



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0030739

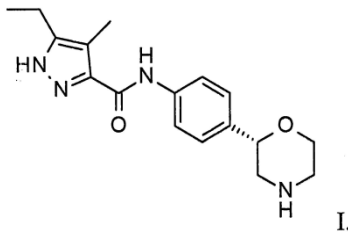
(51)⁷ C07D 413/12; A61K 31/4245; A61P
25/00

(13) B

-
- (21) 1-2018-04072 (22) 14/03/2017
(86) PCT/EP2017/055885 14/03/2017 (87) WO 2017/157873 21/09/2017
(30) 16160790.8 17/03/2016 EP
(45) 25/01/2022 406 (43) 25/04/2019 373A
(73) F.Hoffmann-La Roche AG (CH)
Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland
(72) GALLEY, Guido (DE); HOENER, Marius (CH); NORCROSS, Roger (GB);
PFLIEGER, Philippe (FR).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) HỢP CHẤT 5-ETYL-4-METYL-PYRAZOL-3-CARBOXAMIT CÓ TÁC DỤNG
LÀM CHẤT CHỦ VẬN THỤ THỂ LIÊN QUAN ĐẾN AMIN VẾT (TAAR), QUY
TRÌNH ĐIỀU CHẾ HỢP CHẤT NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

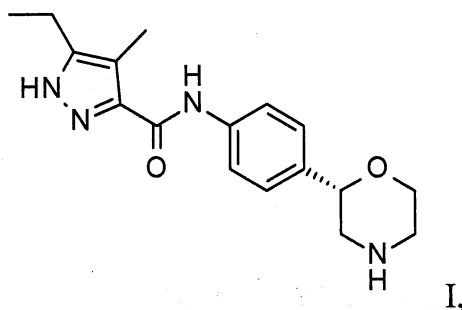
(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức:



và muối cộng axit có hoạt tính dược lý của nó có ái lực mạnh đối với các thụ thể liên quan đến amin vết (các TAAR), đặc biệt là đối với TAAR1, để điều trị các bệnh CNS. Sáng chế còn đề cập đến quy trình điều chế hợp chất này và dược phẩm chứa nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức:



và muối cộng axit có hoạt tính dược lý của nó.

Hợp chất được đề cập trong bản mô tả và có công thức I ở trên có thể thể hiện hiện tượng tautome. Dự định rằng sáng chế bao gồm dạng tautome bất kỳ của hợp chất này, hoặc các hỗn hợp của dạng này, và không bị giới hạn ở bất kỳ dạng tautome nào được mô tả trong công thức ở trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bây giờ đã phát hiện ra rằng hợp chất có công thức I (5-ethyl-4-metyl-N-[4-[(2S)morpholin-2-yl]phenyl]-1H-pyrazol-3-carboxamit) có ái lực mạnh đối với thụ thể liên quan đến amin vết (các TAAR), đặc biệt là đối với TAAR1, và ít có tác dụng phụ hơn so với các hợp chất đã biết trong lĩnh vực.

Các phối tử tương tự của TAAR1 ở chuột nhắt và TAAR1 ở chuột cống đã được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2011/076678, WO2015/165835, WO2016/016292 và WO2012/16826.

Hợp chất có công thức I và các muối cộng có hoạt tính dược lý của nó có các đặc tính dược lý có giá trị. Đặc biệt là, đã phát hiện ra rằng hợp chất của sáng chế là chất chủ vận một phần của thụ thể có liên quan đến amin vết ở người 1 (hTAAR1).

Hợp chất của sáng chế có ưu điểm đáng kể so với các hợp chất đã biết trong lĩnh vực, những ưu điểm này là

- hoạt tính chủ vận hiệu nghiệm của thụ thể TAAR1 ở người,

- độ chọn lọc kháng chất vận chuyển dopamin (DAT),
- độ chọn lọc kháng kênh ion hERG,
- vector lưỡng tính thấp và nhờ đó có nguy cơ thấp gây ra chứng loạn dưỡng phospholipit do được chất gây ra (drug-induced phospholipidosis-DIPL) (*vide infra*).

Do đó, hợp chất có công thức I có thể được dùng làm thuốc an toàn để điều trị bệnh trầm cảm, rối loạn lo âu, rối loạn lưỡng cực, rối loạn tăng động giảm chú ý (ADHD), rối loạn liên quan đến căng thẳng, các rối loạn tâm thần như bệnh tâm thần phân liệt, các bệnh tâm thần như bệnh Parkinson, các rối loạn thoái hóa thần kinh như bệnh Alzheimer, bệnh động kinh, chứng nhức nửa đầu, chứng tăng huyết áp, chứng nghiện, nghiện chất và các rối loạn chuyển hóa như rối loạn ăn uống, bệnh tiểu đường, các biến chứng của bệnh tiểu đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, rối loạn tiêu thụ và đồng hóa năng lượng, các rối loạn và trục trặc cân bằng nội mô của nhiệt độ cơ thể, các rối loạn giấc ngủ và nhịp tim, và các rối loạn tim mạch.

Các amin có nguồn gốc sinh vật cổ điển (serotonin, norepinephrin, epinephrin, dopamin, histamin) đóng vai trò quan trọng làm chất dẫn truyền thần kinh trong hệ thần kinh trung ương hoặc ngoại vi [1]. Việc tổng hợp và bảo quản chúng, cũng như quá trình phân rã và tái hấp thu chúng sau khi giải phóng được kiểm soát một cách chặt chẽ. Sự mất cân bằng trong các mức amin có nguồn gốc sinh vật được biết là nguyên nhân dẫn đến sự thay đổi của chức năng não trong các tình trạng bệnh lý^[2-5]. Nhóm hợp chất amin nội sinh thứ hai, còn được gọi là amin vết (các TA) phần lớn giống với nhóm amin có nguồn gốc sinh vật cổ điển về mặt cấu trúc, cơ chế chuyển hóa và nằm ở vị trí dưới mức tế bào. Các TA bao gồm p-tyramin, β -phenyletylamin, tryptamin và octopamin, và chúng có mặt trong hệ thần kinh của động vật có vú thường ở mức thấp hơn so với các amin có nguồn gốc sinh vật cổ điển^[6].

Việc rối loạn điều tiết của các TA nêu trên liên quan đến nhiều bệnh tâm thần khác nhau như bệnh tâm thần phân liệt và bệnh trầm cảm^[7] và các tình trạng bệnh lý khác như rối loạn tăng động giảm chú ý, chứng nhức nửa đầu, bệnh Parkinson, nghiện chất và rối loạn ăn uống^[8,9].

Trong một thời gian dài, các thụ thể đặc hiệu TA chỉ được xác định dựa vào các vị trí liên kết TA có ái lực mạnh về phương diện giải phẫu chúng nằm rải rác trong CNS của người và các động vật có vú khác^[10,11]. Do vậy, hoạt tính dược lý của các TA được

cho là được điều chỉnh thông qua cơ chế đã được biết rõ của các amin có nguồn gốc sinh vật cổ điển, bằng cách khởi động quá trình giải phóng chúng, ức chế sự tái hấp thu chúng hoặc bằng cách “phản ứng chéo” với các hệ thống thụ thể của chúng^[9,12,13]. Quan điểm này đã thay đổi một cách đáng kể khi xác định được một số thành phần thuộc họ GPCR mới, họ thụ thể liên quan đến amin vết (các TAAR)^[7,14]. Có 9 gen TAAR ở người (bao gồm 3 gen giả) và 16 gen ở chuột (bao gồm 1 gen giả). Các gen TAAR không chứa các intron (với một ngoại lệ, TAAR2 chứa 1 intron) và nằm sát nhau trên cùng một đoạn nhiễm sắc thể. Mỗi quan hệ phát sinh chủng loại của các gen thụ thể này, phù hợp với kết quả so sánh tính tương đồng về hoạt tính được lý chuyên sâu của GPCR và các số liệu được lý đã cho thấy các thụ thể này tạo ra ba họ phụ khác biệt^[7,14]. TAAR1 nằm trong phân nhóm đầu tiên gồm bốn gen (TAAR1-4) được bảo tồn với mức cao giữa người và các loài gặm nhấm. Các TA hoạt hóa TAAR1 thông qua G_{αs}. Việc rối loạn điều hòa của các TA được chỉ ra là góp phần gây ra các bệnh khác nhau như bệnh trầm cảm, rối loạn lo âu, rối loạn lưỡng cực, rối loạn tăng động giảm chú ý (ADHD), rối loạn liên quan đến căng thẳng, các rối loạn tâm thần như bệnh tâm thần phân liệt, các bệnh tâm thần như bệnh Parkinson, các rối loạn thoái hóa thần kinh như bệnh Alzheimer, bệnh động kinh, chứng nhức nửa đầu, chứng tăng huyết áp, chứng nghiện, nghiện chất và các rối loạn chuyển hóa như rối loạn ăn uống, bệnh tiểu đường, các biến chứng của bệnh tiểu đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, rối loạn tiêu thụ và đồng hóa năng lượng, các rối loạn và trục trặc cân bằng nội mô của nhiệt độ cơ thể, các rối loạn giấc ngủ và nhịp tim, và các rối loạn tim mạch.

Do đó, việc làm tăng sự hiểu biết đối với các thụ thể liên quan đến amin vết đang nhận được sự quan tâm rất lớn.

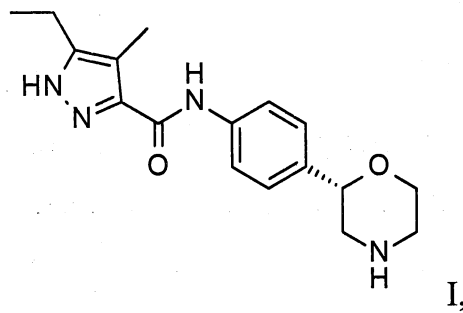
Các tài liệu tham khảo được sử dụng:

- [1] Deutch, A.Y. and Roth, R.H.; “Neurotransmitters.” In *Fundamental Neuroscience* (2nd Edn) (Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L, and Squire, L.R., Eds.), pp. 193-234, Academic Press (1999);
- [2] Wong, M.L. and Licinio, J.; “Research and treatment approaches to depression.” *Nat. Rev. Neurosci.* 2001, 2, 343-351;
- [3] Carlsson, A. *et al.*; “Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence.” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001, 41, 237-260;

- [4] Tuite, P. and Riss, J.; "Recent developments in the pharmacological treatment of Parkinson's disease." *Expert Opin. Investig. Drugs* 2003, 12, 1335-1352;
- [5] Castellanos, F.X. and Tannock, R.; "Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes." *Nat. Rev. Neurosci.* 2002, 3, 617-628;
- [6] Usdin, Earl; Sandler, Merton; Editors; *Psychopharmacology Series, Vol. 1: Trace Amines and the Brain. [Proceedings of a Study Group at the 14th Annual Meeting of the American College of Neuropsychopharmacology, San Juan, Puerto Rico]* (1976);
- [7] Lindemann, L. and Hoener, M.; "A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family." *Trends in Pharmacol. Sci.* 2005, 26, 274-281;
- [8] Branchek, T.A. and Blackburn, T.P.; "Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact." *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003, 3, 90-97;
- [9] Premont, R.T. *et al.*; "Following the trace of elusive amines." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 9474-9475;
- [10] Mousseau, D.D. and Butterworth, R.F.; "A high-affinity [³H] tryptamine binding site in human brain." *Prog. Brain Res.* 1995, 106, 285-291;
- [11] McCormack, J.K. *et al.*; "Autoradiographic localization of tryptamine binding sites in the rat and dog central nervous system." *J. Neurosci.* 1986, 6, 94-101;
- [12] Dyck, L.E.; "Release of some endogenous trace amines from rat striatal slices in the presence and absence of a monoamine oxidase inhibitor." *Life Sci.* 1989, 44, 1149-1156;
- [13] Parker, E.M. and Cubeddu, L.X.; "Comparative effects of amphetamine, phenylethylamine and related drugs on dopamine efflux, dopamine uptake and mazindol binding." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988, 245, 199-210;
- [14] Lindemann, L. *et al.*; "Trace amine associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors." *Genomics* 2005, 85, 372-385.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất có công thức I:



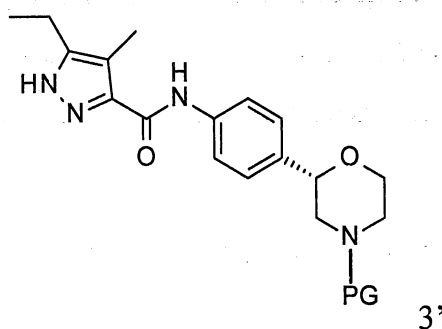
và các muối dược dụng của nó, các hợp chất này được dùng để điều trị các bệnh liên quan đến chức năng sinh học của các thụ thể liên quan đến amin vết, quy trình điều chế các hợp chất này và thuốc chứa hợp chất theo sáng chế dùng để kiểm soát hoặc ngăn ngừa bệnh như bệnh trầm cảm, rối loạn lo âu, rối loạn lưỡng cực, rối loạn tăng động giảm chú ý, rối loạn liên quan đến căng thẳng, rối loạn tâm thần như bệnh tâm thần phân liệt, các bệnh tâm thần như bệnh Parkinson, các rối loạn thoái hóa thần kinh như bệnh Alzheimer, bệnh động kinh, chứng nhức nửa đầu, nghiện chất và các rối loạn chuyển hóa như rối loạn ăn uống, bệnh tiểu đường, biến chứng của bệnh tiểu đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, các rối loạn tiêu thụ và đồng hóa năng lượng, rối loạn và trục trặc cân bằng nội mô của nhiệt độ cơ thể, các rối loạn giấc ngủ và nhịp tim, và các rối loạn tim mạch.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến quy trình điều chế hợp chất này và dược phẩm chứa nó.

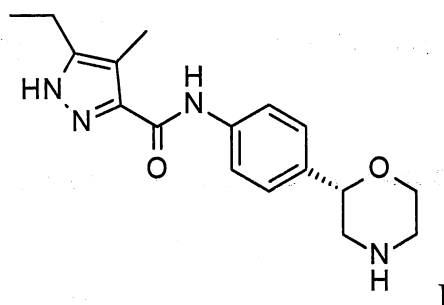
Mô tả chi tiết sáng chế

Hợp chất có công thức I và các muối dược dụng của nó có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, bằng các quy trình được mô tả dưới đây, quy trình này bao gồm bước:

a) tách loại nhóm bảo vệ N (PG) ra khỏi các hợp chất có công thức:



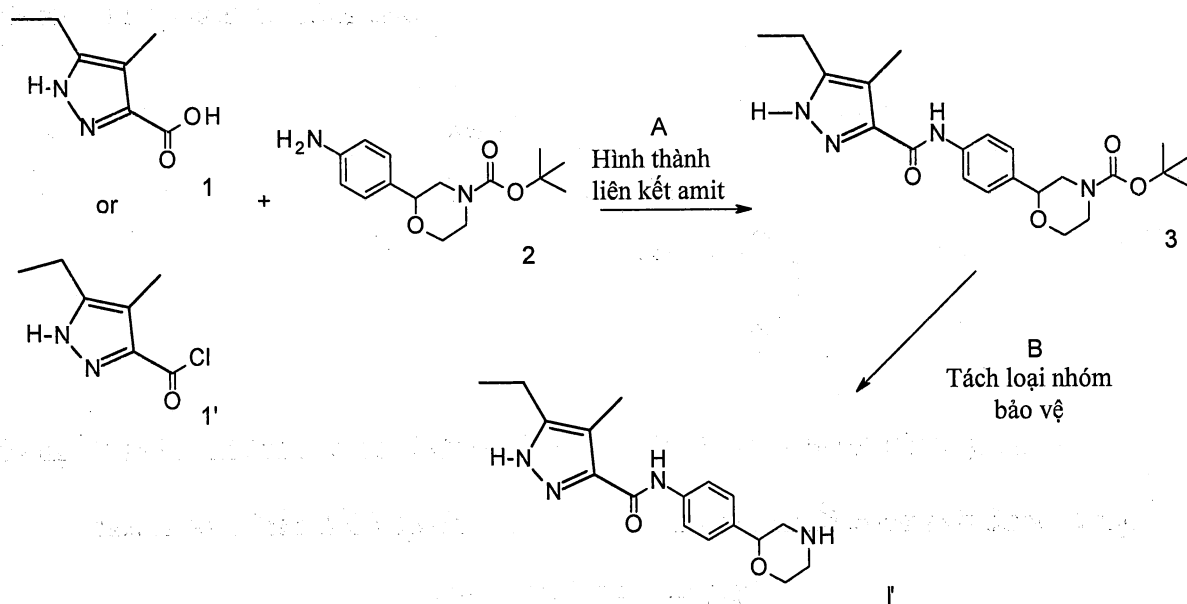
để tạo ra hợp chất có công thức:



trong đó PG là nhóm bảo vệ N được chọn từ $-C(O)O$ -tert-butyl (BOC), và, nếu muốn, biến đổi hợp chất thu được thành các muối cộng axit được dùng.

QUY TRÌNH CHUNG

Sơ đồ 1



Các nguyên liệu ban đầu 1, 1' và 2 mua được bán trên thị trường hoặc có thể được điều chế bằng các phương pháp đã được biết rõ trong giải pháp kỹ thuật. Raxemic tert-butyl 2-(4-aminophenyl)morpholin-4-carboxylat (CAS RN: 1002726-96-6) mua được trên thị trường. tert-Butyl (2R)-2-(4-aminophenyl)morpholin-4-carboxylat (CAS RN: 1260220-42-5) mua được trên thị trường. tert-Butyl (2S)-2-(4-aminophenyl)morpholin-4-carboxylat (CAS RN: 1260220-43-6) mua được trên thị trường, hoặc có thể được điều chế như được mô tả trong tài liệu chuyên ngành, ví dụ như được mô tả trong tài liệu: Trussardi, R. & Iding, H, PCT Int. Appl. WO 2015/086495 A1.

Bước A: Việc hình thành liên kết amit có thể được thực hiện bằng phản ứng liên hợp giữa amin 2 và hợp chất axit carboxylic 1 với sự có mặt của tác nhân phản ứng liên hợp như DCC, EDC, TBTU hoặc HATU với sự có mặt của bazơ hữu cơ như triethylamin, *N,N*-diisopropyletylamin hoặc *N*-metylmorpholin trong các dung môi được halogen hóa như diclometan hoặc 1,2-dicloetan hoặc các dung môi ete như dietyl ete, dioxan, THF, DME hoặc TBME.

Các điều kiện được ưu tiên là TBTU với *N*-metylmorpholin trong THF ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 60°C trong khoảng thời gian từ 12 đến 48 giờ.

Theo cách khác, việc hình thành liên kết amit có thể được thực hiện bằng phản ứng liên hợp giữa amin 2 và hợp chất axyl clorua 1' trong các dung môi được halogen hóa như diclometan hoặc 1,2-dicloetan hoặc các dung môi ete như dietyl ete, dioxan, THF, DME hoặc TBME, với sự có mặt của bazơ hữu cơ như triethylamin hoặc *N,N*-diisopropyletylamin. Các điều kiện được ưu tiên là triethylamin trong THF ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Nếu muốn, hợp chất axyl clorua 1' có thể được điều chế tại chỗ từ axit carboxylic tương ứng có công thức 1 bằng cách xử lý với oxalyl clorua trong các dung môi được halogen hóa như diclometan hoặc 1,2-dicloetan hoặc các dung môi ete như dietyl ete, dioxan, THF, DME hoặc TBME với sự có mặt của chất xúc tác như DMF.

Các điều kiện được ưu tiên là dicloetan ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ.

Theo cách khác, hợp chất axyl clorua 1' có thể được điều chế tại chỗ từ axit carboxylic tương ứng có công thức 1 bằng cách xử lý với 1-clo-*N,N*,2-trimetylpropenylamin [CAS 26189-59-3] trong diclometan, tiếp theo là loại bỏ dung môi trong chân không, theo phương pháp của Ghosez và các đồng tác giả (*J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1979, 1180; *Org. Synth.* 1980, 59, 26-34).

Bước B: Việc loại bỏ nhóm bảo vệ N BOC có thể được thực hiện với axit vô cơ như HCl, H₂SO₄ hoặc H₃PO₄ hoặc các axit hữu cơ như CF₃COOH, CHCl₂COOH, HOAc hoặc axit p-toluensulfonic trong các dung môi như CH₂Cl₂, CHCl₃, THF, MeOH, EtOH hoặc H₂O ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 80°C.

Các điều kiện được ưu tiên là CF₃COOH trong axetonitril chứa nước ở 80°C trong 3 giờ hoặc HCl 4N trong dioxan ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ.

Khi sử dụng nguyên liệu ban đầu raxemic có công thức 2, hỗn hợp raxemic tạo ra của các hợp chất morpholin I' có thể được tách ra thành các chất đồng phân đối ảnh cấu tạo của nó bằng cách sử dụng HPLC không đối xứng. Theo cách khác, hợp chất I có thể thu được ở dạng tinh khiết đồng phân đối ảnh bằng cách bắt đầu từ hợp chất tinh khiết đồng phân đối ảnh có công thức 2.

Phân tách và tinh chế các hợp chất

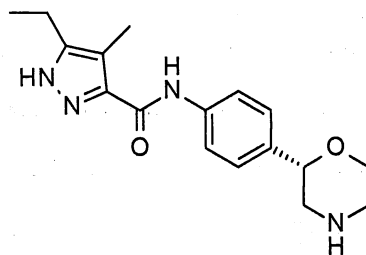
Việc phân tách và tinh chế các hợp chất và các sản phẩm trung gian được mô tả trong bản mô tả có thể được thực hiện, nếu muốn, bằng quy trình tách và tinh chế thích hợp bất kỳ như, ví dụ, lọc, chiết, kết tinh, sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng, sắc ký lớp dày, sắc ký lỏng điều chế cao áp và thấp áp hoặc sự kết hợp của các quy trình này. Có thể tìm thấy các ví dụ cụ thể minh họa quy trình tách và phân tách thích hợp bằng cách tham khảo đến các quy trình điều chế và các ví dụ thực hiện trong phần mô tả dưới đây. Tuy nhiên, các quy trình tách và phân tách tương đương khác có thể, tất nhiên, cũng có thể được sử dụng. Hỗn hợp raxemic của các hợp chất không đối xứng có công thức I có thể được tách ra bằng cách sử dụng HPLC không đối xứng. Hỗn hợp raxemic của các sản phẩm trung gian tổng hợp không đối xứng cũng có thể được tách ra bằng cách sử dụng HPLC không đối xứng.

Các muối của hợp chất có công thức I

Hợp chất có công thức I là bazơ và có thể được biến đổi thành muối cộng axit tương ứng. Việc biến đổi được thực hiện bằng cách xử lý bằng ít nhất một lượng theo tỷ lệ lượng hóa học của axit thích hợp, như axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric và các axit tương tự, và các axit hữu cơ như axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit pyruvic, axit oxalic, axit malic, axit malonic, axit suxinic, axit maleic, axit fumaric, axit tartric, axit xitric, axit benzoic, axit xinamic, axit mandelic, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit p-toluensulfonic, axit salixylic và các axit tương tự. Thông thường, bazơ tự do được hòa tan trong dung môi hữu cơ trơ như diethyl ete, etyl axetat, clorofom, etanol hoặc metanol và các dung môi tương tự, và axit được bổ sung trong dung môi tương tự. Nhiệt độ được duy trì nằm trong khoảng từ 0°C và 50°C. Muối thu được sẽ kết tủa đồng thời hoặc có thể tạo thành dung dịch bằng dung môi phân cực ít hơn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

5-Etyl-4-metyl-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]-1*H*-pyrazol-3-carboxamita) *tert*-Butyl (2*S*)-2-[4-[(5-etyl-4-metyl-1*H*-pyrazol-3-carbonyl)amino]phenyl]morpholin-4-carboxylat

Bổ sung TBTU (807 mg, 2,51 mmol, 2,00 đương lượng) và *N*-metylmorpholin (509 mg, 553 μ l, 5,03 mmol, 4,00 đương lượng) vào dung dịch có khuấy của *tert*-butyl (2*S*)-2-(4-aminophenyl)morpholin-4-carboxylat (CAS RN: 1260220-43-6, 350 mg, 1,26 mmol, 1,00 đương lượng) và axit 5-etyl-4-metyl-1*H*-pyrazol-3-carboxylic (CAS RN: 957129-38-3, 245 mg, 1,51 mmol, 1,20 đương lượng) trong THF (8 ml). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 50°C trong 15 giờ. TLC ở $t = 15$ giờ thể hiện phản ứng này hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng cách sắc ký nhanh (silica gel, chất rửa giải: EtOAc 0% đến 100% trong heptan) để tạo ra *tert*-butyl (2*S*)-2-[4-[(5-etyl-4-metyl-1*H*-pyrazol-3-carbonyl)amino]phenyl]morpholin-4-carboxylat dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt (501 mg, 96%). MS (ISP): 413,7 ($[M-H]^+$).

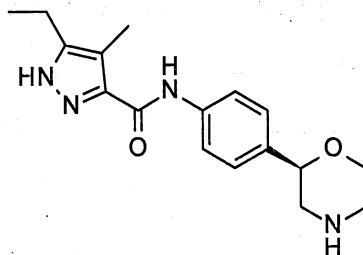
b) 5-Etyl-4-metyl-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]-1*H*-pyrazol-3-carboxamit

Bổ sung huyền phù của *tert*-butyl (2*S*)-2-[4-[(5-etyl-4-metyl-1*H*-pyrazol-3-carbonyl)amino]phenyl]morpholin-4-carboxylat (497 mg, 1,2 mmol, 1,00 đương lượng) trong axetonitril (4 ml) vào dung dịch có khuấy của axit trifloaxetic (1,37 g, 918 μ l, 12,0 mmol, 10 đương lượng) trong nước (8 ml). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 80°C trong 3 giờ. MS ở $t = 3$ giờ thể hiện phản ứng này hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng này được rót vào dung dịch nước NaOH 1M và được chiết hai lần bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ được làm khô bằng Na_2SO_4 và cô trong chân không. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng cách sắc ký cột nhanh (hộp amin SiliaSepTM, chất rửa giải: EtOAc 0% đến 100% trong heptan, sau đó là MeOH 0% đến 10% trong EtOAc) để tạo ra 5-etyl-4-metyl-*N*-

[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]-1*H*-pyrazol-3-carboxamit (327 mg, 87%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt. MS (ISP): 315,7 ($[M+H]^+$).

Ví dụ 2 (ví dụ so sánh)

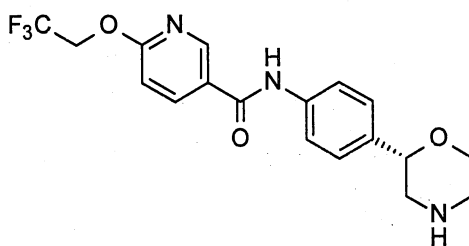
5-Etyl-4-metyl-*N*-[4-[(2*R*)-morpholin-2-yl]phenyl]-1*H*-pyrazol-3-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng (2*R*)-2-(4-aminophenyl)morpholin-4-carboxylat (CAS RN: 1260220-42-5) thay vì (2*S*)-2-(4-aminophenyl)morpholin-4-carboxylat trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 315,6 ($[M+H]^+$).

Ví dụ 3 (ví dụ so sánh)

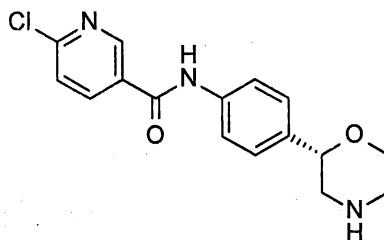
N-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]-6-(2,2,2-trifloetoxy)pyridin-3-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 6-(2,2,2-trifloetoxy)nicotinic (CAS RN: 159783-29-6) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1*H*-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 382,1 ($[M+H]^+$).

Ví dụ 4 (ví dụ so sánh)

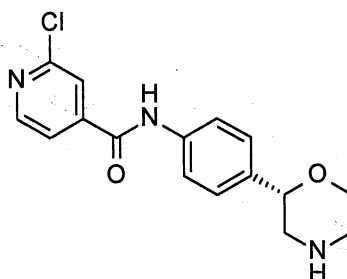
6-Clo-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]pyridin-3-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 6-clo-nicotinic (CAS RN: 5326-23-8) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 320,1 ($[\{^{37}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$), 318,2 ($[\{^{35}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$).

Ví dụ 5 (ví dụ so sánh)

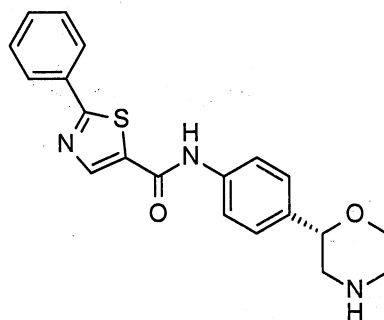
2-Clo-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]pyridin-4-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 2-clo-isonicotinic (CAS RN: 6313-54-8) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 320,1 ($[\{^{37}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$), 318,1 ($[\{^{35}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$).

Ví dụ 6 (ví dụ so sánh)

N-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]-2-phenyl-1,3-thiazol-5-carboxamit

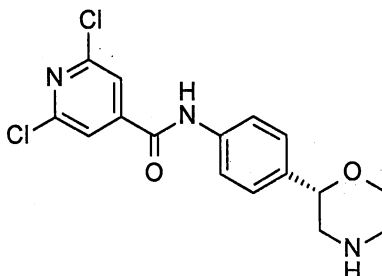


Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 2-phenylthiazol-5-carboxylic (CAS RN: 10058-38-5) thay vì axit 5-etyl-4-

metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 366,1 ($[M+H]^+$).

Ví dụ 7 (ví dụ so sánh)

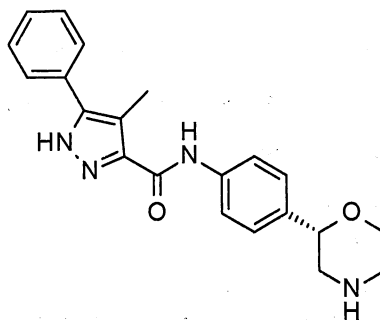
2,6-Diclo-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]pyridin-4-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 2,6-diclo-isonicotinic (CAS RN: 5398-44-7) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 356,1 ($[^{37}\text{Cl}]M+H]^+$), 354,1 ($[^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}]M+H]^+$), 352,1 ($[^{35}\text{Cl}]M+H]^+$).

Ví dụ 8 (ví dụ so sánh)

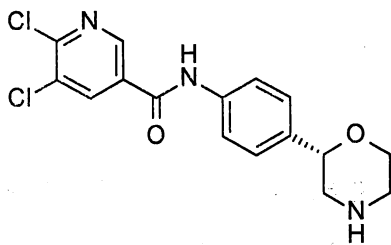
4-Metyl-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]-5-phenyl-1*H*-pyrazol-3-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 4-metyl-5-phenyl-1H-pyrazol-3-carboxylic (CAS RN: 879770-33-9) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 363,2 ($[M+H]^+$).

Ví dụ 9 (ví dụ so sánh)

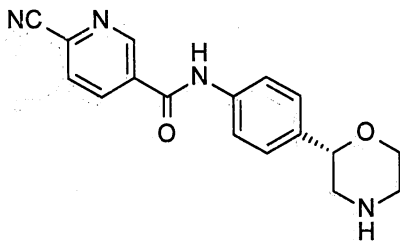
5,6-Diclo-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]pyridin-3-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 5,6-diclo-nicotinic (CAS RN: 41667-95-2) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 356,1 ($[\{^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$), 354,1 ($[\{^{37}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$), 352,1 ($[\{^{35}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$).

Ví dụ 10 (ví dụ so sánh)

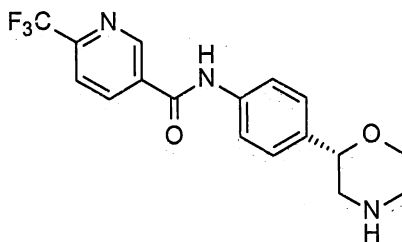
6-xyano-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]pyridin-3-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 6-xyano-nicotinic (CAS RN: 70165-31-0) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 309,1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

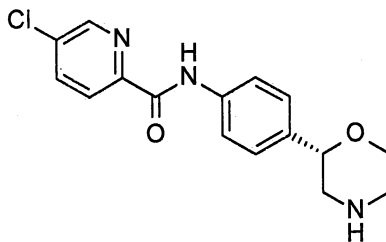
Ví dụ 11 (ví dụ so sánh)

N-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]-6-(triflometyl)pyridin-3-carboxamit



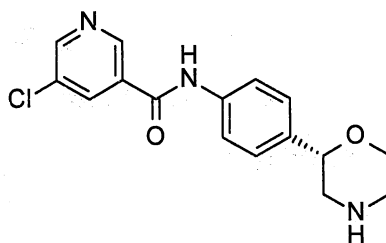
Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 6-(triflometyl)nicotinic (CAS RN: 158063-66-2) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 352,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Ví dụ 12 (ví dụ so sánh)

5-Clo-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]pyridin-2-carboxamit

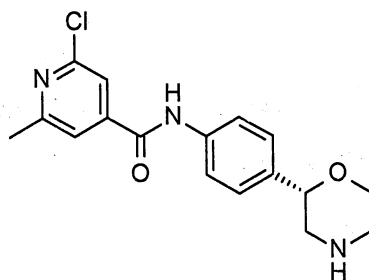
Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 5-clo-picolinic (CAS RN: 86873-60-1) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 320,1 ($[\{^{37}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$), 318,2 ($[\{^{35}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$).

Ví dụ 13 (ví dụ so sánh)

5-Clo-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]pyridin-3-carboxamit

Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 5-clo-nicotinic (CAS RN: 22620-27-5) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 320,1 ($[\{^{37}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$), 318,1 ($[\{^{35}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$).

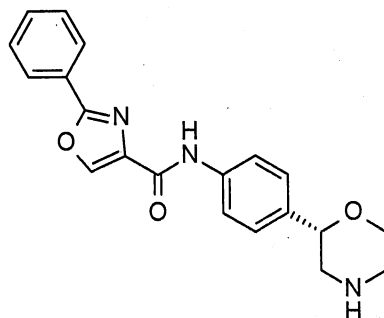
Ví dụ 14 (ví dụ so sánh)

2-Clo-6-metyl-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]pyridin-4-carboxamit

Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 2-clo-6-metylpyridin-4-carboxylic (CAS RN: 25462-85-5) thay vì axit 5-ethyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 334,1 ($[\{^{37}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$), 332,1 ($[\{^{35}\text{Cl}\}\text{M}+\text{H}]^+$).

Ví dụ 15 (ví dụ so sánh)

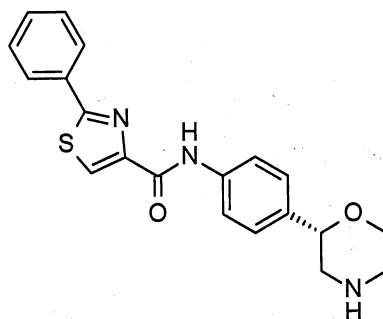
N-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]-2-phenyl-1,3-oxazol-4-carboxamid



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 2-phenyloxazol-4-carboxylic (CAS RN: 23012-16-0) thay vì axit 5-ethyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 350,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Ví dụ 16 (ví dụ so sánh)

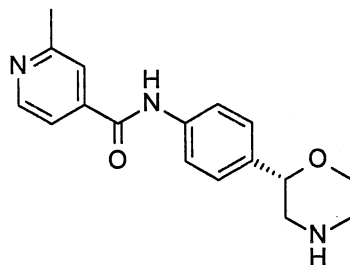
N-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]-2-phenyl-1,3-thiazol-4-carboxamid



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 2-phenylthiazol-4-carboxylic (CAS RN: 7113-10-2) thay vì axit 5-ethyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 366,1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Ví dụ 17 (ví dụ so sánh)

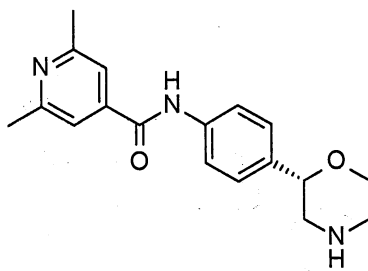
2-Metyl-*N*-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]pyridin-4-carboxamid



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 2-metyl-isonicotinic (CAS RN: 4021-11-8) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 298,2 ($[M+H]^+$).

Ví dụ 18 (ví dụ so sánh)

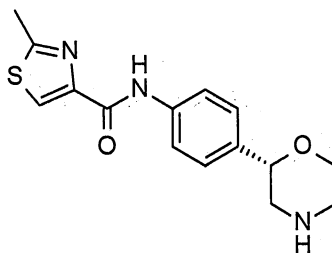
2,6-Dimetyl-N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]phenyl]pyridin-4-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 2,6-dimetyl-isonicotinic (CAS RN: 54221-93-1) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 312,2 ($[M+H]^+$).

Ví dụ 19 (ví dụ so sánh)

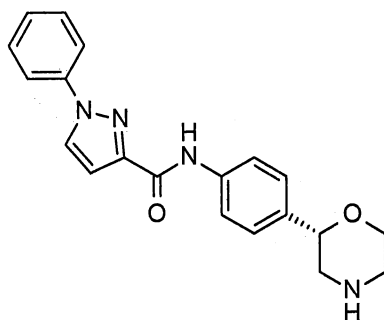
N-[4-[(2S)-morpholin-2-yl]phenyl]-2-metyl-1,3-thiazol-4-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 2-metylthiazol-4-carboxylic (CAS RN: 35272-15-2) thay vì axit 5-etyl-4-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 304,1 ($[M+H]^+$).

Ví dụ 20 (ví dụ so sánh)

N-[4-[(2*S*)-morpholin-2-yl]phenyl]-1-phenylpyrazol-3-carboxamit



Hợp chất ở đề mục này thu được theo phương pháp tương tự nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 1-phenyl-1H-pyrazol-3-carboxylic (CAS RN: 4747-46-0) thay vì axit 5-ethyl-4-methyl-1H-pyrazol-3-carboxylic trong bước (a). Chất rắn màu trắng. MS (ISP): 349,2 ([M+H]⁺).

Như nêu trên, hợp chất của sáng chế có ưu điểm hơn nhiều so với các hợp chất đã biết trong lĩnh vực, những ưu điểm đó là hoạt tính chủ vận hiệu nghiệm ở thụ thể TAAR1 ở người, độ chọn lọc kháng chất vận chuyển dopamin (DAT), độ chọn lọc kháng kênh ion hERG, và vector lưỡng tính thấp và nhờ đó có nguy cơ thấp gây ra chứng loạn dưỡng phospholipit do được chất gây ra (DIPL) (*vide infra*).

Các số liệu so sánh và các bình luận dưới đây có thể được đưa ra thể hiện những ưu điểm vượt trội của hợp chất có công thức I so với các hợp chất đã biết trong lĩnh vực.

1. Các hoạt tính dược lý và hiệu lực trị liệu của các chất chủ vận một phần của thụ thể có liên quan đến amin vết ở người 1 (hTAAR1)

Có bằng chứng về sự khác biệt đáng kể giữa các loài trong sự tương tác phối tử-thụ thể giữa TAAR1 ở loài gặm nhấm và ở người^[1]. Do đó, khi lựa chọn các hợp chất để dùng làm chất trị liệu ở người để điều trị các bệnh liên quan đến TAAR1 thì quan trọng là giành quyền ưu tiên cho các hợp chất ứng cử dựa vào hiệu lực của hoạt tính chức năng của chúng ở dạng người của thụ thể TAAR1 (hTAAR1). hTAAR1 là thụ thể xuyên màng bất cặp với protein G (GPCR), nhờ đó các phối tử có thể có chức năng như là các chất đối kháng, các chất chủ vận, các chất chủ vận một phần hoặc các chất chủ vận ngược của thụ thể. Hợp chất có công thức I và các hợp chất nêu trong ví dụ so sánh đã được thử nghiệm *in vitro* đối với hoạt tính chức năng ở hTAAR1, nhờ đó hợp chất có công thức I được phát hiện là chất chủ vận một phần của hTAAR1. Các giá trị EC₅₀ của

hTAAR1 được xác định theo thử nghiệm đối với hợp chất có công thức I và sự lựa chọn của các hợp chất nêu trong ví dụ so sánh được thể hiện trong Bảng 1 (*vide infra*). Hợp chất theo ví dụ 1 nhờ đó đã được phát hiện, cụ thể, là chất chủ vận một phần có hiệu lực của hTAAR1 *in vitro*.

Các thử nghiệm điện sinh lý *ex vivo* trong vùng chòm não và nhân giữa cuống não (dorsal raphe nuclei) chỉ ra rằng các chất chủ vận một phần TAAR1 làm tăng cường tốc độ đốt cháy nơron DA và 5-HT ở chuột kiểu đại^[2,3], trong khi chất chủ vận đầy đủ như *p*-tyramin lại làm giảm tốc độ đốt cháy^[3,4]. Tuy nhiên, cả chất chủ vận đầy đủ và một phần đều thể hiện là cần được bảo vệ để chống lại các tác dụng thêm vào và tăng cường của cocain kích thích thần kinh^[5]. Trong khi chất chủ vận đầy đủ như amphetamin gây ra phản hồi xấu làm mất tác dụng của chính chúng trên các hệ DA và 5-HT^[6,7], thì các chất chủ vận một phần có thể làm tăng tác dụng của chúng đối với sự truyền tín hiệu thần kinh do làm tăng tốc độ đốt cháy thông qua TAAR1. Do những phát hiện này, và những báo cáo rằng các chất chủ vận một phần TAAR1 có tính chất dược lý *in vivo* ở các loài gặm nhấm giàu tốt hơn so với các chất chủ vận đầy đủ^[3,8], số lượng lớn bằng chứng tiền lâm sàng xuất hiện gợi ý rằng các chất chủ vận một phần TAAR1 cho thấy có nhiều triển vọng để dùng làm chất trị liệu ở người để điều trị các bệnh CNS bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh tâm thần phân liệt, rối loạn lưỡng cực, bệnh trầm cảm, bệnh Parkinson, cũng như dùng để điều trị nghiện rượu và nghiện ma túy.

Ví dụ, các chất chủ vận một phần TAAR1 được đề xuất là tốt hơn so với các thuốc chống loạn tâm thần không điển hình hiện có do việc thể hiện tác dụng chống loạn tâm thần có tác dụng cải thiện nhận thức và tâm trạng cũng như làm giảm tác dụng phụ (chẳng hạn như không kích thích hội chứng biến đổi mà được biết đối với thuốc chống loạn tâm thần hiện có)^[3,8]. Các tài liệu chuyên ngành khác gợi ý các chỉ định có thể có bao gồm rối loạn lưỡng cực,^[8] nghiện ma túy^[5,9], và bệnh tiểu đường^[10].

Các tài liệu viện dẫn:

- [1] Simmler, L. D.; Buchy, D.; Chaboz, S.; Hoener, M.C.; Liechti, M. E.; “*In vitro* characterization of psychoactive substances at rat, mouse and human trace amine-associated receptor 1”. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2016, Fast Forward article DOI: 10.1124/jpet.115.229765;

- [2] Bradaia, A. *et al.*; “The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system”. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 20081-20086;
- [3] Revel, F. G. *et al.*; “Trace amine-associated receptor 1 partial agonism reveals novel paradigm for neuropsychiatric therapeutics”. *Biol. Psychiatry* 2012, 72, 934-942;
- [4] Revel, F. G. *et al.*; “TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity”. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 8485-8490;
- [5] Pei, Y.; Mortas, P.; Hoener, M. C.; Canales, J. J.; “Selective activation of the trace amine-associated receptor 1 decreases cocaine’s reinforcing efficacy and prevents cocaine-induced changes in brain reward thresholds”. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiatry* 2015, 63, 70-75;
- [6] Lindemann, L. *et al.*; “Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity”. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008, 324, 948-956;
- [7] Di Cara, B. *et al.*; “Genetic deletion of trace amine 1 receptors reveals their role in auto-inhibiting the actions of ecstasy (MDMA)”. *J. Neuroscience* 2011, 31, 16928-16940;
- [8] Revel, F. G. *et al.*; “A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight”. *Mol. Psychiatry* 2013, 18, 543-556;
- [9] Pei, Y.; Lee, J.; Leo, D.; Gainetdinov, R. R.; Hoener, M. C.; Canales, J. J.; “Activation of the trace amine-associated receptor 1 prevents relapse to cocaine seeking”. *Neuropsychopharmacology* 2014, 39, 2299–2308;
- [10] Raab, S. *et al.*; “Incretin-like effects of small molecule trace amine-associated receptor 1 agonists”. *Mol. Metabolism* 2016, 5, 47-56.

2. Chất vận chuyển dopamin (DAT) và tác động đi kèm đối với nghiện ma túy và/hoặc khả năng gây nghiện ma túy

Tính chất dược lý của chất vận chuyển dopamin (DAT) đã được nhắc đến trong số những vấn đề khác về các tác dụng kích thích thần kinh tâm thần và về khả năng

nghiện và cơ chế nghiện của một số chất ma túy kích thích thần kinh tâm thần như cocain và MDPV.^[1-3] Do đó, đối với trị liệu mới được dự định dùng cho người, mong muốn tránh được sự ức chế của, hoặc sự tương tác với, chất vận chuyển dopamin DAT để làm giảm thiểu nguy cơ về khả năng gây nghiện hoặc khả năng nghiện.

Ví dụ, bằng chứng gợi ý rằng các tác dụng tăng cường của cocain tùy thuộc vào khả năng của nó đối với việc phong bế nhanh chóng chất vận chuyển dopamin (DAT). Trong những nghiên cứu ở động vật, các chất ức chế tái hấp thu dopamin chứ không phải cocain cũng được tự áp dụng, với hiệu lực tương đối mà thường có liên quan tích cực với hiệu lực của chúng trong việc ức chế DAT, nhưng không phải là các chất vận chuyển serotonin hoặc norepinephrin (SERT, NET)^[4-8]. Các động vật được huấn luyện để tự dùng cocain cũng sẽ trực tiếp tự dùng các chất chủ vận dopamin^[9-11]. Ngoài ra, sự phá hủy của các đầu cùng thần kinh dopamin có thể làm mất hành vi tự dùng cocain^[12,13], và các tác dụng này đã được quan sát thấy thậm chí ngay cả khi việc đáp ứng được duy trì bởi các tác nhân gia cường khác được giữ nguyên^[14,15]. Ở người, cocain được kích thích ở mức “cao” liên quan đến sự chiếm giữ DAT trong não^[16].

Để kiểm tra thêm giả thiết rằng DAT là cần thiết cho các tác dụng tăng cường của cocain, DAT chức năng nhưng “không nhạy với cocain” được tạo ra và được biểu hiện ở chuột^[17,18]. DAT đột biến này đã chứng minh ái lực thấp hơn 89 lần đối với cocain so với DAT kiểu đại, và cocain không làm tăng dopamin ngoại bào trong vùng nhân não (nucleus accumbens), hoặc kích thích tăng hoạt tính vận động, các loại lập thể, hoặc ưu tiên nơi có điều hòa, trong các con chuột được thay thế một-một trong thông tin chuỗi ADN hoặc chèn thông tin chuỗi không tìm thấy trong locus (knock-in) (DATki) biểu hiện DAT đột biến này^[18-20]. Ngoài ra, cocain không dùng làm chất gia cường tích cực ở các con chuột DATki này, trong khi thức ăn, d-amphetamin, và chất chủ vận dopamin trực tiếp được duy trì chắc chắn hành vi huấn luyện ở những con chuột này, ở mức độ có thể so sánh được với các con chuột kiểu đại^[21]. Việc đưa lại DAT kiểu đại nhạy với cocain vào các vùng não không kể những thứ khác bao gồm vùng chỏm não (VTA) làm phục hồi hành vi thưởng cocain ở các con chuột DATki^[22]. Tóm lại, khả năng làm phong bế DAT của cocain là đủ để làm mất tác dụng gia cố của nó ở những con chuột tạo ra bằng chứng thuyết phục rằng việc phong bế DAT có tính quyết định đối với các tác dụng tăng cường của cocain.

Do đó, cùng với những phát hiện này gợi ý rằng đối với trị liệu mới được dự định dùng cho người, rất mong muốn tránh được sự ức chế của, hoặc sự tương tác với, chất vận chuyển dopamin DAT để làm giảm thiểu nguy cơ về khả năng gây nghiện hoặc khả năng nghiện.

Giá trị K_i của DAT *in vitro* xác định được đối với một loạt hợp chất TAAR1 được thể hiện trong Bảng 1 (*vide infra*). Bất ngờ đã phát hiện ra rằng hợp chất nêu trong ví dụ 1 có phối tử yếu hơn đáng kể ở DAT so với các hợp chất khác, trong khi đồng thời là chất chủ vận một phần có hiệu lực của hTAAR1, và do đó tỷ lệ chọn lọc giữa hTAAR1/DAT đối với hợp chất nêu trong ví dụ 1 là cao hơn đáng kể so với các hợp chất khác.

Các tài liệu viện dẫn:

- [1] Meil, W. M. and Boja, J. W.; "The dopamine transporter and addiction." Chapter 1, pp. 1-21 in *Neurochemistry of Abused Drugs* (Karch, S. B., Ed.), CRC Press (2008);
- [2] Simmler, L. D. *et al.*; "Pharmacological characterization of designer cathinones *in vitro*". *Brit. J. Pharmacol.* 2013, 168, 458-470;
- [3] Baumann, M. H.; Partilla, J. S.; Lehner, K. R.; "Psychoactive 'bath salts': not so soothing". *Eur. J. Pharmacol.* 2013, 698, 1-5;
- [4] Ritz, M. C.; Lamb, R. J.; Goldberg, S. R.; Kuhar, M. J.; "Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine". *Science* 1987, 237, 1219-1223;
- [5] Bergmann, J.; Madras, B. K.; Johnson, S. E.; Spealman, R. D.; "Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. III. Self-administration by squirrel monkeys". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 251, 150-155;
- [6] Howell, L. L. & Byrd, L. D.; "Serotonergic modulation of the behavioural effects of cocaine in the squirrel monkey". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, 275, 1551-1559;
- [7] Roberts, D. C. S. *et al.*; "Self-administration of cocaine analogs by rats". *Psychopharmacology* 1999, 144, 389-397;

- [8] Wee, S. *et al.*; "Relationship between serotonergic activity and reinforcing effects of a series of amphetamine analogs". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 313, 848-854;
- [9] Woolverton, W. L.; Goldberg, L. I.; Ginos, J. Z.; "Intravenous self-administration of dopamine receptor agonists by Rhesus monkeys". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1984, 230, 678-683;
- [10] Wise, R. A.; Murray, A.; Bozarth, M. A.; "Bromocriptine self-administration and bromocriptine-reinstatement of cocaine-trained and heroin-trained lever pressing in rats". *Psychopharmacology* 1990, 100, 355-360;
- [11] Caine, S. B. & Koob, G. F.; "Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors". *Science* 1993, 260, 1814-1816;
- [12] Roberts, D. C. S.; Corcoran, M. E.; Fibiger, H. C.; "On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine". *Pharmacol. Biochem. Behaviour* 1977, 6, 615-620;
- [13] Roberts, D. C. S.; Koob, G. F.; Klonoff, P.; Fibiger, H. C.; "Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens". *Pharmacol. Biochem. Behaviour* 1980, 12, 781-787;
- [14] Pettit, H. O.; Ettenberg, A.; Bloom, F. E.; Koob, G. F.; "Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats". *Psychopharmacology* 1984, 84, 167-173;
- [15] Caine, S. B. & Koob, G. F.; "Effects of mesolimbic dopamine depletion on responding maintained by cocaine and food". *J. Exp. Anal. Behavior* 1994, 61, 213-221;
- [16] Volkow, N. D. *et al.*; "Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy". *Nature* 1997, 386, 827-830;
- [17] Chen, R.; Han, D. D.; Gu, H. H.; "A triple mutation in the second transmembrane domain of mouse dopamine transporter markedly decreases sensitivity to cocaine and methylphenidate". *J. Neurochem.* 2005, 94, 352-359;
- [18] Chen, R. *et al.*; "Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 9333-9338;

- [19] Tilley, M. R. & Gu, H. H.; "Dopamine transporter inhibition is required for cocaine-induced stereotypy". *Neuroreport* 2008, 19, 1137-1140;
- [20] Tilley, M. R.; O'Neill, B.; Han, D.D.; Gu, H. H.; "Cocaine does not produce reward in absence of dopamine transporter inhibition". *Neuroreport* 2009, 20, 9-12;
- [21] Thomsen, M.; Han, D.D.; Gu, H. H.; Caine, S. B.; "Lack of cocaine self-administration in mice expressing a cocaine-insensitive dopamine transporter". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009, 331, 204-211;
- [22] Wu, H. *et al.*; "Restoration of cocaine stimulation and reward by reintroducing wild type dopamine transporter in adult knock-in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter". *Neuropharmacology* 2014, 86, 31-37.

3. Phong bế hERG và tác động đi kèm của nó đối với việc kéo dài khoảng QT tim

Việc giảm thiểu khả năng gây ra các tác dụng phụ cho tim của thuốc là đặc biệt cần đối với một chất trị liệu được dự định dùng an toàn cho người, đặc biệt là đối với các thuốc được dự định dùng cho chế độ điều trị lâu dài. Trong vài năm gần đây, các cơ quan quản lý đã trì hoãn việc chấp thuận hoặc đã áp dụng việc hạn chế sử dụng, và thậm chí là từ chối chấp thuận hoặc loại bỏ ra khỏi thị trường, các chất trị liệu có tác động kéo dài khoảng QT tim. Khoảng QT là khoảng thời gian tính từ thời điểm bắt đầu phức hợp QRS đến khi kết thúc sóng T trong điện tim đồ (electrocardiogram - ECG) và là giá trị đo khoảng thời gian giải phân cực và tái phân cực tâm thất. Các thuốc kéo dài khoảng QT thường tạo ra chứng tim đập nhanh tâm thất đa hình, còn được gọi là Torsades de Pointes (TdP). Chứng loạn nhịp tim này có thể gây ra các biến chứng tim mạch nghiêm trọng và có thể thúc đẩy việc tạo xơ không thuận nghịch trong tâm thất và gây tử vong. Tài liệu hướng dẫn của cơ quan quản lý ICH S7B^[1] đã khuyến cáo việc sử dụng phương pháp tiếp cận không dựa trên lâm sàng để đánh giá khả năng xuất hiện các nguy cơ tim mạch do các thực thể phân tử mới (new molecular entity - NME) gây ra, phương pháp tiếp cận này bao gồm thử nghiệm IK_r *in vitro* [thử nghiệm dòng kali được dẫn bởi gen liên quan ether-a-go-go ở người, viết tắt là hERG). Việc ức chế hERG được xác định là cơ chế chính kéo dài QT.^[2] Do đó, phương pháp tiếp cận loại bỏ nguy cơ kéo dài khoảng QT không dựa trên lâm sàng giảm thiểu theo khuyến cáo ở trên là thử các hợp chất đại diện được chọn từ một loạt hợp chất hóa học nhất định trong thử nghiệm hERG *in vitro*.^[3] Mục đích của việc này là để chọn ra các hợp chất gây ức chế hERG ở mức không lớn hơn 20% ở các nồng độ thấp hơn ít nhất là 30 lần so với nồng độ cho hiệu quả *in*

vitro (hoặc *in vivo* nếu nồng độ này có sẵn) đối với hoạt tính điều trị. Trong trường hợp của các chất chủ vận TAAR1, giá trị EC_{50} trên hTAAR1 có thể được coi là nồng độ liên quan *in vitro* mà dự báo được hoạt tính điều trị (*vide supra*). Do đó, mong muốn chọn ra các chất chủ vận TAAR1 cần được tiến hành khi tỷ lệ IC_{20} trên hERG / EC_{50} trên hTAAR1 bằng ít nhất là 30 lần.

Các giá trị IC_{20} và IC_{50} *in vitro* trên hERG đo được cho một loạt hợp chất TAAR1 được nêu trong Bảng 1 (*vide infra*).

Cụ thể, các hợp chất có tính bazơ được biết là đặc biệt dễ gây ức chế kênh hERG.^[4] Tất cả các hợp chất TAAR1 đều mang cùng nhóm đầu là morpholino, do đó tất cả các hợp chất này đều được kỳ vọng là về cơ bản sẽ tương tự nhau. Sự có mặt của nhóm bazơ cần cho hoạt tính chủ vận ở hTAAR1. Đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng hợp chất nêu trong ví dụ 1 là chất ức chế kênh hERG yếu hơn nhiều so với các hợp chất so sánh, và do đó, tỷ lệ IC_{20} trên hERG / EC_{50} trên hTAAR1 của hợp chất nêu trong Ví dụ 1 cao hơn đáng kể giá trị khuyến cáo tối thiểu là 30 lần.

Các tài liệu viện dẫn:

- [1] ICH Guideline. "The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals (S7B)" issued as CPMP/ICH/423/02, adopted by CHMP in May 2005; <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/safety-single/article/the-non-clinical-evaluation-of-the-potential-for-delayed-ventricular-repolarization-qt-interval-pro.html>
- [2] Redfern, W. S.; Carlsson, L.; Davis, A. S.; Lynch, W. G.; MacKenzie, I.; Palethorpe, S.; Siegl, P.K.; Strang, I; Sullivan, A. T.; Wallis, R.; Camm, A.J.; Hammond, T. G.; "Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development". *Cardiovasc. Res.* 2003, 58, 32-45;
- [3] Helliwell, R. M.: "Potassium Channels". *Methods in Molecular Biology* (Totowa, NJ, United States) 2008, 491, 279-295;
- [4] Zolotoy, A. B.; Plouvier, B. P.; Beatch, G. B.; Hayes, E. S.; Wall, R. A.; Walker, M. J. A.; "Physicochemical determinants for drug-induced blockade of hERG

potassium channels: Effect of charge and charge shielding". *Curr. Med. Chem. – Cardiovascular & Hematological Agents* 2003, 1, 225-241.

4. Tính lưỡng tính và tác động đi kèm của nó đối với chứng loạn dưỡng phospholipit do được chất gây ra (drug-induced phospholipidosis - DIPL)

Chứng loạn dưỡng phospholipit (PLD) là một rối loạn liên quan đến việc dự trữ tiêu thể đặc trưng bởi việc tích lũy lượng quá lớn phospholipit trong các mô.^{[1][2][3]} Nhiều thuốc lưỡng tính dạng cation, bao gồm thuốc chống trầm cảm, chất chống viêm hộng, thuốc chống sốt rét, và thuốc làm giảm mức cholesterol, đã được thông báo là gây ra chứng loạn dưỡng phospholipit do được chất gây ra (DIPL) ở động vật và ở người. Cơ chế gây DIPL liên quan đến việc giữ lại và tái hấp thu có chọn lọc của các thuốc DIPL bên trong tiêu thể và các bong axit của các tế bào bị ảnh hưởng. Sau quá trình giữ lại các thuốc này là quá trình tích lũy dần dần các phức chất thuốc – phospholipit bên trong các màng tiêu thể bên trong. Việc tăng các vật liệu không tiêu hóa dẫn đến sự tích lũy bất thường của các thể đa lớp (các thể dạng tủy) trong các mô. Mặc dù chứng loạn dưỡng phospholipit này chủ yếu được coi là rối loạn dự trữ, nhưng với một số hợp chất, thì rối loạn dự trữ này được biết là thường đi kèm với tình trạng viêm và hoại tử, dẫn đến làm suy giảm chức năng của các mô bị ảnh hưởng. Do đó, rất cần các chất trị liệu không có nguy cơ gây DIPL. Điều này đặc biệt đúng đối với các thuốc được dự định dùng lâu dài, ví dụ, các thuốc được dự định dùng để điều trị các rối loạn tâm thần mãn như tâm thần phân liệt, rối loạn lưỡng cực hoặc trầm cảm, các thuốc được dự định dùng để điều trị các rối loạn chuyển hóa mạn tính như đái tháo đường.

DIPL là một tác động bất lợi được biết là đặc biệt gắn với các thuốc lưỡng tính dạng cation (cationic amphiphilic drug - CAD).^[4] Để tránh DIPL, pK_a bazơ (pK_a bazơ < 6,3) hoặc độ lưỡng tính ($\Delta\Delta G_{am} > -6 \text{ kJ mol}^{-1}$) của hợp chất cần được giảm (nghĩa là, $\Delta\Delta G_{am}$ cần tăng lên).^[5] Hợp chất được phân loại là không có nguy cơ tạo ra DIPL (DIPL âm tính) nếu giá trị pK_a bazơ nhỏ hơn 6,3 hoặc độ lưỡng tính lớn hơn $\Delta\Delta G_{am} = -6 \text{ kJ mol}^{-1}$. Độ lưỡng tính của một hợp chất nhất định có thể được tính toán *in silico* trực tiếp từ công thức cấu tạo phân tử của hợp chất đó,^[6] và theo đó, cũng có thể dự báo *in silico* được nguy cơ gây DIPL cho hợp chất này,^[5] nhờ đó thuật toán dự báo sử dụng chỉ số phân loại nguy cơ gây DIPL được xác định theo tiêu chuẩn sau đây, tiêu chuẩn này dựa trên các thông số thu được từ bộ kết quả thử trên máy tính bao gồm các kết quả về chứng loạn dưỡng phospholipit thu được từ thực nghiệm cho một tập hợp lớn các hợp chất:

VÉCTOR LƯỠNG TÍNH $> -5,0$ kJ/mol và $\text{BPKA1} \leq 5,60$ sẽ cho kết quả dự đoán DIPL âm tính;

$-7,0$ kJ/mol $< \text{VÉCTOR LƯỠNG TÍNH} < -5,0$ kJ/mol và/hoặc $7,0 > \text{BPKA1} > 5,60$ sẽ cho kết quả DIPL tiệm cận;

$\text{VÉCTOR LƯỠNG TÍNH} < -7,0$ kJ/mol và $\text{BPKA1} \geq 7,00$ sẽ cho kết quả DIPL dương tính.

Độ lưỡng tính tính được ($\Delta\Delta G_{\text{am}}$ tính bằng kJ mol⁻¹) cũng như kết quả dự đoán nguy cơ gây *in silico* DIPL (âm tính/tiệt cận/dương tính) cho một loạt hợp chất TAAR1 được nêu trong Bảng 1 (*vide infra*).

Tất cả các hợp chất TAAR1 đều mang cùng nhóm morpholino ở đầu, do đó, pK_a bazơ của tất cả các hợp chất này rất gần nhau và thấy rõ là lớn hơn 6,3. Sự có mặt của nhóm bazơ cần cho hoạt tính chủ vận ở hTAAR1. Do đó, cách duy nhất để tránh mắc DIPL là làm giảm tính ưa lipid của bộ khung xương tạo nên các phân tử này. Ngạc nhiên phát hiện ra rằng đối với hợp chất nêu trong ví dụ 1, tính ưa lipid đã giảm đáng kể so với kỳ vọng, dựa trên các kết quả thu được từ các hợp chất tương tự, và do đó, độ lưỡng tính của hợp chất nêu trong Ví dụ 1 giảm rõ rệt và, kết quả là, hợp chất này không được dự báo là gây ra DIPL.

Các tài liệu viện dẫn:

- [1] Anderson, N.; Borlak, J.; "Drug-induced phospholipidosis". *FEBS Lett.* 2006, 580, 5533-540;
- [2] Reasor, M. J.; Hastings, K. L.; Ulrich, R. G.; "Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions". *Expert Opin. Drug Safety* 2006, 5, 567-83;
- [3] Nonoyama, T.; Fukuda, R.; "Drug induced phospholipidosis pathological aspects and its prediction". *J. Toxicol. Pathol.* 2008, 21, 9-24;
- [4] Lullmann, H.; Lullmann-Rauch, R.; Wassermann, O.; "Lipidosis induced by amphiphilic cationic drugs." *Biochem. Pharmacol.* 1978, 27, 1103-8;
- [5] Fischer, H.; Atzpödien, E. A.; Csato, M.; Doessegger, L.; Lenz, B.; Schmitt, G.; Singer, T.; "In silico assay for assessing phospholipidosis potential of small drug like molecules: training, validation and refinement using several datasets." *J. Med. Chem.* 2012, 55, 126-139;

- [6] Fischer, H.; Kansy, M.; Bur, D.; "CAFCA: a novel tool for the calculation of amphiphilic properties of charged drug molecules". *Chimia* 2000, 54, 640-645.

Các hợp chất đã được đánh giá bằng thử nghiệm nêu sau đây.

Nguyên liệu và phương pháp

TAAR1 ở người

Để xây dựng cấu trúc các plasmit biểu hiện, trình tự mã hóa TAAR1 ở người, được khuếch đại từ ADN hệ gen, chủ yếu như được mô tả bởi Lindemann và các đồng cộng sự. [14]. Hệ thống Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) được sử dụng với 1,5 mM Mg^{2+} và các sản phẩm PCR sau khi tinh chế được tách dòng vào vectơ tách dòng pCR2.1-TOPO (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các sản phẩm PCR được tách dòng phụ vào vectơ pIRESneo2 (BD Clontech, Palo Alto, California), và các vectơ biểu hiện được xác nhận trình tự trước khi đưa vào các dòng tế bào.

Các tế bào HEK293 (ATCC # CRL-1573) được nuôi cấy chủ yếu như được mô tả bởi Lindemann và các cộng sự. (2005). Để tạo ra dòng tế bào được chuyển nhiễm ổn định, các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm bằng các plasmit biểu hiện pIRESneo2 mang trình tự mã hóa TAAR (được mô tả ở trên) với Lipofectamin 2000 (Invitrogen) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất, và 24 giờ sau khi chuyển nhiễm, môi trường nuôi cấy được bổ sung 1 mg/ml G418 (Sigma, Buchs, Thụy Sĩ). Sau khi nuôi cấy khoảng 10 ngày, các dòng vô tính được phân lập, được nhân lên và được thử nghiệm tính đáp ứng với amin vết (tất cả các hợp chất được mua từ Sigma) bằng hệ thống thử nghiệm miễn dịch cAMP Biotrak Enzyme (EIA) (Amersham), tiếp theo là quy trình EIA không axyl hóa được nhà sản xuất cung cấp. Các dòng tế bào đơn dòng thể hiện EC_{50} ổn định sau 15 lần cấy chuyển được sử dụng cho tất cả các nghiên cứu tiếp theo.

Các phép đo cAMP được thực hiện như được mô tả trước đây (Revel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 8485-8490). Tóm lại, các tế bào mà biểu hiện TAAR1 ở người được dàn mỏng trên các đĩa 96 lỗ (BIOCOAT 6640; Becton Dickinson, Allschwil, Thụy Sĩ) và được ủ trong 20 giờ ở nhiệt độ 37°C. Trước khi kích thích các tế bào bằng khoảng nồng độ rộng của các chất chủ vận trong 30 phút ở 37°C, các tế bào này được rửa bằng PBS và được ủ trước bằng PBS chứa 1 mM 3-isobutyl-1-methylxantin trong 10 phút ở 37°C và CO₂ 5%. Sự kích thích bằng DMSO 0,2% được đặt là mức cơ

sở, và tác dụng của 30 μ M β -PEA được đặt là đáp ứng tối đa. Sau đó, các tế bào được phân giải, và các thử nghiệm cAMP được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (cAMP kit; Upstate/Millipore, Schaffhausen, Thụy Sĩ). Cuối cùng, các đĩa được đọc bằng quang kế (máy đếm 1420 Multilabel; PerkinElmer, Schwerzenbach, Thụy Sĩ), và lượng cAMP được tính. Các kết quả thu được từ ít nhất ba thử nghiệm độc lập. Các thử nghiệm được chạy theo hai phiên bản hoặc ba phiên bản. Giá trị EC_{50} được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (tính theo μ M). Giá trị E_{max} đối với số liệu hoạt tính chức năng ở TAAR1 mô tả mức độ hoạt tính chức năng so với 100% đối với phối tử nội sinh và chất chủ vận đầy đủ β -PEA.

DAT ở người

Việc gắn kết với chất vận chuyển dopamin (DAT) *in vitro*. Các tế bào thận phôi thai người (HEK) 293 (Invitrogen, Zug, Thụy Sĩ) được chuyển nhiễm ổn định DAT ở người đã được nuôi cấy. Các tế bào được gom lại và được rửa ba lần bằng muối đệm phosphat (PBS). Các viên nhỏ được làm đông lạnh ở nhiệt độ -80°C . Các viên nhỏ sau đó được tái huyền phù trong 400 ml HEPES-NaOH 20 mM, pH 7,4, chứa 10 mM EDTA ở 4°C . Sau khi làm đồng nhất với Polytron (Kinematica, Lucerne, Thụy Sĩ) ở tốc độ 10000 vòng quay trong một phút (rpm) trong 15 giây, các chất đồng nhất được ly tâm ở tốc độ 480000 m/s^2 trong 30 phút ở 4°C . Các phần phân ước của dung dịch gốc màng được làm đông lạnh ở -80°C . Tất cả các thử nghiệm được tiến hành ít nhất ba lần. Các hợp chất thử nghiệm được pha loãng trong 20 ml đệm liên kết (NaCl 252 mM, KCl 5,4 mM, Na_2HPO_4 20 mM, KH_2PO_4 3,52 mM, pH=7,4) và đường cong pha loãng 10 điểm được tạo ra và được chuyển nhiễm vào các đĩa thử nghiệm polystyren màu trắng có 96 lỗ (Sigma-Aldrich, Buchs, Thụy Sĩ). $[^3\text{H}]$ -WIN35,428 ($\sim 86\text{ Ci/mmole}$; Perkin-Elmer) là phối tử phóng xạ cho thử nghiệm DAT và có K_d bằng 12 nM. Bổ sung 50 μ l $[^3\text{H}]$ -WIN35,428 (nồng độ $\sim 40\text{ nM}$) vào mỗi lỗ của các đĩa thử nghiệm hDAT, nhắm đích nồng độ $[^3\text{H}]$ -WIN35428 cuối cùng bằng 10 nM. 20 μ l một mình đệm liên kết trong đĩa thử nghiệm đã xác định tổng liên kết, trong khi liên kết với sự có mặt của indatralin 10 μ M xác định được liên kết không đặc hiệu. Gốc màng DAT đã đông lạnh được rã đông và được tái huyền phù đến nồng độ khoảng 0,04 mg protein/ml đệm liên kết (được pha loãng 1:1 trong H_2O) bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất mô polytron. Các chất đồng nhất màng (40 μ g/ml) sau đó được trộn nhẹ trong 5–30 phút với polyvinyl toluen (PCT) các hạt xét nghiệm gắn nhấp nháy được phủ agglutinin mầm lúa mì (WGASPA;

Amersham Biosciences) ở mức 7,7 mg hạt /ml chất đồng nhất. 130 μ l hỗn hợp màng/hạt được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa thử nghiệm chứa phối tử phóng xạ và các hợp chất thử nghiệm (thể tích cuối cùng trong mỗi lỗ, 200 μ l) để bắt đầu thử nghiệm, được ủ trong khoảng 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng cùng với khuấy. Các đĩa thử nghiệm sau đó được đếm theo kiểu đếm PVT SPA của Packard Topcount. 50 μ l dung dịch gốc [3 H]-WIN35428 đã được đếm trong 5 ml cốc-tai nhấp nháy ReadySafe (Beckman Industries) trên thiết bị đếm nhấp nháy lỏng Packard 1900CA để xác định tổng cộng các lần đếm được bổ sung vào thử nghiệm tương ứng. Phép hồi không quy tuyến tính được sử dụng để phù hợp với các số liệu với các đường cong xích-ma và xác định các giá trị IC_{50} để gắn kết và hấp thu. Các giá trị K_i để gắn kết và hấp thu được tính bằng cách sử dụng phương trình Cheng-Prusoff sau đây: $K_i = IC_{50}/(1 + [S]/K_m)$.

ERG (hERG) ở người

Kỹ thuật kẹp ráp nối toàn bộ tế bào được sử dụng để nghiên cứu hiệu quả của các mục thử nghiệm trên các kênh kali hERG (gen liên quan đến ete-a-go-go ở người) trong các tế bào CHO được chuyển nhiễm ổn định ở gần nhiệt độ sinh lý ($36 \pm 1^\circ C$). Các hiệu quả của các hợp chất đối với các thông số dòng điện K^+ hERG được tính ở 4 nồng độ (0,3-3-30-300 μM) trong ít nhất 3 tế bào CHO biểu hiện ổn định kênh hERG. Để xác định điện sinh lý, các tế bào được gieo mầm lên trên các đĩa nuôi cấy môi trường vô trùng kích cỡ 35mm chứa 2ml môi trường nuôi cấy mà không có Hygromycin B. Các tế bào được nuôi cấy ở mật độ mà có thể xác định được các tế bào đơn (không có mối liên quan nào có thể biết được đối với các tế bào liền kề). Các tế bào được ủ ở nhiệt độ $37^\circ C$ trong môi trường ẩm có CO_2 5% (độ ẩm tương đối khoảng 95%). Các tế bào này được duy trì liên tục trong và cho qua các bình nuôi cấy vô trùng chứa hỗn hợp dinh dưỡng F-12 (DMEM/F-12 với L-Glutamin) đã được bổ sung huyết thanh bào thai bê 10% và dung dịch penicilin/streptomycin 10%. Hằng ngày ít nhất ba tế bào được xử lý bằng tác nhân phong bế IK_r chọn lọc (E-4031, chất tham chiếu) để đảm bảo một cách chính xác phương pháp này. Các đĩa nuôi cấy kích cỡ 35mm trên các đĩa đó các tế bào được gieo ở mật độ cho phép các tế bào đơn cần được ghi lại được đặt trên thiết bị giữ đĩa của kính hiển vi và được truyền liên tục (ở tốc độ khoảng 1 ml/phút) bằng dung dịch bể (natri clorua 150 mM, kali clorua 4 mM, canxi clorua 1,2 mM, magie clorua 1 mM, HEPES 10 mM, pH (NaOH) 7,4) ở gần nhiệt độ sinh lý ($36 \pm 1^\circ C$). Sau khi tạo xi gắn Gigaohm giữa các điện cực kẹp và các tế bào CHO được chuyển nhiễm ổn định hERG riêng (miền

điện trở pipet: 2,0 M Ω - 7,0 M Ω ; miền điện trở xi gắn: > 1 G Ω) màng tế bào qua đầu pipet bị phá vỡ để đảm bảo sự tiếp cận của điện đi vào bên trong tế bào (cấu hình kẹp toàn bộ tế bào). Trong trường hợp chất lượng của xi gắn là kém, thì quá trình hình thành xi gắn được lặp lại bằng tế bào khác nhau và pipet mới. Ngay khi xi gắn ổn định xong, các dòng điện đầu cuối về phía hERG được xác định khi khử cực màng tế bào đến điện áp -40 mV trong 50 ms tiếp theo là 500 ms ở +20 mV (sự hoạt hóa các kênh) từ điện thế giữ là -80 mV và khi tái phân cực sau đó thành -40 mV trong 500 ms. Protocol điện áp này được chạy ít nhất 10 lần ở các khoảng cách là 10 giây. Nếu cường độ dòng điện được đánh giá là quá thấp cho việc đo, thì tế bào khác được ghi. Ngay khi các lần ghi kiểm chứng đã được thực hiện, các tế bào được truyền liên tục bằng dung dịch bể chứa các mục thử nghiệm. Trong quá trình rửa các mục thử nghiệm, protocol điện áp được chỉ ở trên được chạy liên tục một lần nữa ở các khoảng 10 giây cho đến khi đạt đến mức phong bế ở trạng thái ổn định. Bốn mục nồng độ thử nghiệm của hợp chất được áp dụng lần lượt vào 3 tế bào theo cách dồn lại. Vì dòng điện đầu cuối hERG được ức chế bằng mục thử nghiệm, đường cong nồng độ-đáp ứng được tạo ra và tính được giá trị IC₅₀. Dựa vào giá trị IC₅₀ tính được IC₂₀. Mỗi nồng độ của mục thử nghiệm được phân tích trong ba thử nghiệm (n=3).

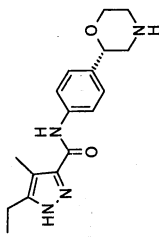
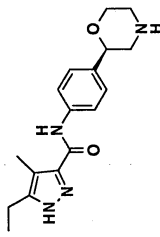
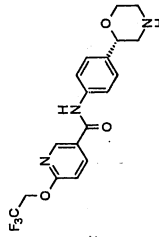
Tính vector lưỡng tính ($\Delta\Delta G_{am}$) và dự báo nguy cơ gây ra DIPL *in silico*

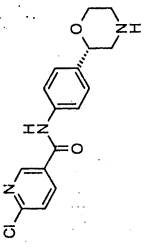
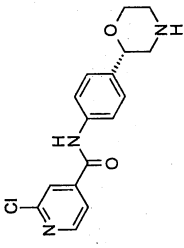
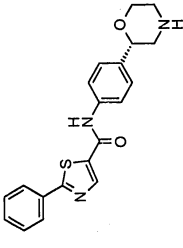
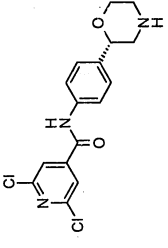
Vector lưỡng tính ($\Delta\Delta G_{am}$) và dự báo nguy cơ gây ra DIPL *in silico* được xác định bằng máy tính từ công thức cấu trúc phân tử đối với hợp chất có công thức I và các hợp chất so sánh theo thuật toán đã được công bố (Fischer, H.; Kansy, M.; Bur, D.; “CAFCA: a novel tool for the calculation of amphiphilic properties of charged drug molecules”. *Chimia* 2000, 54, 640-645; Fischer, H.; Atzpodien, E. A.; Csato, M.; Doessegger, L.; Lenz, B.; Schmitt, G.; Singer, T.; “*In silico* assay for assessing phospholipidosis potential of small drug like molecules: training, validation and refinement using several datasets.” *J. Med. Chem.* 2012, 55, 126–139).

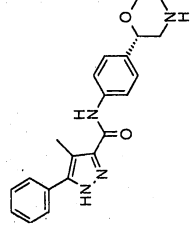
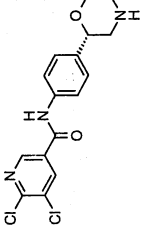
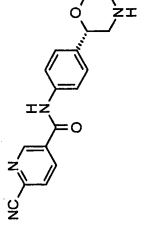
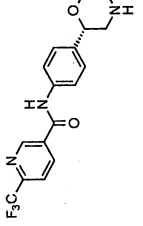
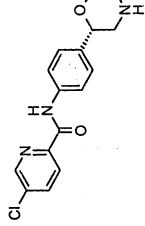
Hợp chất có công thức I có hoạt tính chủ vận một phần ở hTAAR1 (EC₅₀ tính theo μ M), ái lực gắn kết ở hDAT (K_i tính theo μ M), và hoạt tính phong bế kênh ở hERG (IC₂₀ và IC₅₀ tính theo μ M) như được thể hiện trong Bảng 1. Bảng 1 còn thể hiện vector lưỡng tính tính được ($\Delta\Delta G_{am}$ tính theo kJ mol⁻¹) và ước tính chứng loạn dưỡng phospholipit *in silico* (dự báo âm tính/dương tính/tiêm cận đối với DIPL *in vitro* và

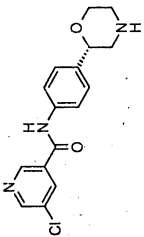
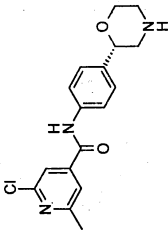
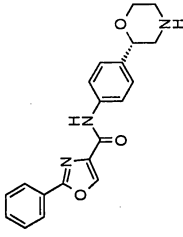
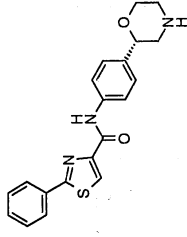
DIPL *in vivo*) đối với hợp chất có công thức I và các hợp chất so sánh, như được tính bằng cách sử dụng quy trình được mô tả ở trên.

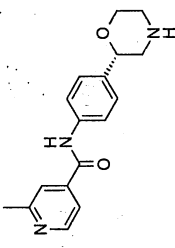
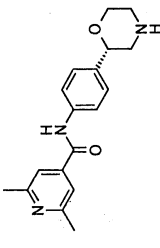
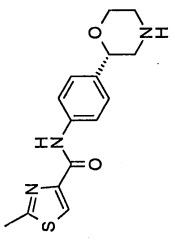
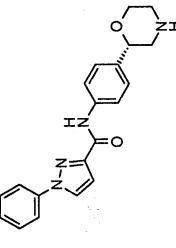
Bảng 1

Ví dụ số	Cấu trúc	EC ₅₀ trên hTAAR1 (μM)	hiệu quả của hTAAR1 * (%)	IC ₅₀ trên hERG (μM)	IC ₂₀ trên hERG (μM)	Tỷ lệ IC ₂₀ trên hERG / EC ₅₀ trên hTAAR1	Chứng loạn dưỡng phospholipit ΔΔG _{am} (kJ mol ⁻¹)	Chứng loạn dưỡng phospholipit <i>in silico</i> (<i>in vitro</i>)	Chứng loạn dưỡng phospholipit <i>in silico</i> (<i>in vivo</i>)	DAT K _i (μM)	Tỷ lệ K _i của DAT / EC ₅₀ trên hTAAR1
1		0,0585	42	216,60	36,20	619	-3,47	ÂM TÍNH	ÂM TÍNH	27,53	471
2		0,2632	38	-	-	-	-	-	-	-	-
3		0,0377	45	9,84	1,97	52	-6,3	DƯƠNG TÍNH	TIỆM CẬN	17,43	462

4		0,0619	49	49,67	12,42	201	-5,31	ÂM TÍNH	TIÊM CẬN	2,50	40
5		0,0656	40	81,71	22,16	338	-5,9	ÂM TÍNH	TIÊM CẬN	1,52	23
6		0,08	30	1,31	0,38	5	-8,46	DƯƠNG TÍNH	DƯƠNG TÍNH	5,93	74
7		0,0849	57	11,39	3,67	43	-7,41	DƯƠNG TÍNH	DƯƠNG TÍNH	0,79	9

8		0,1086	33	10,78	3,01	28	-4,89	ÂM TÍNH	ÂM TÍNH	9,77	90
9		0,1437	32	4,46	1,14	8	-8,83	DƯƠNG TÍNH	DƯƠNG TÍNH	0,48	3
10		0,1837	38	31,72	5,78	31	-3,11	ÂM TÍNH	ÂM TÍNH	11,30	62
11		0,2027	46	17,42	2,59	13	-6,18	DƯƠNG TÍNH	TIỆM CÂN	2,33	12
12		0,2119	40	14,26	3,21	15	-6,59	DƯƠNG TÍNH	TIỆM CÂN	1,78	8

13		0,4045	37	66,04	9,14	23	-6,23	DƯƠNG TÍNH	TIỆM CÂN	1,31	3
14		0,4467	53	73,18	21,63	48	-6,96	DƯƠNG TÍNH	TIỆM CÂN	7,32	16
15		0,6632	35	9,65	2,40	4	-7,4	DƯƠNG TÍNH	DƯƠNG TÍNH	>26,1	>39
16		0,666	35	8,98	3,35	5	-8,48	DƯƠNG TÍNH	DƯƠNG TÍNH	16,22	24

17		0,6727	45	518,2	129,5 5	193	-4,53	ÂM TÍNH	ÂM TÍNH	10,32	15
18		0,8271	63	711,5	146,7 8	177	-5,82	ÂM TÍNH	TIÊM CẬN	>26,1	>32
19		1,025	32	60,47	8,32	8	-4,59	ÂM TÍNH	ÂM TÍNH	21,9	21
20		2,480	59	10,75	2,49	1	-5,37	ÂM TÍNH	TIÊM CẬN	>26,1	>11

* % hoạt tính chủ vận trên *hTAAR1* được báo cáo theo định cỡ thang điểm sao cho hiệu quả của phối tử nội sinh β -phenyletylamin =

100% chủ vận

Bất ngờ đã phát hiện ra rằng hợp chất có công thức I (ví dụ 1) thể hiện sự kết hợp toàn bộ các đặc tính tốt hơn xét về hoạt tính chủ vận hiệu lực ở hTAAR1, độ chọn lọc cao so với hDAT, độ chọn lọc cao so với hERG, vector lưỡng tính thấp và do vậy có nguy cơ gây ra chứng loạn dưỡng phospholipit thấp so với các hợp chất TAAR1 khác đã biết trong lĩnh vực. Xem Bảng 1 cho thấy rằng hợp chất nêu trong ví dụ 1 có hoạt tính chủ vận một phần hiệu lực ở hTAAR1 ($EC_{50} = 0,059 \mu M$), có độ chọn lọc cao so với hDAT ($K_i = 27,5 \mu M$; tỷ lệ chọn lọc = 471 lần so với EC_{50} trên hTAAR1), có độ chọn lọc cao so với hERG ($IC_{20} = 36,2 \mu M$; tỷ lệ chọn lọc = 619 lần so với EC_{50} trên hTAAR1) và có vector lưỡng tính thấp ($\Delta\Delta G_{am} = -3,47 \text{ kJ mol}^{-1}$) bên dưới ngưỡng nhiều liên quan đến chứng loạn dưỡng phospholipit (dự báo nguy cơ *in silico* DIPL = âm tính).

Xem Bảng 1 xét về một hoặc nhiều khía cạnh cho thấy rằng các chất tương tự rất giống với hợp chất nêu trong ví dụ 1 có các đặc tính kém hơn so với hợp chất nêu trong ví dụ 1.

Ví dụ, hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 2, hợp chất này là chất đồng phân đối ảnh R của hợp chất nêu trong ví dụ 1, có ít hiệu lực ở hTAAR1 ($EC_{50} = 0,2632 \mu M$), chỉ ra rằng cấu hình S của hóa lập thể tuyệt đối, là như hợp chất trong ví dụ 1, được ưu tiên để thu được hiệu lực cao hơn ở hTAAR1.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 3 có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở hERG ($IC_{20} = 1,97 \mu M$; tỷ lệ chọn lọc = 52 lần so với EC_{50} trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn nhiều ($\Delta\Delta G_{am} = -6,3 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo nguy cơ gây ra DIPL dương tính.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 4 có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở DAT ($K_i = 2,5 \mu M$; tỷ lệ chọn lọc = 40 lần so với EC_{50} trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn ($\Delta\Delta G_{am} = -5,3 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo đường tiệm cận DIPL.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 5 có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở DAT ($K_i = 1,5 \mu M$; tỷ lệ chọn lọc = 23 lần so với EC_{50} trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn ($\Delta\Delta G_{am} = -5,9 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo đường tiệm cận DIPL.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 6 có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở hERG ($IC_{20} = 0,38 \mu M$; tỷ lệ chọn lọc = 5 lần so với EC_{50} trên hTAAR1), có hiệu lực nhiều hơn ở

DAT ($K_i = 5,9 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 74 lần so với EC_{50} trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn đáng kể ($\Delta\Delta G_{\text{am}} = -8,46 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo nguy cơ gây ra DIPL dương tính.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 7 có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở hERG ($\text{IC}_{20} = 3,57 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 43 lần so với EC_{50} trên hTAAR1), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở DAT ($K_i = 0,79 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 9 lần so với EC_{50} trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn đáng kể ($\Delta\Delta G_{\text{am}} = -7,41 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo nguy cơ gây ra DIPL dương tính.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 8 có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở hERG ($\text{IC}_{20} = 3,01 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 28 lần so với EC_{50} trên hTAAR1).

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 9 có ít hiệu lực ở hTAAR1 ($\text{EC}_{50} = 0,144 \mu\text{M}$), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở hERG ($\text{IC}_{20} = 1,14 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 8 lần so với EC_{50} trên hTAAR1), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở DAT ($K_i = 0,48 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 3 lần so với EC_{50} trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn đáng kể ($\Delta\Delta G_{\text{am}} = -8,83 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo nguy cơ gây ra DIPL dương tính.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 10 có ít hiệu lực ở hTAAR1 ($\text{EC}_{50} = 0,184 \mu\text{M}$) là hiệu lực nhiều hơn ở hERG ($\text{IC}_{20} = 5,78 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 31 lần so với EC_{50} trên hTAAR1).

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 11 có ít hiệu lực ở hTAAR1 ($\text{EC}_{50} = 0,203 \mu\text{M}$), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở hERG ($\text{IC}_{20} = 2,59 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 13 lần so với EC_{50} trên hTAAR1), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở DAT ($K_i = 2,33 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 12 lần so với EC_{50} trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn đáng kể ($\Delta\Delta G_{\text{am}} = -6,18 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo nguy cơ gây ra DIPL dương tính.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 12 có ít hiệu lực ở hTAAR1 ($\text{EC}_{50} = 0,212 \mu\text{M}$), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở hERG ($\text{IC}_{20} = 3,21 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 15 lần so với EC_{50} trên hTAAR1), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở DAT ($K_i = 1,78 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 8 lần so với EC_{50} trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn đáng kể ($\Delta\Delta G_{\text{am}} = -6,59 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo nguy cơ gây ra DIPL dương tính.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 13 có hiệu lực ít hơn đáng kể ở hTAAR1 ($\text{EC}_{50} = 0,405 \mu\text{M}$), có hiệu lực nhiều hơn ở hERG ($\text{IC}_{20} = 9,14 \mu\text{M}$; tỷ lệ chọn lọc = 23 lần so

với EC₅₀ trên hTAAR1), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở DAT (K_i = 1,31 μM; tỷ lệ chọn lọc = 3 lần so với EC₅₀ trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn đáng kể ($\Delta\Delta G_{am} = -6,23 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo nguy cơ gây ra DIPL dương tính.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 14 có hiệu lực ít hơn đáng kể ở hTAAR1 (EC₅₀ = 0,447 μM), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở DAT (K_i = 7,32 μM; tỷ lệ chọn lọc = 16 lần so với EC₅₀ trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn đáng kể ($\Delta\Delta G_{am} = -6,96 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo nguy cơ gây ra DIPL dương tính.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 15 có hiệu lực ít hơn đáng kể ở hTAAR1 (EC₅₀ = 0,663 μM), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở hERG (IC₂₀ = 2,40 μM; tỷ lệ chọn lọc = 4 lần so với EC₅₀ trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn đáng kể ($\Delta\Delta G_{am} = -7,4 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo nguy cơ gây ra DIPL dương tính.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 16 có hiệu lực ít hơn đáng kể ở hTAAR1 (EC₅₀ = 0,666 μM), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở hERG (IC₂₀ = 3,35 μM; tỷ lệ chọn lọc = 5 lần so với EC₅₀ trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn đáng kể ($\Delta\Delta G_{am} = -8,48 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo nguy cơ gây ra DIPL dương tính.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 17 có hiệu lực ít hơn đáng kể ở hTAAR1 (EC₅₀ = 0,673 μM) là hiệu lực nhiều hơn ở DAT (K_i = 10,32 μM; tỷ lệ chọn lọc = 15 lần so với EC₅₀ trên hTAAR1).

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 18 có hiệu lực ít hơn đáng kể ở hTAAR1 (EC₅₀ = 0,827 μM) và còn có vector lưỡng tính cao hơn ($\Delta\Delta G_{am} = -5,82 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo đường tiệm cận DIPL.

Hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 19 có hiệu lực ít hơn đáng kể ở hTAAR1 (EC₅₀ = 1,025 μM) là hiệu lực nhiều hơn ở hERG (IC₂₀ = 8,32 μM; tỷ lệ chọn lọc = 8 lần so với EC₅₀ trên hTAAR1).

Cuối cùng, hợp chất nêu trong ví dụ so sánh 20 có hiệu lực ít hơn đáng kể ở hTAAR1 (EC₅₀ = 2,48 μM), có hiệu lực nhiều hơn đáng kể ở hERG (IC₂₀ = 2,49 μM; tỷ lệ chọn lọc = 1 lần so với EC₅₀ trên hTAAR1) và còn có vector lưỡng tính cao hơn ($\Delta\Delta G_{am} = -5,37 \text{ kJ mol}^{-1}$) và như vậy dự báo đường tiệm cận DIPL.

Do đó, xem xét tất cả các số liệu trong Bảng 1, hợp chất có công thức I (ví dụ 1) là hợp chất được ưu tiên nhất được dùng làm chất trị liệu an toàn và hiệu quả để điều trị

các rối loạn liên quan đến TAAR1 ở người, đặc biệt là để điều trị các rối loạn CNS mạn tính, như bệnh trầm cảm, rối loạn lo âu, rối loạn lưỡng cực, rối loạn tăng động giảm chú ý (ADHD), rối loạn liên quan đến căng thẳng, các rối loạn tâm thần như bệnh tâm thần phân liệt, các bệnh tâm thần như bệnh Parkinson, các rối loạn thoái hóa thần kinh như bệnh Alzheimer, bệnh động kinh, chứng nhức nửa đầu, chứng tăng huyết áp, chứng nghiện chất, các rối loạn nghiện ma túy và biến đổi như rối loạn ăn uống, bệnh tiểu đường, các biến chứng của bệnh tiểu đường, bệnh béo phì, rối loạn mỡ máu, rối loạn tiêu thụ và đồng hóa năng lượng, các rối loạn và trục trặc cân bằng nội mô của nhiệt độ cơ thể, các rối loạn giấc ngủ và nhịp tim, và các rối loạn tim mạch. Các rối loạn được ưu tiên nhất là bệnh tâm thần phân liệt, rối loạn lưỡng cực hoặc trầm cảm.

Các hợp chất có công thức I và các muối được dụng của các hợp chất có công thức I có thể được dùng làm thuốc, ví dụ, ở dạng các chế phẩm được. Các chế phẩm được có thể được dùng qua đường miệng, ví dụ, ở dạng viên nén, viên nén được bao, viên bao đường, viên nang cứng và mềm, dung dịch, nhũ tương hoặc huyền phù. Tuy nhiên, việc dùng có thể được thực hiện qua trực tràng, ví dụ, ở dạng các viên thuốc đạn, hoặc ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, ở dạng dung dịch để tiêm.

Các hợp chất có công thức I có thể được điều chế cùng với chất mang vô cơ hoặc hữu cơ không có được tính để bào chế các chế phẩm được. Lactoza, tinh bột ngô hoặc các dẫn xuất của nó, bột talc, các axit stearic hoặc các muối của nó và các loại tương tự có thể được sử dụng, ví dụ, như các chất mang cho viên nén, viên nén được bao, viên bao đường và viên nang gelatin cứng. Các chất mang thích hợp cho viên nang gelatin mềm là, ví dụ, dầu thực vật, sáp, chất béo, các rượu polyhydric bán rắn và lỏng và các chất tương tự. Tuy nhiên, tùy thuộc vào bản chất của hoạt chất, trong trường hợp viên nang gelatin mềm thường không cần chất mang. Các chất mang thích hợp để tạo ra các dung dịch và si-rô, ví dụ, là nước, rượu polyhydric, glyxerol, dầu thực vật và các chất tương tự. Các chất mang thích hợp cho viên đạn là, ví dụ, dầu tự nhiên hoặc hóa rắn, sáp, chất béo, các rượu polyhydric bán rắn hoặc lỏng và các chất tương tự.

Ngoài ra, các chế phẩm được có thể chứa các chất bảo quản, các chất làm tan, chất làm ổn định, chất tạo ẩm, chất nhũ hóa, chất làm ngọt, các chất màu, chất tạo hương, các muối để làm thay đổi áp suất thẩm thấu, các chất đệm, chất che mùi hoặc chất chống oxy hóa. Chúng cũng có thể là các chất có tác dụng điều trị khác.

Các thuốc chứa hợp chất có công thức I hoặc muối được dụng của nó và chất mang không có tác dụng trị liệu cũng là đối tượng của sáng chế, cũng như quy trình để sản xuất các thuốc này, quy trình này bao gồm bước đưa hợp chất có công thức có công thức I và/hoặc các muối cộng axit được dụng và, nếu muốn, một hoặc nhiều chất có tác dụng điều trị khác cùng với một hoặc nhiều chất mang không có tác dụng trị liệu.

Các chỉ định bệnh được ưu tiên nhất theo sáng chế là các chỉ định bệnh mà bao gồm rối loạn của hệ thần kinh trung ương, ví dụ điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh trầm cảm, bệnh tâm thần phân liệt và rối loạn lưỡng cực.

Liều lượng có thể thay đổi trong khoảng giới hạn rộng và, tất nhiên, sẽ được điều chỉnh theo các yêu cầu riêng trong mỗi trường hợp cụ thể. Trong trường hợp dùng qua đường miệng, liều lượng cho người lớn có thể thay đổi từ 0,01 mg đến 1000 mg cho một ngày đối với hợp chất có công thức chung I hoặc lượng tương ứng của muối được dụng của nó. Liều lượng hàng ngày có thể được sử dụng dưới dạng liều đơn hoặc ở các liều chia nhỏ và, ngoài ra, giới hạn trên cũng có thể được vượt quá khi liều lượng này được cho là cần thiết.

Công thức bào chế viên nén (tạo hạt ướt)

Mục	Thành phần	mg/viên nén			
1.	Hợp chất có công thức I	5	25	100	500
2.	Lactosa DTG khan	125	105	30	150
3.	Sta-Rx 1500	6	6	6	30
4.	Xenluloza vi tinh thể	30	30	30	150
5.	Magie Stearat	1	1	1	1
	Tổng cộng	167	167	167	831

Quy trình sản xuất

1. Trộn các chất 1, 2, 3 và 4 và tạo hạt bằng nước tinh khiết.
2. Làm khô hạt ở nhiệt độ 50°C.
3. Đưa các hạt qua thiết bị nghiền thích hợp.
4. Bổ sung chất 5 và trộn trong ba phút; ép trên máy ép thích hợp.

Công thức bào chế viên nang

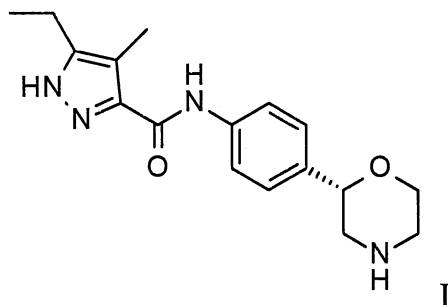
Mục	Thành phần	mg/viên nang			
1.	Hợp chất có công thức I	5	25	100	500
2.	Lactosa ngâm nước	159	123	148	---
3.	Tinh bột ngô	25	35	40	70
4.	Bột talc	10	15	10	25
5.	Magie Stearat	1	2	2	5
	Tổng cộng	200	200	300	600

Quy trình sản xuất

1. Trộn các chất 1, 2 và 3 trong thiết bị trộn thích hợp trong 30 phút.
2. Bổ sung các chất 4 và 5 và trộn trong 3 phút.
3. Nạp vào viên nang thích hợp.

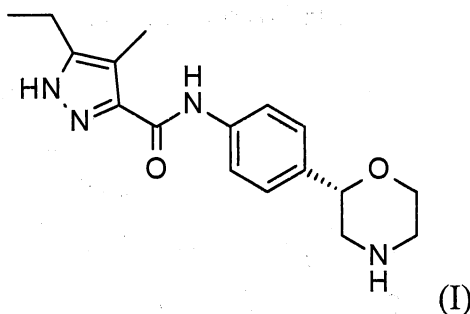
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức I:



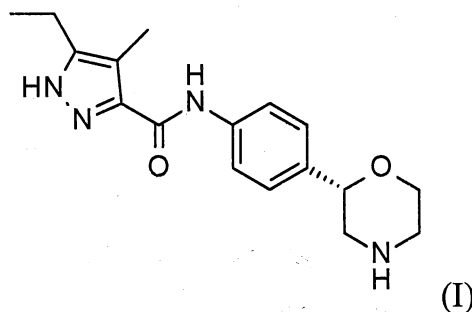
hợp chất này là 5-ethyl-4-metyl-*N*-[4-[(2*S*) morpholin-2-yl]phenyl]-1H-pyrazol-3-carboxamit, hoặc muối cộng axit có hoạt tính dược lý của nó.

2. Hợp chất có công thức I theo điểm 1,



hợp chất này là 5-ethyl-4-metyl-*N*-[4-[(2*S*) morpholin-2-yl]phenyl]-1H-pyrazol-3-carboxamit.

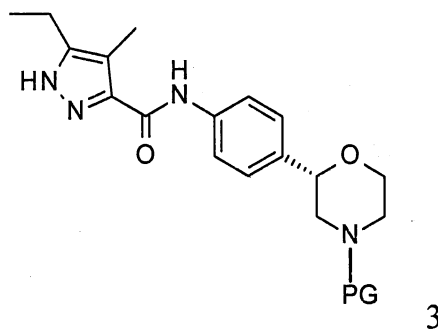
3. Muối cộng axit có hoạt tính dược lý của hợp chất có công thức I theo điểm 1,



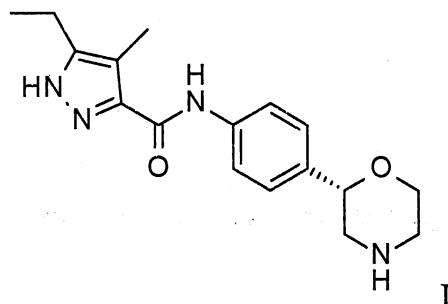
trong đó hợp chất này là 5-ethyl-4-metyl-*N*-[4-[(2*S*) morpholin-2-yl]phenyl]-1H-pyrazol-3-carboxamit.

4. Quy trình điều chế hợp chất có công thức I theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, quy trình này bao gồm bước:

a) tách loại nhóm bảo vệ N (PG) ra khỏi hợp chất có công thức 3:



để tạo ra hợp chất có công thức I:



trong đó PG là $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ -tert-butyl (BOC), và, nếu muốn,

b) chuyển hóa hợp chất có công thức I thu được các muối cộng axit dược dụng của nó.

5. Dược phẩm dùng qua đường miệng chứa hợp chất có công thức I theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó dược phẩm dùng qua đường miệng này là ở dạng được chọn từ nhóm bao gồm viên nén, viên nén được bao, viên bao đường, viên nang gelatin cứng và mềm, dung dịch, nhũ tương và huyền phù.