 0.4048 0.032 Uiso 1 1 calc R . .
C9 C 1.1147(7) -0.0417(5) 0.41139(19) 0.0253(17) Uani 1 1 d . . .
H9 H 1.1272 0.0261 0.3987 0.030 Uiso 1 1 calc R . .
C10 C 1.1019(8) -0.0148(5) 0.4502(2) 0.0330(18) Uani 1 1 d . . .
H10A H 1.0156 0.0315 0.4540 0.040 Uiso 1 1 calc R . .
H10B H 1.0866 -0.0804 0.4633 0.040 Uiso 1 1 calc R . .
C11 C 1.2429(7) 0.0412(5) 0.4630(2) 0.0349(19) Uani 1 1 d . . .
H11A H 1.2533 0.1102 0.4515 0.042 Uiso 1 1 calc R . . .
H11B H 1.2355 0.0538 0.4878 0.042 Uiso 1 1 calc R . .
N12 N 1.3784(6) -0.0279(4) 0.45532(16) 0.0258(14) Uani 1 1 d . . .
H12A H 1.4618 0.0069 0.4623 0.031 Uiso 1 1 calc R . .
H12B H 1.3716 -0.0892 0.4676 0.031 uiso 1 1 calc R . .
C13 C 1.3929(7) -0.0546(6) 0.4181(2) 0.0314(18) Uani 1 1 d . . .
H13A H 1.4790 -0.1013 0.4147 0.038 Uiso 1 1 calc R . .
H13B H 1.4098 0.0107 0.4049 0.038 Uiso 1 1 calc R . .
C14 C 1.2538(7) -0.1097(6) 0.4049(2) 0.0356(19) Uani 1 1 d . . .
H14A H 1.2425 -0.1785 0.4165 0.043 Uiso 1 1 calc R . .
H14B H 1.2639 -0.1231 0.3802 0.043 Uiso 1 1 calc R . .
N15 N 0.6215(5) 0.0371(4) 0.33108(16) 0.0256(14) Uani 1 1 d . . .
H15 H 0.6768 0.0852 0.3408 0.031 Uiso 1 1 calc R . .
C16 C 0.5183(7) 0.0697(5) 0.30805(18) 0.0213(15) Uani 1 1 d . . .
O17 O 0.4336(5) 0.0082(3) 0.29260(13) 0.0309(12) Uani 1 1 d . . .
C18 C 0.5120(6) 0.1890(5) 0.30170(17) 0.0195(15) Uani 1 1 d . . .
C19 C 0.3923(7) 0.2486(5) 0.31620(19) 0.0252(16) Uani 1 1 d . . .
C20 C 0.3785(7) 0.3569(5) 0.30904(19) 0.0267(17) Uani 1 1 d . . .
H2O H 0.2991 0.3957 0.3185 0.032 uiso 1 1 calc R . .
C21 C 0.4814(7) 0.4078(5) 0.28805(19) 0.0270(17) Uani 1 1 d . . .
H21 H 0.4708 0.4808 0.2834 0.032 Uiso 1 1 calc R . .
C22 C 0.6005(7) 0.3518(5) 0.27375(19) 0.0294(18) Uani 1 1 d
H22 H 0.6702 0.3865 0.2597 0.035 Uiso 1 1 calc R . .
C23 C 0.6142(7) 0.2425(5) 0.2807(2) 0.0286(17) Uani 1 1 d...

المثال ٣

تحديد ذائبية ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate

تم التحقق من ذائبية ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزول أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate من المثال ١ في محلول مائي عند قيم درجة حموضة pH تتراوح من ١ إلى ١١ كما وُصف أدناه.

وتم تحضير المحاليل بمعايرة حمض هيدروكلوريك قياسي standard hydrochloric acid باستخدام محلول هيدروكسيد صوديوم sodium hydroxide مخفّف إلى درجة حموضة مرغوبة. وتراوحت درجة حموضة المحاليل المحضرة من ١ إلى ١١. ثم استخدمت هذه المحاليل لتقدير ذائبية ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate.

وفي كل تجربة، تم وضع ١٥٠ ملغم من ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt في قنينة شفافة سعتها ٥ مل وأضيف ٣-٤ مل من محلول معروف درجة الحموضة. ثم قلّب مزيج المحلول لمدة زمنية يبلغ متوسطها ٣ ساعات عند (i) درجة حرارة الجو المحيط و (ii) ٤°م. ومن ثم، في كل حالة، تم ترشيح المحلول من خلال مرشّح PVDF مقاس مسامه ٠.٢٢ ميكرومتر، وتم تسجيل درجة حموضة المحلول الصافي الناتج، وعوير المحلول من أجل تحديد محتوى ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt باستخدام مطياف UV-Vis UV-Vis spectrophotometer ومحاليل قياسية من الملح.

ويبيّن الجدولان ٣ و ٤ بيانات الذائبية التي تم الحصول عليها. وتدل البيانات على أن الذائبية تعتمد على درجة الحموضة ودرجة الحرارة. وتم الحصول على أفضل قيم للذائبية عند درجة حموضة تقع بين ٤ و ٧. ولوحظ ترسب الملح عند درجتي حموضة >٧ و <٣ عند ترك المحلول يستقر عند درجة حرارة الجو المحيط، مع أن الذائبية كانت أعلى في البداية.

الجدول ٣: بيانات ذائبية ملح المسيلات mesylate salt التي تم الحصول عليها عند درجة حرارة الجو المحيط.

المثال	PH الابتدائية	PH النهائية	الامتصاص عند ٢٦٠ نانومتر	[ملح المسيلات mesylate salt] (ملغم/مل)
١	٠.٢٦	٠.٣٧	٠.٢٦٨٨	١٥.٧١
٢	١.٠٠	١.٠٦	٠.٦٩٢٨	٤٠.٢٩
٣	٢.٥١	٣.٠٠	٠.٧٧٣١	٤٤.٩٤
٤	٤.٩٩	٦.٧٣	٠.٧٦٢٢	٤٤.٣١
٥	٧.٣٤	٧.٣٠	٠.٧٦٥	٤٤.٤٧
٦	٨.١٧	٧.٤٠	٠.٧٦٤٩	٤٤.٤٧
٧	٧.٦٩	٧.٩٠	٠.٧٢٤١	٤٢.١٠
٨	٩.٠٤	٧.٤	٠.٦٠٨٩	٣٥.٤٣
٩	١٠.٩٧	٧.٦	٠.٥٩٤٩	٣٤.٦١
١٠‡	٠.٥٠٤	٠.٥٠	٠.٢٣٧٣	١٣.٨٨

‡ بعد مرور ٦ أيام في المختبر، لوحظ حدوث ترسب في المحلول ١. وما أن تم ترشيح المحلول، عوير من أجل محتوى ملح المسيلات mesylate salt وسُجلت درجة الحموضة

٥

الجدول ٤: بيانات ذائبية ملح المسيلات mesylate salt التي تم الحصول عليها عند ٤°م.

المثال	PH الابتدائية	PH النهائية	الامتصاص عند ٢٦٠ نانومتر	[ملح المسيلات mesylate salt] (ملغم/مل)
١	٠.٢٦	٠.٢٦	٠.١٧٢٤	٩.٨٥
٢	١.٠٠	١.٠٠	٠.٧٣٥٠	٣٩.٤١
٣	٢.٥١	٢.٥١	٠.٧٣٥	٤١.٤٩
٤	٤.٩٩	٤.٩٩	٠.٧٥٠٨	٤٢.٣٩
٥	٧.٣٤	٧.٣٤	٠.٨١٢٤	٤٥.٨٧
٦	٨.١٧	٨.١٧	٠.٧٣٤٣	٤٣.١٧
٧	٧.٦٩	٧.٦٩	٠.٦٧٠٠	٣٧.٨٧
٨	٩.٠٤	٧.٤٠	٠.٥٣٧٢	٣٠.٣٦
٩	١٠.٩٧	٧.٩٠	٠.٥٤٦٩	٣٠.٩٠

المثال ٤

تحديد ذائبية ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methane sulphonate في المحاليل المنظمّة درجة الحموضة buffered solutions

أجري اختبار ذائبية ملح المسيلات mesylate salt المحضر وفقاً للمثال ١ في أنظمة مختلفة منظمة لدرجة الحموضة عند درجة حرارة الجو المحيط وعند ٤°م. وفي المجموعة الأولى من التجارب، كانت المحاليل المنظمة لدرجة الحموضة المختارة هي محاليل سكسينات succinate بدرجة حموضة ٥.٥، سيترات citrate بدرجة حموضة ٥.٥ وتريس Tris/ماليات maleate بدرجات حموضة ٥.٥، ٦.٥ و ٧.٥، بتركيز ٢٠٠ ملي جزيئي. واشتملت محموعة ثانية من المحاليل المنظمة لدرجة الحموضة المستخدمة على محاليل أسيتات acetate بدرجة حموضة ٤.٦، غليسين glycine/حمض ميثان كبريتونيك methansulphonic acid بدرجة حموضة ٤.٦ وغليسين glycine بدرجة حموضة ٥.٥، بتركيز ٢٠٠ ملي جزيئي.

طرق تحضير المحاليل المنظمة لدرجة الحموضة

محلول منظم لدرجة الحموضة من حمض مالئيك maleic acid، تريس tris، هيدروكسيد الصوديوم sodium hydroxide

تم تحضير هذا المحلول المنظم لدرجة الحموضة بإذابة ٢٣.٦٢ غم من حمض مالئيك maleic acid و ٢٤.٢ غم من ثلاثي (هيدروكسي مثيل) أمينو ميثان tris(hydroxymethyl)aminomethane في لتر واحد من الماء. وعويرت مقادير حجم كل منها ٥٠ مل من هذا المحلول باستخدام محلول هيدروكسيد صوديوم sodium hydroxide تركيزه ٠.٢ جزيئي للحصول على درجة الحموضة المستهدفة وأكمل حجمها إلى ٢٠٠ مل بإضافة الماء. وتم تحضير محاليل منظمة لدرجة الحموضة بتركيز ٠.٢ جزيئي ودرجات حموضة تبلغ ٥.٥، ٦.٥ و ٧.٥.

محلول منظم لدرجة الحموضة من حمض سكسينيك succinic acid وهيدروكسيد الصوديوم sodium hydroxide

تم تحضير هذا المحلول المنظم لدرجة الحموضة بإذابة ٢٣.٦٢ غم من حمض سكسينيك succinic acid في لتر واحد من الماء. وعوير ٥٠ مل من هذا المحلول باستخدام محلول هيدروكسيد صوديوم sodium hydroxide تركيزه ٠.٢ جزيئي للحصول على درجة الحموضة المستهدفة وأكمل حجمه إلى ٢٠٠ مل بإضافة الماء. فنتج محلول منظم لدرجة الحموضة تركيزه ٠.٢ جزيئي ودرجة حموضته ٥.٥.

محلول منظم لدرجة الحموضة من حمض سيتريك citric acid وهيدروكسيد الصوديوم sodium hydroxide

تم تحضير هذا المحلول المنظم لدرجة الحموضة بإذابة ٤٢.٠٢ غم من حمض سيتريك citric acid في لتر واحد من الماء. وعوير ٥٠ مل من هذا المحلول باستخدام محلول سيترات ثلاثي الصوديوم tri-sodium citrate تركيزه ٠.٢ جزيئي (٥٨.٨٢ غم في لتر واحد من الماء) للحصول على درجة الحموضة المستهدفة وأكمل حجمه إلى ٢٠٠ مل بإضافة الماء. فنتج محلول منظم لدرجة الحموضة تركيزه ٠.٢ جزيئي ودرجة حموضته ٥.٥.

محلول منظم لدرجة الحموضة من أسيتات الصوديوم sodium acetate وحمض الأسيتيك acetic acid

تم تحضير هذا المحلول المنظم لدرجة الحموضة بإذابة ٤.٤٤ غم من أسيتات الصوديوم sodium acetate في ٢٠٠ مل من الماء. وعوير ٥٠ مل من هذا المحلول باستخدام محلول حمض أسيتيك acetic acid تركيزه ٠.٢٠ جزيئي (١.٣ مل في ٢٠٠ مل من الماء) وأكمل حجمه إلى ٢٠٠ مل بإضافة الماء. فنتج محلول أسيتات acetate منظم لدرجة الحموضة تركيزه ٠.٢٠ جزيئي ودرجة حموضته ٤.٦.

محلول الغليسين glycine

تم تحضير هذا المحلول المنظم لدرجة الحموضة بإذابة ٣.٠١ غم من غليسين glycine في ٢٠٠ مل من الماء. فنتج محلول غليسين glycine تركيزه ٠.٢٠ جزيئي ودرجة حموضته ٤.٩.

دراسة ذائبية ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt في المحاليل المنظمة لدرجة الحموضة

تم إجراء تجربتين مع كل محلول منظم لدرجة الحموضة، واحدة عند درجة حرارة الجو المحيط وأخرى عند ٤°م. وفي كل تجربة أضيف مقدار أسمي بلغ ٢٢٠ ملغم من ملح المسيلات mesylate salt وقلّب مزيج المحلول. وأُوقف التقليب بعد مرور ٣ ساعات، ورشّح المحلول من خلال مرشح PVDF غشائي مقاس مسامه ٠.٢٢ ميكرومتر، خفّف باستخدام مخفّف عيني sample diluent وعوير من أجل تحديد محتوى ملح المسيلات mesylate salt بواسطة HPLC (استشراب بسائل عالي الأداء high performance liquid chromatography). وطوال فترة التجارب، تم حساب محتوى ملح المسيلات mesylate salt في كل عيّنة باستخدام معايرة نقطية point calibration في كل مرة. والنتائج مبيّنة في الجدولين ٥ و ٦.

الجدول ٥: بيانات ذائبية ملح المسيلات mesylate salt في محلول أسيتات acetate منظم لدرجة الحموضة تركيزه ٢٠٠ ملي جزيئي عند ٤٠م.

العينة	المحلول المنظم لدرجة الحموضة المستخدم	PH الإبتدائية	PH النهائية	[ملح المسيلات mesylate salt] (ملغم/مل)
١	أسيتات acetate	٤.٦	٤.٦	٣٧.١٦

الجدول ٦: بيانات ذائبية ملح المسيلات mesylate salt في محلول أسيتات acetate منظم لدرجة الحموضة تركيزه ٢٠٠ ملي جزيئي عند درجة حرارة الجو المحيط

العينة	المحلول المنظم لدرجة الحموضة المستخدم	PH الإبتدائية	PH النهائية	[ملح المسيلات mesylate salt] (ملغم/مل)
١	أسيتات acetate	٤.٦	٤.٥	٣٠.٦٥

ووفقاً للنتائج، وُجد أن ذائبية ملح المسيلات mesylate salt في محلول الأسيتات acetate المنظم لدرجة الحموضة تراوحت ما بين ٣٢ و ٣٧ ملغم/مل. وتم تسخين محلول الملح المنظَّم درجة الحموضة بمحلول أسيتات acetate في محم موصد autoclaving عند ١٢١٠م لمدة ١٥ دقيقة، ثم سخِّن المحلول مرة أخرى عند ٤٠٠م، ٥٥٠م أو ٧٥٠م لمدة ١٠-١٢ يوم. وقد وجد أن درجة حموضة المحلول ومحتوى ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate كانا ثابتين في ظروف الاختبار هذه. ولم يؤدي إجراء اختبارات الثبات عند التجمد-الذوبان freeze-thaw stability على محلول الملح المنظَّم درجة الحموضة بمحلول أسيتات acetate إلى ترسُّب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملحه، ووجد أن درجة حموضة المحلول ومحتوى ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate كانا ثابتين في ظروف الاختبار هذه.

المثال ٥

تحديد ذائبية ميثان كبريتونات بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate

تم تخزين عينات من ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt محضَّر وفقاً للمثال ١ في أكياس محكمة السد sealed bags داخل وعاء محكم السد sealed container عند درجة حرارة تبلغ ٤٠°م وفي جو تبلغ رطوبته النسبية relative humidity ٧٥٪ لمدة ستة شهور. وعند الفترات الزمنية ١ شهر، ٣ شهور و ٦ شهور، أجريت اختبارات متعددة لتحديد إذا ما حدثت أية تغيرات على نقاوة purity الملح أو حالته الفيزيائية physical state. وكانت الاختبارات كالتالي:

(أ) فحص بصري visual examination للون الملح ومظهره الفيزيائي physical appearance.

(ب) قياس طيف الأشعة تحت الحمراء للكشف عن التحول وفقاً لفورييه Fourier Transform Infra Red (FTIR) spectroscopy–مقارنة مع الطيف القياسي المرجعي reference standard spectrum.

(جـ) تحديد درجة الانصهار melting point بواسطة قياس الحرارة بالمسح التفاضلي differential scanning calorimetry (DSC).

(د) تحديد محتوى الماء water content بطريقة كولونية coulometric method باستخدام الكاشف الكولوني AKX coulometric reagent AKX.

(هـ) تحليل الشوائب بواسطة HPLC.

ونتائج الاختبارات مبيَّنة في الجدول ٧. وكما هو واضح، لم يتغير لون ومظهر الملح طوال ستة شهور (وفقاً للاختبار (أ)) وأظهر طيف الأشعة تحت الحمراء (وفقاً للاختبار (ب)) عدم حدوث تغيرات طوال هذه المدة. وعند إجراء الاختبار (جـ)، لم يحدث انخفاض في درجة الانصهار مما يدل على عدم تحلل degradation الملح، وهذه النتيجة كانت مدعومة بتحليل HPLC الذي أظهر عدم زيادة تركيز الشوائب الموجودة في العينة عند الزمن صفر خلال مدة الاختبار.

وبالتالي، وضَّحت اختبارات الثبات بأن لملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt ثبات جيد طوال فترة زمنية طويلة.

المثال ٦

دراسات حيود الأشعة السينية باستخدام مسحوق X-Ray Powder Diffraction (XRPD) Studies من ملح حمض ميثان كبريتونيك بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonic acid salt

أجري تحليل حيود الأشعة السينية باستخدام مسحوق (XRPD) من ملح المسيلات mesylate salt المحضَّر وفقاً للمثال ١ باستخدام مقياس حيود من نوع بروكر دي ٥٠٠ Bruker D500 diffractometer مزوَّد بمرحلة دوّارة rotating stage ومرحلة متغيرة درجات الحرارة variable temperature stage. وكان مصدر الإشعاع radiation source عبارة عن أنبوب نحاس محكم السد sealed copper tube (إشعاع Cu Kα: ١.٥٤٠٦ وحدة أنغستروم) وتم تثبيت الفلطية voltage والتيار current عند ٤٠ كيلوفلط kV و ٤٠ ملي أمبير mA. وكان المكشاف المستخدم عبارة عن عداد ومضي scintillation counter. وأجريت تحاليل XRPD باستخدام برمجيات دفراك بلس XRD كوماندر Diffrac Plus XRD Commander software النسخة ٢. ٣. ١ v2.3.1.

وحضرت العينات بضغط حوالي ١٠ ملغم من عينة الملح برفق داخل حامل العينة sample holder ثم تمهيدها برفق للحصول على سطح مستوي flat surface.

وجمعت مخططات الحيود diffractograms ضمن مدى يتراوح من ٣ درجة إلى ٤٠ درجة، ٢-ثيتا، وحجم خطوة بلغ ٠.٠٠١ درجة وزمن خطوة بلغ ١ ثانية.

ويبيِّن الشكل ٣ مخطط حيود لملح المسيلات mesylate salt.

الجدول ٧: ملخص النتائج التحليلية لاختبار ذائبية ملح ميثان كبريتونات methanesulphonate salt عند درجة حرارة مقدارها ٤٠°م ورطوبة نسبية مقدارها ٧٥٪

		الزمن= صفر	الزمن= شهر واحد	الزمن= ٣ شهور	الزمن= ٦ شهور
	تاريخ أخذ العينة	١٥ تشرين الأول ٢٠٠٤	١٦ تشرين الثاني ٢٠٠٤	١٤ كانون الثاني ٢٠٠٥	١٥ أيار ٢٠٠٥
	مدة التحليل	١٥-٢٥ تشرين الأول ٢٠٠٤	١٦-١٨ تشرين الثاني ٢٠٠٤	١٤-١٩ كانون الثاني ٢٠٠٥	١٤-١٩ كانون الثاني ٢٠٠٥
اختبارات الثبات	المواصفة				
(أ) الوصف	كما ورد	مادة صلبة بيضاء يميل لونها إلى الأصفر	مادة صلبة بيضاء يميل لونها إلى الأصفر	مادة صلبة بيضاء يميل لونها إلى الأصفر	مادة صلبة بيضاء يميل لونها إلى الأصفر
(ب) تحديد التماثل بواسطة FTIR	يتطابق مع الطيف القياسي المرجعي AS76/R/001 (UATR، ٤٠٠٠-٦٥٠ سم$^{-1}$)	يتطابق مع الطيف القياسي المرجعي AS76/R/001 (UATR، ٤٠٠٠-٦٥٠سم$^{-1}$)	يتطابق مع الطيف القياسي المرجعي AS76/R/001 (UATR، ٤٠٠٠-٦٥٠ سم$^{-1}$)	يتطابق مع الطيف القياسي المرجعي AS76/R/001 (UATR، ٤٠٠٠-٦٥٠ سم$^{-1}$)	يتطابق مع الطيف القياسي المرجعي AS76/R/001 (UATR، ٤٠٠٠-٦٥٠ سم$^{-1}$)
(ج) درجة الانصهار بواسطة DSC	كما وردت (٤٠←٤٥٠°م عند ١٠°م/دقيقة، قصعة مرتفعة الضغط)	درجة حرارة الانصهار الماص للحرارة ٣٦٧.٧°م	درجة حرارة الانصهار الماص للحرارة ٣٦٨.٣°م	درجة حرارة الانصهار الماص للحرارة ٣٧٥.٥°م	درجة حرارة الانصهار الماص للحرارة ٣٦٩.١°م
(د) محتوى الماء	(كاشف AKX)	< ٠.١٪ وزن/وزن	< ٠.١٪ وزن/وزن	< ٠.١٪ وزن/وزن	< ٠.١٪ وزن/وزن
(هـ) نسبة الشوائب (بواسطة HPLC)	كما وردت				
الشوائب الكلية		٠.٥٢٪ بالمساحة	٠.٤٩٪ بالمساحة	٠.٥٠٪ بالمساحة	٠.٥٠٪ بالمساحة
٠.٨١٢ RRT		٠.٠٧٪ بالمساحة	٠.٠٧٪ بالمساحة	٠.٠٦٪ بالمساحة	٠.٠٦٪ بالمساحة
١.١٩٦ RRT		٠.٠١٪ بالمساحة	٠.٠٢٪ بالمساحة	لم يُكشف عنه	لم يُكشف عنه
١.٢٢٦ RRT		٠.٠٢٪ بالمساحة	لم يُكشف عنه	٠.٠٢٪ بالمساحة	٠.٠٢٪ بالمساحة
١.٣٠٣ RRT		٠.٠٢٪ بالمساحة	٠.٠٦٪ بالمساحة	لم يُكشف عنه	لم يُكشف عنه
١.٣١٨ RRT		٠.٠٣٪ بالمساحة	لم يُكشف عنه	٠.٠٤٪ بالمساحة	٠.٠٤٪ بالمساحة
١.٤٨٤ RRT		٠.١٥٪ بالمساحة	٠.١٧٪ بالمساحة	٠.١٧٪ بالمساحة	٠.١٧٪ بالمساحة

١.٥٢٦ RRT		٠.٠٣٪ بالمساحة	لم يُكشف عنه	٠.٠٤٪ بالمساحة	٠.٠٣٪ بالمساحة
١.٦٨٠ RRT		٠.١٩٪ بالمساحة	٠.١٧٪ بالمساحة	٠.١٧٪ بالمساحة	٠.١٧٪ بالمساحة
١.٦٨٢ RRT		لم يُكشف عنه	لم يُكشف عنه	لم يُكشف عنه	٠.٠١٪ بالمساحة
النقاوة الكيميائية	كما وردت	٩٩.٤٨٪ بالمساحة	٩٩.٥١٪ بالمساحة	٩٩.٥٠٪ بالمساحة	٩٩.٥٠٪ بالمساحة

المثال ٧

دراسات حول تأثير تغير الرطوبة النسبية على ملح حمض ميثان كبريتونيك بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonic acid salt

(i) أجريت دراسات لامتصاص البخار الثقالي Gravimetric Vapour Sorption (GVS) للتحقق من سلوك ملح المسيلات mesylate salt في ظروف متغيرة الرطوبة. وتم تحضير ملح المسيلات mesylate salt المستخدم في الدراسات من ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt (انظر المثال ١١) وفقاً للطريقة التالية.

أذيب ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt في MeOH ومرِّر من خلال عمود ستارتا-NH_2 Strata-NH2 column بالتصويل باستخدام MeOH. وركّزت الأجزاء المحتوية على المنتج في خواء فنتجت القاعدة الحرة بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide. وأضيف MeOH تركيزه ٧٠٪ في الماء إلى مزيج من القاعدة الحرة في MeOH وقلّب المزيج عند درجة حرارة الجو المحيط لمدة ١٤ ساعة، ثم ركّز في خواء، وسخّن في التولوين toluene على شكل مزيج ثابت درجة الغليان (٣ مرات). ونقّي الركاز بالسحن trituration باستخدام الأسيتون acetone وجفّف في فرن خوائي vacuum oven فنتج ملح المسيلات mesylate salt.

وتم تحليل عينات ملح المسيلات mesylate salt الناتج وفقاً للطريقة الموصوفة أعلاه بواسطة محلل امتصاص رطوبة من نوع هيدن آي جي أيه زورب Hiden IGASorp moisture sorption analyser يعمل وفقاً لبرمجيات سي إف آر زورب CFRSorp software. وبلغ مقدار العينات ١٠ ملغم بشكل نموذجي. وتم تطبيق خطوط تساوي درجة الحرارة لامتزاز-مج الرطوبة moisture adsorption-desorption isotherms كما هو مبيّن في الجدول التالي:

امتزاز	مج
٤٠	٨٥
٥٠	٧٥
٦٠	٦٥
٧٠	٤٥
٨٠	٣٥
٩٠	٢٥
	١٥
	٥
	٠
	١٠
	٢٠
	٣٠

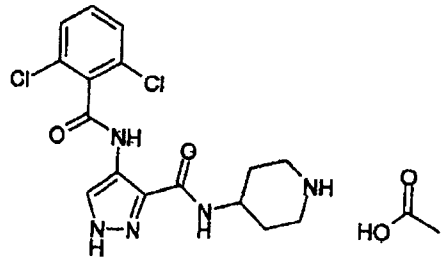
وأجريت دورة مزدوجة باستخدام عينة مقدارها ١٢.٩٢ ملغم من ملح المسيلات mesylate salt. وأظهر خط تساوي درجة الحرارة وفقاً لـ GVS الناتج أن الملح امتص حوالي ٤٪ بالوزن من الماء خلال مدى رطوبة نسبية من صفر٪ إلى ٩٠٪. إلا أنه، بشرط عدم تعرض الملح إلى رطوبة نسبية بنسب تزيد عن ٨٠٪، يكون امتصاص الماء أقل من ٢.٦٪ وزن/وزن. وبشكل مهم، فإن الماء الممتص خلال مرحلة الامتزاز تمت خسارته خلال حالة المج مما يدل على أن امتصاص الماء عبارة عن تأثير سطحي.

(ii) في اختبار منفصل، ضُغط حوالي ١٠ ملغم من ملح المسيلات mesylate salt المحضر كما ذُكر أعلاه على شريحة زجاجية منزلقة glass slide بشكل مستو للحصول على مساحة سطحية surface area كبيرة ووضِع في مجفف dessicator يحتوي على محلول مائي مشبع من كلوريد الصوديوم sodium chloride. ووضع المجفف في حاضنة incubator عند ٤٠°م لتوفير جو تبلغ رطوبته النسبية حوالي ٧٥٪. وأزيلت العينة في اليوم ٨ واليوم ١٨ وقورنت مخططات XRPD للعينة عند هذه الأزمان مع مخطط XRPD للملح قبل بدء الاختبار. ولم يلاحظ وجود تغيرات في مخططات XRPD. ودل تحليل HPLC على عدم تحلل الملح خلال مدة الاختبار.

ويوضح الاختباران (i) و (ii) أعلاه أن ملح المسيلات mesylate salt يمتص بعض الماء عند تعرضه لظروف مرتفعة الرطوبة، إلا أن الماء الممتص تتم خسارته عندما تنخفض الرطوبة النسبية ولا يحدث تغير في البنية البلورية للملح. ولذلك يعتبر ملح المسيلات mesylate salt ملح لامائي ثابت .

المثال ٨

تحضير ملح حمض أسيتيك بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو) - ١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide acetic acid salt



أضيف ٤.٥ غم (٥٣.٥ ملي مول) من بيكربونات الصوديوم sodium bicarbonate إلى محلول من ٢٠.٦ غم (٥٠ ملي مول) من ملح هيدروكلوريد بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو) -١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide hydrochloride salt في ٥٠٠ مل من الماء مقلّب عند درجة حرارة الجو المحيط. وقلّب المزيج لمدة ساعة واحدة وجُمعت المادة الصلبة المتشكلة بالترشيح، جففت في خواء مع التسخين في التولوين toluene على شكل مزيج ثابت درجة الغليان (٣ مرات) فنتجت القاعدة الحرة المقابلة من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو) -١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide.

^{1}H ر ن م (٤٠٠ ميغاهز، $(CD_3)_2SO$) دلتا ١٠.٢٠ (ف، H١)، ٨.٣٠ (ف، H١)، ٨.٢٥ (ز، H١)، ٧.٥٠-٧.٦٠ (ع، H٣)، ٣.٧٠ (ع، H١)، ٣.٠٠ (ز، H٢)، ٢.٥٠ (ع، H٢)، ١.٧٠ (ز، H٢)، ١.٥٠ (ع، H٢).

وأضيف ١٥ مل (٢٦٢ ملي مول) من حمض أسيتيك جليدي glacial acetic acid إلى معلق suspension مقلّب من ١٠.٠ غم (٢٦.٢ ملي مول) من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو) -H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك -4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide في ١٥٠ مل من الميثانول methanol عند درجة حرارة الجو المحيط. وبعد ساعة واحدة، نتج محلول صاف تم تركيزه في الخواء مع التسخين في التولوين toluene على شكل مزيج ثابت درجة الغليان (مرتين). ثم سُحن الركاز مرتين باستخدام ١٠٠ مل من أسيتونتريل acetonitrile في كل مرة وجفّفت المادة الصلبة في الخواء فنتج ١٠.٣ غم من ملح حمض أسيتيك بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك -4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide acetic acid salt في صورة مادة صلبة بيضاء اللون.

^{1}H ر ن م (٤٠٠ ميغاهز، $(CD_3)_2SO$) دلتا ١٠.٢٠ (ف، H١)، ٨.٤٠ (ز، H١)، ٨.٣٥ (ف، H١)، ٧.٥٠-٧.٦٠ (ع، H٣)، ٣.٨٥ (ع، H١)، ٣.٠٠ (ز، H٢)، ٢.٦٠ (ث، H٢)، ١.٨٥ (ف، H٣)، ١.٧٠ (ز، H٢)، ١.٥٥ (ف، H٢).

المثال ٩

دراسات قياس الحرارة بالمسح التفاضلي على ملح حمض أسيتيك بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو) -H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide acetic acid salt

أُخضع ملح الأسيتات acetate salt المحضر وفقاً للمثال ٨ إلى دراسات DSC باستخدام جهاز TA كيو ١٠٠٠ TA instrument Q1000 مزوّد بجامع عينات أوتوماتي به ٥٠ موضع 50 position autosampler. واستخدم الإنديوم indium كمصدر للطاقة energy ومقياس لمعايرة درجة الحرارة temperature calibration standard.

وسُخّنت العينات بمعدل ١٠°م/دقيقة إلى درجة حرارة تقع بين ١٠°م و ٢٣٠°م، وحوفظ على تدفق من النتروجين nitrogen purge بمعدل ٣٠مل/دقيقة فوق العينة. وتراوحت مقادير العينات المستخدمة ما بين ١ ملغم و ٣ ملغم وغضّنت كافة العينات في قصعة محكمة السد hermetically sealed pan. ويبيّن الشكل ٥ مسح DSC لملح الأسيتات acetate salt. وتتبع DSC

يبيِّن حالة عند ٢٣١.٥°م، ناتجة عن فقدان حمض الأسيتيك acetic acid والتحول اللاحق إلى القاعدة الحرة. ونتيجة للتسخين الإضافي، فإن المادة الصلبة تتحلل/تذوب عند ٢٩٢.٩°م.

المثال ١٠

دراسات حيود الأشعة السينية باستخدام مسحوق من ملح حمض أسيتيك بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو) -H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide acetic acid salt

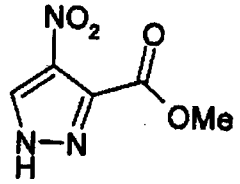
أجري تحليل حيود الأشعة السينية باستخدام مسحوق (XRPD) من ملح الأسيتات acetate salt المحضر وفقاً للمثال ٨ باستخدام مقياس حيود من نوع بروكر دي ٥٠٠ Bruker D500 وفقاً للطريقة الموصوفة في المثال ٦.

ويبيِّن الشكل ٤ مخطط حيود لملح الأسيتات acetate salt.

المثال ١١

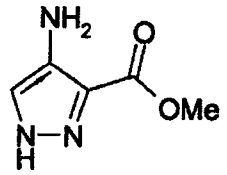
تحضير هيدروكلوريد بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide hydrochloride

١١أ. تخليق إستر مثيل لحمض ٤-نترو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester



أضيف ٢.٩٠ مل (٣٩.٨ ملي مول) من كلوريد ثيونيل thionyl chloride ببطء إلى مزيج من ٥.٦٨ غم (٣٦.٢ ملي مول) من حمض ٤-نترو-٣-بيرازول كربوكسيليك 4-nitro-3-pyrazolecarboxylic acid في ١٠٠ مل من الميثانول methanol عند درجة حرارة الجو المحيط وقلِّب المزيج لمدة ٤٨ ساعة. وركِّز المزيج في الخواء وجفِّف بواسطة التسخين في التولوين toluene على شكل مزيج ثابت درجة الغليان فنتج إستر مثيل لحمض ٤-نترو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester.

١١ب. تخليق إستر مثيل لحمض ٤-أمينو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-amino-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester



تم تقليب مزيج من ٣٤.٦ ملي مول من إستر مثيل لحمض ٤-نترو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-nitro-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester و ٦٥٠ ملغم من بلاديوم palladium (Pd) محمول على كربون carbon (C) بنسبة ١٠٪ في ١٥٠ مل من EtOH تحت جو من الهيدروجين hydrogen لمدة ٢٠ ساعة. ورشّح المزيج من خلال سدادة من السيليت plug of Celite، ركّز في الخواء وجفّف بواسطة التسخين في التولوين toluene على شكل مزيج ثابت درجة الغليان فنتج إستر مثيل لحمض ٤-أمينو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-amino-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester.

١١جـ. حمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك

4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid

أضيف ٨.٢ غم (٣٩.٠٥ ملي مول) من كلوريد ٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل 2,6-dichlorobenzoyl chloride بحذر إلى محلول من ٥ غم (٣٥.٥ ملي مول) من إستر مثيل لحمض ٤-أمينو-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-amino-1H-pyrazole-3-carboxylic acid methyl ester و ٥.٩٥ مل (٤٢.٦ ملي مول) من ثلاثي إثيل أمين triethylamine في ٥٠ مل من الديوكسان dioxan ثم قلّب عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ ساعات. ورشّح مزيج التفاعل وعولج الراشح باستخدام ٥٠ مل من الميثانول methanol و ١٠٠ مل من محلول هيدروكسيد صوديوم sodium hydroxide تركيزه ٢ جزيئي، سخّن عند ٥٠°م لمدة ٤ ساعات، ثم بخّر. وأضيف ١٠٠ مل من الماء إلى الركاز ثم حمّض acidified باستخدام حمض هيدروكلوريك hydrochloric acid مركز. وجمعت المادة الصلبة بالترشيح، غسلت بـ ١٠٠ مل من الماء وجفّفت بالسفط sucked dry فنتج ١٠.٠٥ غم من حمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-

بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid في صورة مادة صلبة بنفسجية باهتة اللون.

١١د. إستر ثث-بيوتيل لحمض ٤-{[٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربونيل]-أمينو}-بيبريدين-١-كربوكسيليك

4-{4-[2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carbonyl]-amino}-piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester

قلّب مزيج من ٦.٥ غم (٢١.٦ ملي مول) من حمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid، ٤.٧٦ غم (٢٣.٨ ملي مول) من ٤-أمينو-١-BOC-بيبريدين 4-amino-1-BOC-piperidine، ٥.٠ غم (٢٥.٩ ملي مول) من EDC و ٣.٥ غم (٢٥.٩ ملي مول) من HOBt في ٧٥ مل من DMF عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٠ ساعة. وركّز مزيج التفاعل في الخواء ووزّع الركاز بين ١٠٠ مل من أسيتات الإثيل ethyl acetate و ١٠٠ مل من محلول بيكربونات الصوديوم sodium bicarbonate المائي المشبع. وغسلت الطبقة العضوية بماء أجاج، جففت فوق $MgSO_4$ وركّزت في الخواء. وأذيب الركاز في حوالي ٣٠ مل من MeOH تركيزه ٥٪ في DCM. وجُمعت المادة غير الذائبة بالترشيح وغسلت بـ DCM وجففت في الخواء فنتج ٥.٣٨ غم من إستر ثث-بيوتيل لحمض ٤-{[٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربونيل]-أمينو}-بيبريدين-١-كربوكسيليك 4-{[4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carbonyl]-amino}-piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester في صورة مادة صلبة بيضاء اللون. وركّز الراشح في الخواء ونقّي الركاز بالاستشراب العمودي column chromatography بالتصويل باستخدام مزيج متدرج التركيز من EtOAc/هكسان hexane بنسبة ٢:١ إلى ١٠٠٪ EtOAc فنتج مقدار آخر بلغ ٢.٥٤ غم من إستر ثث-بيوتيل لحمض ٤-{[٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربونيل]-أمينو}-بيبريدين-١-كربوكسيليك 4-{[4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carbonyl]-amino}-piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester في صورة مادة صلبة بيضاء اللون.

١١هـ بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide

عولج محلول من ٧.٩ غم من إستر ثث-بيوتيل لحمض ٤-{[٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربونيل]-أمينو}-بيبريدين-١-كربوكسيليك-4-{[4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carbonyl]-amino}-piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester في ٥٠ مل من MeOH و ٥٠ مل من EtOAc باستخدام ٤٠ مل من HCl-EtOAc مشبع ثم قلّب عند درجة حرارة الغرفة طوال الليل. ولم يتبلور المنتج بسبب وجود الميثانول methanol، ولذلك بخّر مزيج التفاعل وسُحن الركاز باستخدام EtOAc. وجمعت المادة الصلبة البيضاء المائل لونها إلى الأصفر الناتجة بالترشيح، غسلت بـ EtOAc وسفطت على لبيدة sinter إلى درجة الجفاف فنتج ٦.٣ غم من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-برازول-٣-كربوكسيليك-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide بصفته ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt. (LC/MS: R_t ٥.٨٩، $[M+H]^+$ ٣٨٢/٣٨٤).

الفعالية الحيوية

المثال ١٢

معايرة لقياس فعالية مثبطة لـ CDK2/سيكلين A كيناز CyclinA Kinase منشّط (IC_{50})

يمكن تحديد الفعالية المثبطة لكيناز CDK2 باستخدام البروتوكول التالي.

تم تخفيف CDK2/سيكلين CyclinA A منشط (انظر ما جاء عن براون Brown ومعاونيه في مجلة Nat. Cell Biol.، المجلد ١، ص ٤٣٨-٤٤٣، ١٩٩٩م؛ وما جاء عن ئي.دي لو Lowe, E.D. ومعاونيه في مجلة Biochemistry، المجلد ٤١، ص ١٥٦٢٥-١٥٦٣٤، ٢٠٠٢م) إلى تركيز بلغ ١٢٥ بيكوجزيئي في محلول معايرة منظم لدرجة الحموضة تركيزه X٢.٥ (يتكون من MOPS تركيزه ٥٠ ملي جزيئي ودرجة حموضته ٧.٢، بيتا-غليسيروفوسفات β-glycerophosphate تركيزه ٦٢.٥ ملي جزيئي، EDTA تركيزه ١٢.٥ ملي جزيئي، $MgCl_2$ تركيزه ٣٧.٥ ملي جزيئي، ATP تركيزه ١١٢.٥ ملي جزيئي، DTT تركيزه ٢.٥ ملي جزيئي، أورثو فانادات الصوديوم sodium orthovanadate تركيزه ٢.٥ ملي جزيئي، زلال مصل بقري bovine serum albumin تركيزه ٠.٢٥ ملغم/مل)، ومزج ١٠ ميكرولتر منه مع ١٠ ميكرولتر من مزيج لركيزة هستون histone substrate mix (٦٠ ميكرولتر من هستون بقري H1 (من شركة أبستيت بيوتيكنولوجي Upstate Biotechnology، بتركيز بلغ ٥ ملغم/مل)، ٩٤٠ ميكرولتر من H_2O، ٣٥

ميكروكوري من γ^{33}P-ATP) وأضيف إلى ألواح تحتوي على ٩٦ عين مع ٥ ميكرولتر من مواد مخففة مختلفة لمركب الاختبار في DMSO (بتركيز لا يزيد عن ٢.٥%). وسمح بتقدم التفاعل لمدة تراوحت من ساعتين إلى ٤ ساعات قبل إيقافه بواسطة مقدار فائض بلغ ٥ ميكرولتر من حمض أورثو فوسفوريك ortho phosphoric acid بتركيز بلغ ٢%. وفصل γ^{33}P-ATP الذي لم يمزج في هستون H1 عن هستون H1 المضاف إليه مجموعة فوسفوريل phosphorylated histone H1 على لوح ترشيح من نوع ملي بور إم إيه بي إتش Millipore MAPH. وتم ترطيب عيون اللوح من نوع إم إيه بي إتش MAPH plate بواسطة حمض أورثو فوسفوريك orthophosphoric acid تركيزه ٠.٥%، ثم رشحت منتجات التفاعل بواسطة وحدة ترشيح خوائي من نوع ملي بور Millipore filtration unit خلال العيون. وبعد الترشيح، غسل الركاز مرتين باستخدام ٢٠٠ ميكرولتر من حمض أورثو فوسفوريك orthophosphoric acid تركيزه ٠.٥%. وبمجرد جفاف المرشحات، أضيف ٢٠ ميكرولتر من مادة إيماض scintillant من نوع ميكروسكنت ٢٠ Microscint 20، ثم عدت على جهاز من نوع باكرد توب كونت Packard Topcount لمدة ٣٠ ثانية.

وحسبت النسبة المئوية لتثبيط فعالية CDK2 ورسمت بيانياً لتحديد تركيز مركب الاختبار اللازم لتثبيط فعالية CDK2 إلى النصف (IC_{50}).

وكان للمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide قيمة لـ IC_{50} تقل عن ٠.١ ميكروجزيئي في معايرة CDK2 المبينة أعلاه.

المثال ١٣

معايرة لقياس فعالية مثبطة لـ CDK1/سيكلين B كيناز CyclinB Kinase منشّط (IC_{50})

كانت معايرة CDK1/سيكلين CyclinB B مطابقة لتلك لـ CDK2/سيكلين CyclinA A المبينة أعلاه باستثناء استخدام CDK1/سيكلين CyclinB B (من شركة أبستيت دسكفري Upstate Discovery) وتخفيف الانزيم إلى تركيز بلغ ٦.٢٥ نانوجزيئي.

وكان للمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide قيمة لـ IC_{50} تقل عن ٠.١ ميكروجزيئي في معايرة CDK1 المبينة أعلاه.

المثال ١٤

معايرة فعالية تثبيط كيناز GSK3-B

تم تخفيف GSK3-β (من شركة أبستيت دسكفري Upstate Discovery) إلى تركيز بلغ ٧.٥ نانوجزيئي في MOPS تركيزه ٢٥ ملي جزيئي، عند درجة حموضة بلغت ٧.٠٠، BSA تركيزه ٢٥ ملغم/مل، Brij-35 بنسبة ٠.٠٠٢٥%، غليسرول glycerol بنسبة ١.٢٥%، EDTA تركيزه ٠.٥ ملي جزيئي، $MgCl_2$ تركيزه ٢٥ ملي جزيئي، بيتا مركبتو إيثانول β-mercaptoethanol بنسبة ٠.٠٢٥%، ATP تركيزه ٣٧.٥ ملي جزيئي ومزج ١٠ ميكرولتر منه مع ١٠ ميكرولتر من مزيج الركيزة. وكان مزيج الركيزة لـ GSK3-β عبارة عن فوسفو-غليكوجين سينثاز ببتيد-٢ phospho-glycogen synthase peptide-2 تركيزه ١٢.٥ ميكروجزيئي (من من شركة أبستيت دسكفري Upstate Discovery) في ١ مل من الماء مع ٣٥ ميكروكوري من γ^{33}P-ATP. وأضيف كل من الانزيم والركيزة إلى ألواح تحتوي على ٩٦ عين مع ٥ ميكرولتر من مواد مخففة مختلفة لمركب الاختبار في DMSO (بتركيز لا يزيد عن ٢.٥%). وسمح بتقدم التفاعل لمدة ٣ ساعات (GSK3-β) قبل إيقافه بواسطة مقدار فائض بلغ ٥ ميكرولتر من حمض أورثو فوسفوريك orthophosphoric acid بتركيز بلغ ٢%. وكان إجراء الترشيح مشابهاً لذلك المستخدم في معايرة CDK2/سيكلين CyclinA A المنشّط المبين أعلاه.

وكان للمركب بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide قيمة لـ IC_{50} تقل عن ٠.١ ميكروجزيئي في معايرة GSK3-B المبينة أعلاه.

المثال ١٥

فعالية مضادة للتكاثر

يمكن تحديد الفعاليات المضادة للتكاثر لمركب بقياس قدرة المركب على تثبيط نمو الخلايا في عدد من الخطوط الخلوية. ويقاس تثبيط نمو الخلايا باستخدام معايرة ألامار بلو Alamar Blue assay (انظر ما جاء عن إم. إم، نوكياري Nociari, M. M، إيه، شاليف Shalev, A، بيه.، بنياس Benias, P.، سي. رسو Russo, C. في مجلة Journal of Immunological Methods، مجلد ٢١٣، ص ١٥٧-١٦٧، ١٩٩٨م). واعتمدت الطريقة على قدرة الخلايا العيوشة على اختزال الريسازورين resazurin إلى منتج التفلور الخاص به المتمثل في الريسوروفين resorufin.

وبالنسبة لكل معايرة تكاثر طليت الخلايا على الألواح التي تحتوي على ٩٦ عين وسمح باستعادتها لمدة ١٦ ساعة قبل إضافة المركبات المثبطة لمدة ٧٢ ساعة إضافية. وعند نهاية فترة الحضانة أضيف ألامار بلو Alamar Blue بنسبة ١٠% (حجم/حجم) وتم حضنها لمدة إضافية بلغت ٦ ساعات قبل تحديد منتج التفلور عند ex تركيزه ٥٣٥ نانوجزيئي/em تركيزه ٥٩٠ نانوجزيئي. وفي حالة معايرة الخلايا غير المتكاثرة حوفظ على الخلايا بحيث تكون في حالة اقتران لمدة ٩٦ ساعة قبل إضافة المركبات المثبطة لمدة ٧٢ ساعة إضافية. وحدد عدد الخلايا العيوشة بواسطة معايرة ألامار بلو كما هو مبين سابقاً. ويمكن الحصول على الخطوط الخلوية من ECACC (مجموعة المزارع الخلوية الأوروبية European Collection of cell Cultures).

وباستخدام هذه المعايرة، وجد أن ملح حمض ميثان الكبريتونيك لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك methanesulphonic acid salt of 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide له قيمة لـ IC_{50} تبلغ عن ٠.١١ في خلايا HCT-116.

التركيبات الصيدلية

المثال ١٦

(i) تركيبة على شكل قرص

تم تحضير تركيب على شكل قرص يحتوي على مركب بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح بالإضافة إلى حمض منه كما هو محدد في هذا البيان بخلط ٥٠ ملغم من المركب أو ملحه مع ١٩٧ ملغم من اللاكتوز lactose (BP) بصفته مادة مخففة، و٣ ملغم من استيارات المغنيسيوم magnesium stearate بصفته مادة مزلقة lubricant وضغطها لتشكيل قرص بطريقة معروفة.

(ii) تركيبة على شكل كبسولة

تم تحضير تركيبة على شكل كبسولة بخلط ١٠٠ ملغم من مركب بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح بالإضافة إلى حمض منه كما هو محدد في هذا البيان مع ١٠٠ ملغم من اللاكتوز lactose وملء الخليط الناتج في كبسولات قياسية مصنوعة من الجيلاتين الصلب غير الشفاف.

(iii) تركيبة I قابلة للحقن

يمكن تحضير تركيب غير معوي للإعطاء عن طريق الحقن بإذابة مركب بالصيغة (I^0) أو (I) (مثلاً في صورة ملح) في ماء يحتوي على غليكول بروبيلين propylene glycol بنسبة

١٠% للحصول على تركيز للمركب الفعال يبلغ ١.٥% وزناً. ثم تم تعقيم المحلول بالترشيح، وعبئ في أمبولة ampoule وأحكم سدها.

(iv) تركيبة II قابلة للحقن

تم تحضير تركيب غير معوي للحقن بإذابة مركب بالصيغة (I^0) أو (I) تركيزه ٢ ملغم/مل (مثلاً في صورة ملح) ومنيتول mannitol تركيزه ٥٠ ملغم/مل في الماء، ترشيح معقم للمحلول وملؤه في قوارير vials أو أمبولات يمكن إحكام سدها سعتها ١ مل.

(v) تركيبة III قابلة للحقن

يمكن تحضير تركيبة للتصريف في الوريد بالحقن أو التسريب بإذابة المركب بالصيغة (I^0) أو (I) (مثلاً في صورة ملح) في الماء بتركيز يبلغ ٢٠ ملغم/مل. ثم يحكم سد القارورة وتعقم بواسطة وضعها في محم موصد autoclaving.

(vi) تركيبة IV قابلة للحقن

يمكن تحضير تركيبة للتصريف في الوريد بالحقن أو التسريب بإذابة المركب بالصيغة (I^0) أو (I) (مثلاً في صورة ملح) في ماء يحتوي على محلول منظم لدرجة الحموضة (مثلاً أسيتات acetate بتركيز يبلغ ٠.٢ جزيئي ودرجة حموضة ٤.٦) بتركيز يبلغ ٢٠ ملغم/مل. ثم يحكم سد القارورة وتعقم بواسطة وضعها في محم موصد.

(vii) تركيبة حقن تحت الجلد

تم تحضير تركيبة للإعطاء تحت الجلد بمزج مركب بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح بالإضافة إلى حمض منه كما هو محدد مسبقاً في هذا البيان مع زيت ذرة corn oil من صنف صيدلي للحصول على تركيز يبلغ ٥ ملغم/مل. وعقم التركيب وملئ في وعاء ملائم.

(viii) تركيبة مجفدة

وضعت أجزاء مقادير متساوية من مركب مشكل بالصيغة (I^0) أو (I) أو ملح بالإضافة إلى حمض منه كما هو محدد في هذا البيان في قوارير سعتها ٥٠ مل وجفدت. وأثناء التجفيد، تم تجميد التراكيب باستخدام بروتوكول تجميد بخطوة واحدة عند درجة حرارة بلغت -٤٥°م. ورفعت درجة الحرارة إلى -١٠°م من أجل التلدين annealing، ثم خفضت حتى التجمد عند -٤٥°م، تلاها التجفيف الأولي عند ٢٥°م لمدة بلغت ٣٤٠٠ دقيقة تقريباً، ثم تجفيف ثانوي بواسطة

خطوات مرتفعة درجة الحرارة تصل إلى ٥٠°م. وضبط الضغط أثناء التجفيف الأولي والثانوي عند ٨٠ ملي طور.

(ix) ركازة تعطى في الوريد

حضر محلول مائي منظم لدرجة الحموضة بإذابة بيبريدينيل (٤) أميد ميثان كبريتونات لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide methanesulphonate بتركيز بلغ ٢٠ ملغم/مل في محلول منظم لدرجة الحموضة من أسيتات صوديوم sodium acetate/حمض أسيتيك acetic acid تركيزه ٠.٢ جزيئي عند درجة حموضة بلغت ٤.٦.

وملء المحلول منظم درجة الحموضة، بالترشيح لإزالة المادة الدقائقية، في وعاء (مثل قوارير زجاجية من الصنف ١) ثم أحكم سده (مثلاً بواسطة سدادة فلوروتيك Florotec stopper) وثبت (مثلاً بواسطة أداة تجعيد من الألومنيوم aluminium crimp). وإذا كان كل من المركب والتركيبة ثابتين بدرجة كافية، تعقم التركيبة بوضعها في محم موصد عند ١٢١°م لفترة زمنية ملائمة. وإذا كانت التركيبة غير ثابتة ليتم وضعها في محم موصد، يمكن تعقيمها باستخدام مرشح مناسب وملئها في ظروف معقمة في قوارير معقمة. وعند الإعطاء في الوريد، يمكن إعطاء المحلول على شكل جرعات كما هو، أو يمكن حقنه في كيس تسريب infusion bag (يحتوي على سواغ مقبول صيدلياً، مثل محلول ملحي saline بنسبة ٠.٩% أو دكستروز dextrose بنسبة ٥%)، قبل الإعطاء.

المثال ١٧

تحديد الفعالية المضادة للفطريات

يمكن تحديد الفعالية المضادة للفطريات لملح بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide باستخدام البروتوكول التالي.

تم اختبار الأملاح ضد مجموعة من الفطريات تشمل كنديدا بريسيلوسيس Candida parpsilosis، كنديدا تروبيكاليس Candida tropicalis، كنديدا ألبيكانز Candida albicans برقم ٣٦٠٨٢ من مجموعة المزارع النمطية الأمريكية ومكورة خفية جديدة التكوين Cryptococcus

neoformans. وحوفظ على الكائنات الحية الخاضعة للاختبار على سطوح مائلة من أغار سابورو دكستروز Sabouraud Dextrose Agar slants عند ٤°م. وحضرت معلقات مفردة لكل كائن حي بزراعة الخميرة طوال الليل عند ٢٧°م على أسطوانة دوّارة في مرق من قاعدة نتروجين-الخميرة yeast-nitrogen base broth (YNB) مع أحماض أمينية (من شركة دفكو Difco، مدينة دترويت Detroit، ولاية مشيغان Mich)، عند درجة حموضة بلغت ٧.٠ مع حمض مورفولين بروبان كبريتونيك morpholine propanesulphonic acid (MOPS). ثم فرز المعلق بالطرد المركزي وغسل مرتين باستخدام NaCl بلغت نسبته ٠.٨٥% قبل تعريض معلق الخلايا المغسول للموجات الصوتية لمدة ٤ ثوانٍ (من شركة برانسون سونيفير Branson Sonifier، النموذج ٣٥٠، مدينة دانبوري Danbury، ولاية كونكتيكت. Conn.). وتم عد الأبواغ الأصلية blastospores في عداد كريات الدم haemocytometer وضبطت حتى تم الوصول إلى تركيزها المرغوب في NaCl البالغة نسبته ٠.٨٥%.

وحددت فعالية مركبات الاختبار باستخدام تعديل لتقنية التخفيف الدقيق بالمرق broth microdilution technique. وخففت مركبات الاختبار في DMSO إلى نسبة بلغت ١ ملغم/مل ثم خففت إلى ٦٤ ميكروغم/مل في مرق YNB، عند درجة حموضة بلغت ٧.٠ بواسطة MOPS (استخدم الفلوكونازول Fluconazole كضابط) لتزويد محلول معالجة لكل مركب. وعند استخدام لوح يحتوي على ٩٦ عين، حضرت العيون ١ و٣ إلى ١٢ بواسطة مرق YNB، وأجريت عمليات تخفيف تصل إلى ١٠ أضعاف لمحلول المركب في العيون من ٢ إلى ١١ (أمداء التراكيز تراوحت من ٦٤ إلى ٠.١٢٥ ميكروغم/مل). وتعمل العين ١ كضابط تعقيم ومادة غفل blank لمعايرات تتم بقياس الضوء الطيفي spectrophotometric assays. وتعمل العين ١٢ كضابط نمو. وتم تلقيح inoculate ألواح العيار الدقيق microtitre بمقدار بلغ ١٠ ميكرولتر في كل من العيون ٢ إلى ١١ (بلغ حجم مادة اللقاح inoculum النهائي 10^4 كائن حي/مل). وحضنت الألواح التي تم تلقيحها لمدة ٤٨ ساعة عند ٣٥°م. وحددت قيم IC50 بتقنية قياس الضوء الطيفي بقياس الامتصاص عند طول موجي بلغ ٤٢٠ نانومتر (بواسطة قارئ أوتوماتي يحتوي على ألواح دقيقة Automatic Microplate Reader، من شركة دوبونت إنسترومنتس DuPont Instruments، مدينة ولمنغتون Wilmington، ولاية دلاور Del.) بعد رج الألواح لمدة دقيقتين بواسطة خلاط دوّامي vortex-mixer (خلاط من نوع فورت-جيني ٢ Vorte-Genie 2 Mixer، من شركة سينتيفيك

إندستريز Scientific Industries، إنك.، مدينة بوليميا Bolemia، ولاية نيويورك .N.Y). وتحدد نقطة نهاية IC_{50} على أنها أقل تركيز للعقار يظهرانخفاض في النمو بنسبة ٥٠% (أو أكثر) تقريباً مقارنة بعين الضابط. وعند استخدام معايرة التعكر turbidity assay تحدد نقطة النهاية على أنها أقل تركيز للعقار يكون عندها تعكر العين أقل من ٥٠% للضابط (IC50). وتحدد التراكيز الدنيا الحالة للخلايا Minimal Cytolytic Concentrations (MCC) بواسطة الاستنبات الثانوي sub-culturing لجميع العيون من اللوح الذي يحتوي على ٩٦ عين على لوح أغار سابورو دكستروز (SDA)، حضن لمدة تراوحت من يوم إلى يومين عند ٣٥°م ثم فحص قابلية الخلايا للحياة.

المثال ١٨

بروتوكول للتقييم الإحيائي لضبط الإصابة الفطرية للنبات الكامل في الجسم الحي

أذيب ملح بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide salt في أسيتون acetone، مع محاليل مخففة بشكل متسلسل على التوالي في الأسيتون acetone للحصول على مدى من التراكيز المرغوبة. وتم الحصول على أحجام المعالجة النهائية بإضافة ٩ أحجام من توين-٢٠ (علامة تجارية) Tween-20 ™ مائي بنسبة ٠.٠٥% أو تريتون-إكس-١٠٠ (علامة تجارية) Triton X-100™ بنسبة ٠.٠١%، اعتماداً على مولد المرض.

ثم استخدمت التراكيب لاختبار فعالية المركبات وفقاً للاختراع ضد لفحة الطماطم tomato blight (فطر عفونة البطاطس phytophthora infestans) باستخدام البروتوكول التالي. وزرعت ثمار الطماطم (كلتيفار رتغرز cultivar Rutgers) من البذور في مزيج زراعة في أصص أساسه خث قليل التربة soil-less peat-based potting mixture حتى تراوح طول البادرات seedlings من ١٠ إلى ٢٠ سم. ثم رشت النباتات لإفراغ مركب الاختبار بمعدل بلغ ١٠٠ جزء في المليون. وبعد ٢٤ ساعة تم تلقيح النباتات الخاضعة للاختبار بواسطة رشها بمعلق مائي من حافظات الأبواغ لفطر عفونة البطاطس، وحوفظ عليها في حجيرة مرطبة طوال الليل. ثم نقلت النباتات إلى الدفيئة greenhouse حتى تطور المرض على النباتات الضابطة غير المعالجة.

واستخدمت بروتوكولات مشابهة أيضاً لاختبار فعالية المركبات وفقاً للاختراع في مكافحة الصدأ المسمر الذي يصيب القمح Brown Rust of Wheat (شقرانية Puccinia)، العفن الدقيقي

الذي يصيب القمح Powdery Mildew of Wheat (إرفسيف فرامنيس Ervsiphe vraminis)، القمح (كلتيفار مونون cultivar Monon)، تبقع أوراق القمح Leaf Blotch of Wheat (سبتوريا تريتيسي Septoria tritici) وتبقع قنبع القمح Glume Blotch of Wheat (لبتوسفاريا نودورم Leptosphaeria nodorum).

المثال ١٩

بروتوكول عام لتحديد ذائبيات القاعدة الطلقة وأملاح بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide

يمكن تحديد ذائبيات أملاح مختلفة لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلوروبنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide بواسطة البروتوكول التالي.

الإجراء

أضيف ٥٠ ملغم (٠.١٣١ ملي مول) من القاعدة الطلقة و٠.٥ مل من الماء إلى قارورة سعتها ٨ مل. وأضيف إلى القارورة ١ مكافئ (٠.١٣١ ملي مول) من الحمض المناسب ورجت القارورة عند درجة حرارة الجو المحيط لمدة تراوحت من ١٤-١٦ ساعة. وبعد هذه الفترة الزمنية عوينت القوارير بصرياً. وإذا لوحظ تشكل محلول متجانس، تنهى التجربة، ويمكن استنتاج أن للملح المتشكل ذائبية تزيد عن ١٠٠ ملغم/مل.

وإذا بقيت مادة صلبة، يضاف مقدار إضافي من الماء يبلغ ٠.٥ مل وترج القارورة لمدة ٦ ساعات. وإذا تشكل محلول متجانس في هذه المرحلة، يمكن استنتاج أن للملح ذائبية تزيد عن ٥٠ ملغم/مل.

وإذا بقيت مادة صلبة عند هذه الحالة، يضاف مقدار إضافي من الماء يبلغ ١ مل وترج القارورة عند درجة حرارة الجو المحيط. وإذا نتج عن هذا محلول متجانس، فإنه يمكن استنتاج أن الذائبية كانت أكبر من ٢٥ ملغم/مل. وإذا بقيت مادة صلبة أيضاً، يمكن استنتاج أن ذائبية الملح أقل من ٢٥ ملغم/مل.

وتظهر الأشكال الملحية وفقاً للاختراع ميزة واحدة أو أكثر من المزايا التالية التي تتفوق على مزايا القاعدة الطلقة:

- تكون أكثر ذائبية وبالتالي تكون أفضل للإعطاء في الوريد (مثلاً بواسطة التسريب)
- لها ثبات أفضل (مثلاً عمر تخزين shelf life محسن)؛
- لها ثبات حراري أفضل؛
- تكون أقل قاعدية وبذلك تكون أفضل للإعطاء في الوريد؛
- لها مزايا إنتاجية؛
- لها ذائبية محسنة في محلول مائي؛
- لها خواص كيميائية فيزيائية physicochemical properties أفضل؛
- قد يكون لها فعالية محسنة مضادة للسرطان؛ و
- قد يكون لها دليل علاجي محسن.

المكافئات

تقدم الأمثلة السابقة لغرض توضيح الاختراع ولا ينبغي أن تفسر على أنها تفرض أي تحديد على نطاق الاختراع. ويتضح بسهولة أنه يمكن إجراء تعديلات وتغييرات متعددة على التجسيدات الخاصة وفقاً للاختراع الموصوفة أعلاه والموضحة في الأمثلة دون الخروج عن المبادئ التي يقوم عليها الاختراع. ويقصد أن يتضمن هذا الطلب كل هذه التعديلات والتغييرات.

عناصر الحماية

١- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، بحيث يتم تشكيل هذا الملح مع حمض يختار من حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid وحمض أسيتيك acetic acid ومخاليط mixtures منهما.

٢- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لعنصر الحماية ١ حيث يتم تشكيله مع حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid.

٣- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لعنصر الحماية ١ حيث يتم تشكيله مع حمض أسيتيك acetic acid.

٤- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة حيث يكون بلورياً crystalline.

٥- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لعنصر الحماية ٢ حيث يكون بلورياً crystalline ويكون له ما يلي:

(أ) بنية بلورية crystal structure كما هو مبين في الشكلين ١ و٢؛ و/أو

(ب) بنية بلورية crystal structure كما عرفت بواسطة الإحداثيات coordinates المبينة في المثال ٢ في هذا البيان؛ و/أو

(جـ) وسائط للشبكة البلورية crystal lattice parameters عند ٩٣ كلفن Kelvin تتمثل في a= ٨.٩٠(١٠)، b= ١٢.٤٤(١٠)، c= ٣٨.٤٩(٤) وحدة انغستروم Angstrom unit، حيث $\alpha=\beta=\gamma=90°$؛ و/أو

(د) بنية بلورية crystal structure تنتمي إلى مجموعة فراغية معينية orthorhombic

space group مثل Pbca (رقم ٦١).

٦- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، بحيث يكون هذا الملح غير ملح الهيدروكلوريد hydrochloride salt.

٧- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لعنصر الحماية ٦ حيث يكون عبارة عن ملح يتم تشكيله مع حمض acid يختار من الفئة التي تتكون من أحماض أسيتيك acetic، أديبيك adipic، ألجينيك alginic، أسكوربيك ascorbic (مثلاً L-أسكوربيك L-ascorbic)، أسبارتيك aspartic (مثلاً L-أسبارتيك L-aspartic)، بنزين كبريتونيك benzenesulphonic، بنزويك benzoic، كافوريك camphoric (مثلاً (+) كافوريك camphoric (+))، كبريك capric، كبريليك caprylic، كربونيك carbonic، ستريك citric، سيكلاميك cyclamic، دوديسانوات dodecanoate، دوديسيل كبريتوريك dodecylsulphuric، إيثان-١، ٢-ثنائي كبريتونيك ethane-1,2-disulphonic، إيثان كبريتونيك ethanesulphonic، فوماريك fumaric، غالاكتاريك galactaric، جنتيسيك gentisic، غلوكوهبتونيك glucoheptonic، D-غلوكونيك D-gluconic، غلوكورونيك glucuronic (مثلاً D-غلوكورونيك D-glucuronic)، غلوتاميك glutamic (مثلاً L-غلوتاميك L-glutamic)، ألفا-أكسوغلوتاريك α-oxoglutaric، غليكوليك glycolic، هيبوريك hippuric، إيزثيونيك isethionic، أيزوبيوتيريك isobutyric، لاكتيك lactic (مثلاً (+)-L-لاكتيك (+)-L-lactic و(±)-LD-لاكتيك (±)-DL-lactic)، لاكتوبيونيك lactobionic، لوريل كبريتونيك laurylsulphonic، ماليك maleic، مالي malic، (-)-L-ماليك (-)-L-malic، مالونيك malonic، ميثان كبريتونيك methanesulphonic، ميوسيك mucic، نفثالين كبريتونيك naphthalenesulphonic (مثلاً نفثالين-٢-كبريتونيك naphthalene-2-sulphonic)، نفثالين-١، ٥-ثنائي كبريتونيك naphthalene-1,5-disulphonic، نيكوتينيك nicotinic، أوليك oleic، أوروتيك orotic، أوكساليك oxalic، بالميتيك palmitic، باموبك pamoic، فوسفوريك phosphoric، بروبيونيك

propionic، سباسيك sebacic، ستياريك stearic، سكسينيك succinic، كبريتوريك
sulphuric، طرطريك tartaric (مثلاً (+)-L-طرطريك (+)-L-tartaric)، ثيوسيانيك
thiocyanic، تولوين كبريتونيك toluenesulphonic (مثلاً بارا-تولوين كبريتونيك p-
toluenesulphonic)، فاليريك valeric وزينافويك xinafoic.

١ ٨- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لعنصر الحماية ٦ أو ٧ حيث يكون
٢ بلورياً crystalline.

١ ٩- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لأي من عناصر الحماية من ١ إلى ٧
٢ حيث يكون غير بلوري amorphous.

١ ١٠- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة حيث
٢ يكون لامائياً anhydrous.

١ ١١- ملح لحمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt من بيبريدينيل (٤) أميد
٢ لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-
٣ dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide يكون
٤ بلورياً crystalline بصفة جوهرية وله نمط حيود للأشعة السينية للمسحوق X-ray
٥ powder diffraction pattern يتميز بوجود ذروات رئيسية major peaks عند زوايا الحيود
٦ diffraction angles (θ٢) والمسافات الفاصلة بين المستويات interplanar spacings (d)
٧ المبينة في الجدول أ، واختيارياً الجدول ب على سبيل المثال حيث يتميز نمط حيود
٨ الأشعة السينية للمسحوق بوجود ذروات رئيسية عند زوايا الحيود (θ٢)، المسافات
٩ الفاصلة بين المستويات (d) والشدات intensities المبينة في الجدول جـ في هذا البيان.

١٢- ملح لحمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide حيث يكون بلورياً crystalline بصفة جوهرية وفقاً لعنصر الحماية ١١ ويكون له ذروات peaks عند زوايا حيود diffraction angles مماثلة لتلك في نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق X-ray powder diffraction pattern المبين في الشكل ٣، ومن المفضل أن يكون لهذه الذروات شدة نسبية relative intensity مماثلة لتلك للذروات المبينة في الشكل ٣.

١٣- ملح لحمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide حيث يكون بلورياً crystalline بصفة جوهرية وفقاً لعنصر الحماية ١٢ ويكون له نمط حيود للأشعة السينية للمسحوق X-ray powder diffraction pattern مماثل جوهرياً لذلك المبين في الشكل ٣.

١٤- ملح لحمض أسيتيك acetic acid salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide حيث يكون بلورياً crystalline بصفة جوهرية ويكون له نمط حيود للأشعة السينية للمسحوق X-ray powder diffraction pattern يتميز بوجود ذروات عند زوايا حيود diffraction angles مماثلة لتلك في نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق X-ray powder diffraction pattern المبين في الشكل ٤.

١٥- ملح لحمض أسيتيك acetic acid salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-

١٣ 1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide حيث يكون بلورياً crystalline
١٤ بصفة جوهرية وفقاً لعنصر الحماية ١٤ ويكون للذروات شدة نسبية relative intensity
١٥ مماثلة لتلك للذروات المبينة في الشكل ٤.

١ ١٦- ملح لحمض أسيتيك acetic acid salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي
٢ كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-
٣ 1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide حيث يكون بلورياً crystalline
٤ بصفة جوهرية وفقاً لعنصر الحماية ١٥ ويكون له نمط حيود للأشعة السينية للمسحوق
٥ X-ray powder diffraction pattern مماثل جوهرياً لذلك المبين في الشكل ٤.
٦

١ ١٧- ملح مسيلات mesylate salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-
٢ بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-
٣ pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة
٤ يكون لامائياً anhydrous ويظهر ذروة ماصة للحرارة endothermic peak عند درجات
٥ حرارة تتراوح من ٣٧٩ إلى ٣٨٠°م (درجة مئوية)، مثلاً ٣٧٩.٨°م عند إخضاعه لقياس
٦ الحرارة بالمسح التفاضلي differential scanning calorimetry (DSC).

١ ١٨- ملح لحمض أسيتيك acetic acid لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-
٢ بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-
٣ pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة
٤ يكون لامائياً anhydrous ويظهر ذروات طاردة للحرارة exothermic peaks عند درجات
٥ حرارة تتراوح من ٢٣١ إلى ٢٣٢°م (مثلاً ٢٣١.٥°م) ودرجات حرارة تتراوح من ٢٩٢
٦ إلى ٢٩٣°م (مثلاً ٢٩٢.٨٨°م) عند إخضاعه لـ DSC.

١ ١٩- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt يكون بلورياً crystalline بصفة جوهرية (مثلاً

ملح مسيلات mesylate أو أسيتات acetate كما عرِّف وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة) من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide يشتمل على شكل بلوري واحد single crystalline form من الملح الناتج بإضافة الحمض acid addition salt وما لا يزيد عن ٥% وزناً by weight من أشكال بلورية أخرى من الملح الناتج بإضافة الحمض acid addition salt.

٢٠- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt يكون بلورياً crystalline بصفة جوهرية حيث يرافق الشكل البلوري المفرد single crystalline form أشكال بلورية أخرى بنسبة تقل عن ٤% أو تقل عن ٣% أو تقل عن ٢%، وبالأخص يشتمل على أشكال بلورية أخرى بنسبة لا تزيد عن حوالي ١% وزناً.

٢١- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة حيث يكون بلورياً crystalline بصفة جوهرية وحيث تكون بلورات الأملاح الناتجة بإضافة الأحماض acid addition salts (مثلاً أملاح ميثان-كبريتونات methane-sulphonate أو أسيتات acetate) من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide عبارة عن بلورات تحتوي على مذيب متبقٍ residual solvent (مثلاً ماء أو مذيب عضوي organic solvent) بنسبة تقل عن ١٠% وزناً، على سبيل المثال بنسبة تقل عن ٥%، مثلاً تقل عن ٤% أو تقل عن ٣% أو تقل عن ٢% أو تقل عن ١% أو تقل عن ٠.٥%.

٢٢- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لعنصر الحماية ٢١ حيث يرافق الشكل البلوري المفرد single crystalline form أشكال بلورية أخرى بنسبة تقل عن ٠.٩% أو تقل عن ٠.٨% أو تقل عن ٠.٧% أو تقل عن ٠.٦% أو تقل عن ٠.٥% أو تقل

عن ٠.٤% أو تقل عن ٠.٣% أو تقل عن ٠.٢% أو تقل عن ٠.١% أو تقل عن ٠.٠٥% أو تقل عن ٠.٠١% وزناً، على سبيل المثال صفر% وزناً.

٢٣- ملح لحمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة حيث يكون له طيف للأشعة تحت الحمراء infra-red spectrum، عند تحليله باستخدام طريقة قرص KBr KBr disc method يشتمل على الذروات peaks المميزة عند ٣٢٣٣، ٣٠٠٢، ٢٨٢٩، ١٦٧٩، ١٦٣٢، ١٥٦٠، ١٤٣٠، ١١٩٨، ١٠٣٧، ٩٠٩ و٧٨٤ سم$^{-١}$، حيث من المفضل أن يكون الملح بلورياً crystalline بصفة جوهرية.

٢٤- ملح لحمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid salt من ملح مسيلات mesylate salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة حيث يكون بلورياً crystalline ويتميز بوسيط parameter واحد أو أكثر (في أية توليفة) من الوسائط التالية أو بجميعها، وبالتحديد يكون للملح ما يلي:

(أ) بنية بلورية crystal structure كما هو مبين في الشكلين ١ و٢؛ و/أو

(ب) بنية بلورية crystal structure كما عرفت بواسطة الإحداثيات coordinates المبينة في المثال ٢ في هذا البيان؛ و/أو

(جـ) وسائط للشبكة البلورية crystal lattice parameters عند ٩٣ كلفن Kelvin تتمثل في a= ٨.٩٠(١٠)، b= ١٢.٤٤(١٠)، c= ٣٨.٤٩(٤) وحدة انغستروم Angstrom unit، حيث $\alpha=\beta=\gamma=90°$؛ و/أو

(د) بنية بلورية crystal structure تنتمي إلى مجموعة فراغية معينية orthorhombic space group مثل Pbca (رقم ٦١)؛ و/أو

(هـ) نمط حيود أشعة سينية للمسحوق X -ray powder diffraction pattern يتميز بوجود ذروات رئيسية major peaks عند زوايا الحيود diffraction angles (θ٢) والمسافات الفاصلة بين المستويات interplanar spacings (d) المبينة في الجدول أ، واختيارياً الجدول ب، فعلى سبيل المثال حيث يتميز نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق X-ray powder diffraction pattern بوجود ذروات رئيسية عند زوايا الحيود (θ٢)، المسافات الفاصلة بين المستويات (d) والشدات intensities المبينة في الجدول جـ في هذا البيان؛ و/أو

(و) ذروات peaks عند زوايا حيود مماثلة لتلك في نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق X-ray powder diffraction pattern المبين في الشكل ٣ واختيارياً حيث يكون للذروات peaks شدة نسبية relative intensity مماثلة لتلك للذروات peaks المبينة في الشكل ٣؛ و/أو

(ز) نمط حيود الأشعة السينية للمسحوق X-ray powder diffraction pattern كما هو مبين في الشكل ٣ جوهرياً؛ و/أو

(ح) حالة لامائية anhydrous وذروة ماصة للحرارة endothermic peak عند درجات حرارة تتراوح من ٣٧٩ إلى ٣٨٠°م، مثلاً ٣٧٩.٨°م عند إخضاعه لـ DSC؛ و/أو

(ط) طيف أشعة تحت الحمراء infra-red spectrum، عند تحليله باستخدام طريقة قرص KBr disc method KBr، يشتمل على ذروات peaks مميزة عند ٣٢٣٣، ٣٠٠٢، ٢٨٢٩، ١٦٧٩، ١٦٣٢، ١٥٦٠، ١٤٣٠، ١١٩٨، ١٠٣٧، ٩٠٩ و٧٨٤ سم$^{-1}$.

٢٥- طريقة لتحضير ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية السابقة، حيث تتضمن الطريقة تشكيل محلول من قاعدة حرة free base لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل

أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide في مذيب solvent (وعادة مذيب عضوي organic solvent) أو مزيج من مذيبات، ومعالجة المحلول بحمض acid لتكوين راسب precipitate من الملح الناتج بإضافة الحمض acid addition salt.

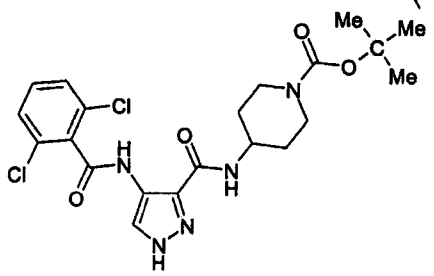
٢٦- طريقة وفقاً لعنصر الحماية ٢٠ حيث يكون الملح الناتج بإضافة الحمض acid addition salt كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٥.

٢٧- طريقة لتحضير ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، حيث تتضمن الطريقة إذابة قاعدة حرة free base لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide في مذيب solvent يشتمل على حمض متطاير volatile acid واختيارياً مذيب إسهامي co-solvent، لتشكيل محلول من الملح الناتج بإضافة الحمض acid addition salt مع الحمض المتطاير volatile acid، ثم زيادة تركيز المحلول أو تبخيره من أجل فصل الملح concentrating.

٢٨- طريقة وفقاً لعنصر الحماية ٢٧ حيث يتم تشكيل الملح الناتج بإضافة الحمض acid addition salt مع حمض أسيتيك acetic acid.

٢٩- طريقة لتشكيل ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عُرِّف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، حيث تتضمن الطريقة معالجة

مركب بالصيغة (X):



(X)

مع حمض عضوي أو غير عضوي، غير حمض الهيدروكلوريك hydrochloric acid، في مذيب عضوي لإزالة المجموعة ثث-بيوتيلوكسي كربونيل tert-butyloxycarbonyl وتشكيل ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide مع الحمض العضوي أو غير العضوي، وبشكل اختياري يتم بعد ذلك فصل الملح الناتج بإضافة الحمض acid addition salt الذي تم تشكيله بهذه الكيفية، واختيارياً إعادة تبلور recrystallising هذا الملح لإنتاج شكل بلوري crystalline form، مثلاً شكل بلوري من ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt كما عرف في أي من عناصر الحماية السابقة.

٣٠- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt وفقاً لأي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ حيث يكون له ذائبية solubility في الماء تزيد عن ١٥ ملغم/مل mg/ml، وعادة تزيد عن ٢٠ ملغم/مل، ويفضل أن تزيد عن ٢٥ ملغم/مل، والأفضل أن تزيد عن ٣٠ ملغم/مل.

٣١- تركيب صيدلي pharmaceutical composition يشتمل على محلول مائي aqueous solution يحتوي على ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt لبيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide، كما

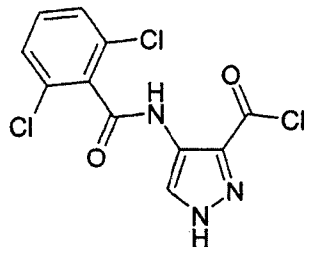
عرِّف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، بتركيز concentration يزيد عن ١٥ ملغم/مل mg/ml، وعادة يزيد عن ٢٠ ملغم/مل، ويفضل أن يزيد عن ٢٥ ملغم/مل، والأفضل أن يزيد عن ٣٠ ملغم/مل.

٣٢- محلول مائي aqueous solution من ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamid وفقاً لأي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، حيث يكون للمحلول المائي درجة حموضة pH تتراوح من ٢ إلى ١٢ مثلاً من ٢ إلى ٩ وبالأخص من ٤ إلى ٧.

٣٣- محلول مائي aqueous solution وفقاً لعنصر الحماية ٣٢ حيث يكون منظم درجة الحموضة buffered.

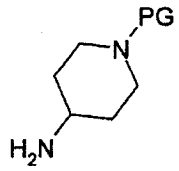
٣٤- محلول مائي aqueous solution وفقاً لعنصر الحماية ٣٣ حيث يكون الملح الناتج بإضافة الحمض acid addition salt عبارة عن ملح متشكل مع حمض ميثان كبريتونيك methanesulphonic acid، ويكون المحلول المنظم لدرجة الحموضة buffer هو عبارة عن محلول منظم يتكون من حمض الأسيتيك acetic acid وأسيتات الصوديوم sodium acetate، على سبيل المثال عند درجة حموضة للمحلول تبلغ حوالي ٤.٦.

٣٥- عملية لتحضير بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح منه، حيث تتضمن هذه العملية مفاعلة المركب بالصيغة (XI):



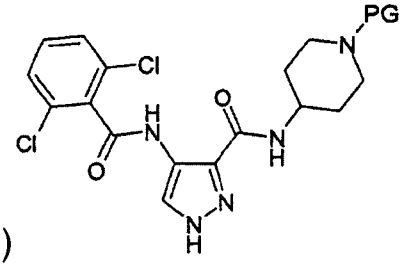
(XI)

مع مركب بالصيغة (XII):



(XII)

حيث يمثل PG مجموعة واقية للأمين amine-protecting group، في مذيب عضوي في وجود قاعدة غير دخيلة non-interfering base مثل ثلاثي إثيل أمين triethylamine لإنتاج مركب بالصيغة (XIII):



(XIII)

ثم إزالة المجموعة الواقية PG لإنتاج بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح منه؛ واختياريا إعادة تبلور recrystallising الملح المتشكل بهذه الكيفية لإنتاج شكل بلوري مثلاً شكل بلوري من ملح ناتج بإضافة حمض كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤.

٣٦- عملية وفقاً لعنصر الحماية ٣١ حيث تكون المجموعة الواقية PG عبارة عن ثث-

بيوتيلوكسي كربونيل tert-butyloxycarbonyl ويتم إزالتها بواسطة حمض acid.

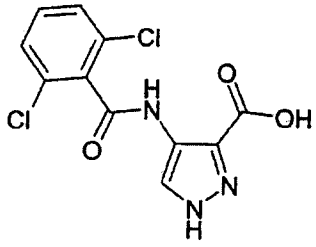
٣٧- عملية وفقاً لعنصر الحماية ٣٦ حيث يكون الحمض acid عبارة عن حمض acid كما عرف في أي من عناصر الحماية ١، ٢، ٣، ٦ و٧.

٣٨- طريقة لتحضير مركب كيميائي وسيط chemical intermediate بالصيغة (XIII) عن طريق مفاعلة المركب بالصيغة (XI) مع المركب بالصيغة (XII) كما عرف في عنصر الحماية ٣٥.

٣٩- مركب كيميائي وسيط chemical intermediate وجديد بالصيغة (XI) كما عرف في عنصر الحماية ٣٥.

٤٠- عملية لتحضير بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح منه، حيث تتضمن العملية:

(أ) معالجة مركب بالصيغة (XIV):



(XIV)

مع كلوريد ثيونيل thionyl chloride في مذيب عضوي لابروتوني non-protic organic solvent، واختيارياً مع التسخين؛

(ii) مفاعلة المنتج من الخطوة (i) مع مركب بالصيغة (XII) في وجود قاعدة غير دخيلة مثل ثلاثي إثيل أمين triethylamine اختيارياً مع التسخين، لإنتاج مركب بالصيغة (XIII)؛ و

(iii) إزالة المجموعة الواقية PG عن المركب بالصيغة (XIII) لإنتاج بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح منه؛ واختيارياً

(iv) إعادة تبلور الملح لإنتاج شكل بلوري، مثلاً شكل بلوري كما عرِّف في أي من عناصر الحماية السابقة.

٤١- عملية وفقاً لعنصر الحماية ٤٠ حيث في الخطوة (i)، يتم إجراء التفاعل مع كلوريد الثيونيل thionyl chloride مع التسخين، إلى درجة حرارة تتراوح من ٨٠ إلى ١٠٠°م.

٤٢- عملية وفقاً لعنصر الحماية ٤٠ أو ٤١ حيث يكون المذيب الذي تجرى فيه الخطوة (i) عبارة عن مذيب هيدروكربوني عطري aromatic hydrocarbon solvent مثل التولوين toluene.

٤٣- عملية وفقاً لأي من عناصر الحماية من ٤٠ إلى ٤٢ حيث تجرى الخطوة (ii) مع التسخين إلى درجة حرارة تصل مثلاً إلى حوالي ٥٥°م، وعادة إلى ٥٠°م، مثلاً إلى درجة حرارة في المدى من ٤٥ إلى ٥٠°م.

٤٤- عملية وفقاً لأي من عناصر الحماية من ٤٠ إلى ٤٣ حيث يجرى التفاعل في الخطوة (ii) في رباعي هيدروفوران tetrahydrofuran.

٤٥- عملية وفقاً لأي من عناصر الحماية من ٤٠ إلى ٤٤ حيث، في الخطوة (iii)، تكون المجموعة الواقية protecting group عبارة عن مجموعة يمكن إزالتها بالمعالجة مع حمض acid، حيث يختار الحمض لإنتاج ملح مرغوب من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-

benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide.

٤٦- عملية وفقاً لعنصر الحماية ٤٥ حيث تكون المجموعة الواقية PG عبارة عن ثث-بيوتيلوكسي كربونيل tert-butyloxycarbonyl.

٤٧- عملية وفقاً لعنصر الحماية ٤٥ أو ٤٦ حيث يكون الحمض acid عبارة عن حمض acid كما عرف في أي من عناصر الحماية ١، ٢، ٣، ٦ و٧.

٤٨- ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، حيث يستخدم للوقاية prophylaxis أو المعالجة من مرض disease أو حالة مرضية condition يسببها كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3.

٤٩- استخدام ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ من أجل صنع دواء للوقاية prophylaxis أو المعالجة من مرض disease أو حالة مرضية condition يسببها كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3.

٥٠- استخدام ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ من أجل صنع دواء لتخفيف alleviating أو تقليل حدوث مرض disease أو حالة

مرضية condition يسببها كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3،

٥١- استخدام ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ من أجل صنع دواء لمعالجة مرض disease أو حالة مرضية condition تتضمن أو تنشأ من نمو الخلايا بشكل غير سوي abnormal cell growth في ثديي.

٥٢- استخدام ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ من أجل صنع دواء لتخفيف alleviating أو تقليل حدوث مرض disease أو حالة مرضية condition تتضمن أو تنشأ من نمو الخلايا بشكل غير سوي abnormal cell growth في ثديي.

٥٣- استخدام ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ من أجل صنع دواء لمعالجة مرض disease أو حالة مرضية condition تتضمن أو تنشأ من نمو الخلايا بشكل غير سوي abnormal cell growth في ثديي عن طريق إعطاء الثديي الملح المذكور بمقدار فعال لتثبيط نشاط كيناز cdk (مثلاً cdk1 أو cdk2) أو نشاط غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3.

٥٤- استخدام ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ من أجل صنع دواء لتخفيف alleviating أو تقليل حدوث مرض disease أو حالة مرضية condition تتضمن أو تنشأ من نمو الخلايا بشكل غير سوي abnormal cell growth في ثديي عن طريق إعطاء الثديي الملح المذكور بمقدار فعال لتثبيط نشاط كيناز cdk (مثلاً cdk1 أو cdk2) أو نشاط غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3.

٥٥- استخدام ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ من أجل صنع دواء لتثبيط كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3 عن طريق ملامسة الكيناز kinase مع الملح المذكور.

٥٦- استخدام ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1h-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ من أجل صنع دواء لتعديل modulating عملية خلوية cellular process (مثلاً انقسام الخلايا cell division) عن طريق تثبيط نشاط كيناز معتمد على السيكلين cyclin dependent kinase أو غليكوجين سينثاز كيناز-٣ glycogen synthase kinase-3.

٥٧- ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic

acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، حيث يستخدم للوقاية prophylaxis أو المعالجة من مرض disease أو حالة مرضية condition كما وصف في هذا البيان.

٥٨- استخدام ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، في صنع دواء medicament، حيث يكون لهذا الدواء استخدام واحد أو أكثر من الاستخدامات المعرفة في هذا البيان.

٥٩- تركيب صيدلي pharmaceutical composition يشتمل على ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، ومادة حاملة مقبولة صيدلياً pharmaceutically acceptable carrier.

٦٠- ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، حيث يستخدم في الدواء.

٦١- ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، حيث يستخدم في معالجة مرض السرطان.

٦٢- ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-
بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic
acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤،
يستخدم في معالجة أمراض سرطانية تتضمن سرطانة المثانة bladder، الثدي breast،
القولون colon، الكلية kidney، بشرة الجلد epidermis، الكبد liver، الرئة lung، المريء
oesophagus، المرارة gall bladder، المبيض ovary، البنكرياس pancreas، المعدة
stomach، عنق الرحم cervix، الغدة الدرقية thyroid، البروستات prostate، أو الجلد؛
الورم المساعد لتكون الدم hematopoietic tumour من السلالة الليمفوانية lymphoid
lineage؛ الورم المساعد على تكون الدم من السلالة النخاعانية myeloid lineage؛
سرطان جريبي درقي thyroid follicular cancer؛ ورم منشأه من الطبقة الوسطى
mesenchymal origin؛ ورم الجهاز العصبي المركزي أو المحيطي central or peripheral
nervous system؛ الورم الميلانيني melanoma؛ ورم الظهارة النطفية seminoma؛ سرطانة
مسيخة teratocarcinoma؛ سركومة العظام osteosarcoma؛ جفاف الجلد xeroderma
pigmentosum؛ ورم حسكي قرني keratoctanthoma؛ سرطان جريبي درقي thyroid
follicular cancer؛ أو سركومة كابوزي Kaposi's sarcoma.

٦٣- ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-
بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic
acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤،
يستخدم في معالجة مرض سرطاني يختار من سرطان الدم leukemia، سرطان الدم
المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia، ورم خلايا
قشرة المخ الليمفاوية mantle cell lymphoma وورم الخلايا-B الليمفاوية B-cell
lymphoma.

٦٤- ملح من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-
بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic

acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤، يستخدم في معالجة مرض سرطاني يختار من سرطان الثدي breast cancer، سرطان المبيض ovarian cancer، سرطان القولون colon cancer، سرطان البروستات prostate cancer، سرطان المريء oesophageal cancer، السرطان الحرشفي squamous cancer، وسرطانات الرئة غير صغيرة الخلايا non-small cell lung carcmomas.

٦٥- مركب من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح ناتج بإضافة حمض منه (مثلاً ملح هيدروكلوريد hydrochloride salt أو ملح كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤) يستخدم في معالجة ورم الخلايا الليمفاوية B-B-cell lymphoma.

٦٦- مركب من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح ناتج بإضافة حمض منه (مثلاً ملح هيدروكلوريد hydrochloride salt أو ملح كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤) يستخدم في معالجة سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia.

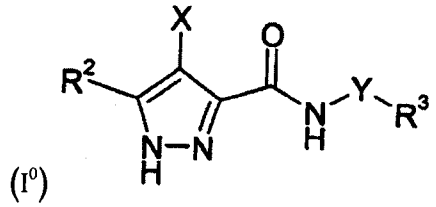
٦٧- مركب من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-H١-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide أو ملح ناتج بإضافة حمض منه (مثلاً ملح هيدروكلوريد hydrochloride salt أو ملح كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤) يستخدم في معالجة ورم الخلايا الليمفاوية B- الكبيرة المنتشر diffuse large B-cell lymphoma.

٦٨- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢،٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ حيث يستخدم في معالجة ورم الخلايا الليمفاوية B-B-cell lymphoma.

٦٩- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢،٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ حيث يستخدم في معالجة سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia.

٧٠- ملح ناتج بإضافة حمض acid addition salt من بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢،٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide كما عرف في أي من عناصر الحماية من ١ إلى ٢٤ حيث يستخدم في معالجة ورم الخلايا الليمفاوية B-الكبيرة المنتشر diffuse large B-cell lymphoma.

٧١- استخدام مركب بالصيغة (I^0):



(I^0)

حيث:

يمثل X مجموعة R^1-A-NR^4- أو حلقة كربونية أو حلقة غير متجانسة بها ٥ أو ٦ أعضاء؛

ويمثل A رابطة، C=O، $NR^g(C=O)$ أو O(C=O) حيث R^g يمثل هيدروجين hydrogen أو هيدروكربيل C_{1-4} hydrocarbyl C_{1-4} يحمل بشكل اختياري بدائل من هيدروكسي hydroxy أو ألكوكسي C_{1-4} alkoxy C_{1-4}؛

ويمثل Y رابطة أو سلسلة ألكيلين alkylene chain يبلغ طولها ذرة واحدة، ذرتين أو ثلاث ذرات كربون carbon؛

ويمثل R^1 هيدروجين hydrogen؛ مجموعة كربونية حلقية أو مجموعة حلقية غير متجانسة بها من ٣ إلى ١٢ عضو في الحلقة؛ أو مجموعة هيدروكربيل C_{1-8} C_{1-8} hydrocarbyl تحمل بشكل اختياري بديلاً واحداً أو أكثر من البدائل المختارة من هالوجين halogen (مثل الفلور fluorine)، هيدروكسي hydroxy، هيدروكربيلوكسي C_{1-4} C_{1-4} hydrocarbyloxy، أمينو amino، أحادي أو ثنائي هيدروكربيل أمينو mono- or C_{1-4} di-C_{1-4} hydrocarbylamino، ومجموعات كربونية حلقية أو مجموعات حلقية غير متجانسة بها من ٣ إلى ١٢ عضو في الحلقة، وحيث يمكن الاستعاضة عن ذرة أو ذرتي كربون carbon لمجموعة الهيدروكربيل بشكل اختياري بذرة أو مجموعة تختار من O، S، NH، SO، SO_2؛

ويمثل R^2 هيدروجين hydrogen؛ هالوجين halogen؛ ألكوكسي C_{1-4} alkoxy C_{1-4} (مثل مثوكسي methoxy)؛ أو مجموعة هيدروكربيل C_{1-4} hydrocarbyl C_{1-4} تحمل بشكل اختياري بدائل من هالوجين halogen (مثل الفلور fluorine)، هيدروكسيل hydroxyl أو ألكوكسي C_{1-4} alkoxy C_{1-4} (مثل مثوكسي)؛

ويختار R^3 من هيدروجين hydrogen ومجموعات كروبونية حلقية أو مجموعات حلقية غير متجانسة بها من ٣ إلى ١٢ عضو في الحلقة؛

ويمثل R^4 هيدروجين hydrogen أو مجموعة هيدروكربيل C_{1-4} hydrocarbyl C_{1-4} تحمل بشكل اختياري بدائل من هالوجين halogen (مثل الفلور fluorine)، هيدروكسيل hydroxyl أو ألكوكسي C_{1-4} alkoxy C_{1-4} (مثل مثوكسي)

من أجل صنع دواء لمعالجة ورم الخلايا الليمفاوية B-cell lymphoma–B، سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia وورم الخلايا الليمفاوية–B الكبيرة المنتشر diffuse large B-cell lymphoma.

٧٢- استخدام مركب بالصيغة (I^0) كما عرِّف في عنصر الحماية ٧١ لصنعة دواء لمعالجة ورم الخلايا الليمفاوية-B B-cell lymphoma، ورم الخلايا الليمفاوية-B الكبيرة المنتشر diffuse large B-cell lymphoma أو سرطان الدم المزمن الذي يصيب الخلايا الليمفاوية chronic lymphocytic leukaemia.

٧٣- استخدام وفقاً لعنصر الحماية ٦٦ أو ٧٢ حيث يكون المركب بالصيغة (I^0) عبارة عن بيبريدينيل (٤) أميد لحمض ٤-(٢، ٦-ثنائي كلورو-بنزويل أمينو)-١H-بيرازول-٣-كربوكسيليك 4-(2,6-dichloro-benzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid piperidin-4-ylamide وأملاحه (مثلاً أملاح ناتجة بإضافة أحماض acid addition salts منه)، ذوابات solvates، زمراء تناوبية tautomers أو أكاسيد نتروجينية N-oxides منه.

٧٤- استخدام أو طريقة وفقاً لعنصر الحماية ٧٣ حيث يكون الملح عبارة عن ملح هيدروكلوريد hydrochloride salt.