



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0029757

(51)⁷ C07D 263/34; A61K 31/421; A61P 9/12 (13) B

(21) 1-2017-03396

(22) 12/02/2016

(86) PCT/US2016/017699 12/02/2016

(87) WO 2016/133803 25/08/2016

(30) 62/118,067 19/02/2015 US

(45) 25/10/2021 403

(43) 26/03/2018 360A

(73) THERAVANCE BIOPHARMA R&D IP, LLC (US)

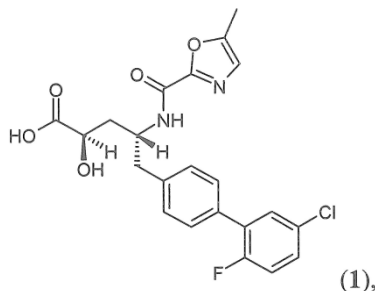
901 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, United States of America

(72) FLEURY, Melissa (CA); HUGHES, Adam D. (GB); BEAUSOLEIL, Anne-Marie (CA); FENSTER, Erik (CA); THALLADI, Venkat R. (IN); RAPTA, Miroslav (SK).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT AXIT (2R,4R)-5-(5'-CLO-2'-FLOBIPHENYL-4-YL)-2-HYDROXY-4-[(5-METYLOXAZOL-2-CACBONYL)AMINO]PENTANOIC, DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY VÀ QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ HỢP CHẤT NÀY

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



hoặc muối dược dụng của nó, và hợp chất có công thức cấu tạo nêu trên ở dạng tinh thể, có hoạt tính ức chế neprilysin. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này và quy trình điều chế hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất và dạng tinh thể của nó có hoạt tính ức chế neprilysin. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất nêu trên và quy trình điều chế hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Neprilysin (endopeptidaza trung tính, EC 3.4.24.11) (NEP), là Zn^{2+} metalopeptidaza liên kết màng nội mô được tìm thấy trong nhiều cơ quan và mô, bao gồm não, thận, phổi, ống dạ dày - ruột, tim, và hệ mạch ngoại vi. NEP làm thoái biến và bất hoạt nhiều peptit nội sinh, như enkephalin, bradykinin tuần hoàn, peptit angiotensin, và peptit natri lợi niệu, trong số đó peptit natri lợi niệu này có một số tác dụng bao gồm, ví dụ, làm giãn mạch và natri niệu/bài niệu, cũng như ức chế chứng phì đại tim và chứng xơ hóa não thất. Do đó, NEP đóng vai trò quan trọng đối với nội cân bằng huyết áp và sức khỏe tim mạch.

Các chất ức chế NEP, như thiorphan, candoxatril, và candoxatrilat, đã được nghiên cứu là các chất trị liệu tiềm năng. Hợp chất mà ức chế cả NEP và enzym chuyển hóa angiotensin-I (angiotensin-I converting enzyme - ACE) cũng đã được biết đến, và bao gồm omapatrilat, gempatrilat, và sampatrilat được đề cập đến là các chất ức chế vasopeptidaza. Nhóm các hợp chất omapatrilat, gempatrilat, và sampatrilat này được mô tả trong ấn phẩm Robl et al. (1999) *Exp. Opin. Ther. Patents* 9(12): 1665-1677.

Nhiều chất ức chế NEP được mô tả trong patent Mỹ số 8,263,629 của Coppola et al và patent Mỹ số 8,586,536 của Gendron et al. Nhiều trong số các hợp chất này có một hoặc nhiều tính chất mong muốn. Tuy nhiên, mặc dù đã có các hợp chất này nhưng vẫn cần phải có chất ức chế NEP tiềm năng có độ sinh khả dụng

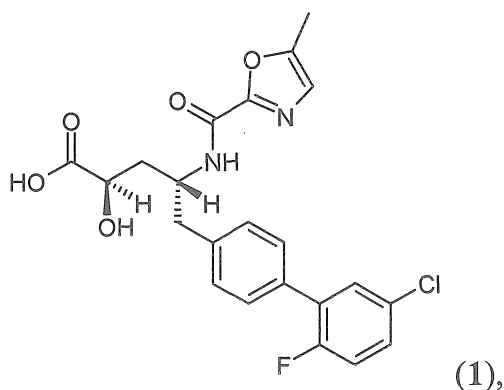
qua đường miệng cao và độ thanh thải thấp trong số tất cả các loài được thử nghiệm. Sáng chế này đề cập đến nhu cầu đó.

Ngoài ra, để sử dụng hiệu quả hợp chất ức chế NEP dưới dạng chất trị liệu, sẽ tốt hơn nếu có được hình dạng ở trạng thái rắn có thể sản xuất được dễ dàng và có độ ổn định vật lý và hóa học chấp nhận được. Ví dụ, sẽ tốt hơn nữa nếu có được dạng vật lý có thể ổn định nhiệt ở nhiệt độ cao vừa phải, nhờ đó tạo thuận lợi cho việc xử lý và bảo quản vật liệu. Chất rắn tinh thể thường được ưu tiên hơn các dạng vô định hình, để tăng cường độ tinh khiết và độ ổn định của sản phẩm được sản xuất. Tuy nhiên, việc tạo thành các dạng tinh thể của các hợp chất hữu cơ không thể dự đoán được một cách chính xác. Không có phương pháp đáng tin cậy nào, nếu có, dự đoán được dạng của hợp chất hữu cơ sẽ là dạng tinh thể. Ngoài ra, không có phương pháp nào, nếu có, dự đoán được dạng tinh thể sẽ có các tính chất vật lý được mong chờ là để sử dụng làm dược chất. Do đó, vẫn cần phải có dạng tinh thể ổn định có nhiệt độ nóng chảy cao vừa phải.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất mới (1) được phát hiện ra là mang hoạt tính ức chế enzym neprilysin (NEP). Do đó, hợp chất này được mong chờ là hữu dụng và có lợi làm chất trị liệu để điều trị các tình trạng bệnh lý như bệnh cao huyết áp, bệnh cao huyết áp phổi, bệnh suy tim và bệnh thận.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất axit (2R,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyl-oxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic (1):



hoặc muối dược dụng của nó. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dạng tinh

thể của hợp chất 1. Theo một phương án, dạng tinh thể (1') không được solvat hóa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa một hoặc nhiều chất mang được dụng và hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó. Các được phẩm như vậy tùy ý có thể chứa các chất trị liệu khác, gồm nhưng không bị giới hạn ở, chất đối kháng thụ thể AT₁, chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin, chất ức chế phosphodiesteraza (phosphodiesterase - PDE), chất ức chế renin, thuốc lợi tiểu, hoặc hỗn hợp của chúng.

Hợp chất 1 theo sáng chế mang hoạt tính ức chế enzym NEP, và do đó được mong chờ là hữu dụng làm chất trị liệu để điều trị cho bệnh nhân bị bệnh hoặc rối loạn mà được điều trị bằng cách ức chế enzym NEP hoặc bằng cách làm tăng các mức cơ chất peptit của nó.

Do hợp chất 1 theo sáng chế mang hoạt tính ức chế NEP, nên hợp chất này cũng hữu ích làm công cụ nghiên cứu. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng hợp chất 1 theo sáng chế làm công cụ nghiên cứu, phương pháp này bao gồm bước tiến hành thử nghiệm sinh học sử dụng hợp chất 1. Hợp chất 1 cũng có thể được sử dụng để đánh giá các hợp chất hóa học mới. Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp đánh giá hợp chất thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học, bao gồm các bước: (a) tiến hành thử nghiệm sinh học với hợp chất thử nghiệm để có được trị số thử nghiệm thứ nhất; (b) tiến hành thử nghiệm sinh học với hợp chất 1 để có được trị số thử nghiệm thứ hai; trong đó bước (a) được tiến hành trước, sau đó đến bước (b) hoặc đồng thời với bước (b); và (c) so sánh trị số thử nghiệm thứ nhất từ bước (a) với trị số thử nghiệm thứ hai từ bước (b). Các thử nghiệm sinh học lấy làm ví dụ bao gồm thử nghiệm ức chế enzym NEP. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp nghiên cứu mẫu hoặc hệ sinh học chứa enzym NEP, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho mẫu hoặc hệ sinh học này tiếp xúc với hợp chất 1; và (b) xác định các tác động gây ra bởi hợp chất 1 đối với mẫu hoặc hệ sinh học này.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất quy trình hữu ích để điều chế hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó.

Các khía cạnh và phương án khác của sáng chế đều được bộc lộ trong bản mô tả này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các khía cạnh khác của sáng chế được minh họa bằng cách tham khảo các hình vẽ đính kèm.

Fig.1 thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X (powder x-ray diffraction - PXRD) của axit (2R,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyl-oxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic dạng tinh thể không được solvat hóa (1').

Fig.2 thể hiện nhiệt đồ đo nhiệt lượng quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC) của dạng tinh thể không được solvat hóa (1').

Fig.3 thể hiện profin nhiệt trọng lượng đối với dạng tinh thể không được solvat hóa (1').

Fig.4 thể hiện đường đẳng nhiệt hấp phụ hơi ẩm động lực (dynamic moisture sorption - DMS) của dạng tinh thể không được solvat hóa (1').

Fig.5 là ảnh của kính hiển vi phân cực ánh sáng (polarized light microscope - PLM) của dạng tinh thể không được solvat hóa (1').

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit (2R,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyl-oxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic (1), hoặc muối được dụng của nó.

Hợp chất 1 theo sáng chế chứa hai tâm không đối xứng và do đó, hợp chất có công thức cấu tạo như vậy có thể tồn tại ở các dạng đồng phân lập thể khác nhau. Cụ thể, nguyên tử cacbon có thể có cấu hình cụ thể là (R,R), (S,S), (S,R), hoặc (R,S) hoặc thường xuất hiện nhiều ở dạng đồng phân lập thể có cấu hình như vậy. Hợp chất 1, như được thể hiện và được gọi tên có cấu hình (R, R). Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này nên hiểu rằng các chất đồng phân lập thể khác với các lượng rất nhỏ cũng có thể có mặt trong các chế phẩm theo sáng chế trừ khi

có quy định khác, với điều kiện là tính hữu dụng của toàn bộ chế phẩm không bị mất đi do sự có mặt của các chất đồng phân khác này. Các chất đồng phân lập thể riêng lẻ có thể được thu nhận bằng nhiều phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm kỹ thuật sắc ký không đối xứng sử dụng nền đỡ hoặc pha tĩnh không đối xứng thích hợp, hoặc bằng cách chuyển hóa chúng về mặt hóa học thành chất đồng phân không đối quang, tách các chất đồng phân không đối quang bằng các phương pháp thông thường như kỹ thuật sắc ký hoặc tái kết tinh, sau đó tái tạo chất đồng phân lập thể ban đầu.

Hợp chất 1 theo sáng chế mang hoạt tính ức chế neprilysin (NEP), tức là, hợp chất này có khả năng ức chế hoạt tính xúc tác của enzym. Một số đo về khả năng của hợp chất trong việc ức chế hoạt tính của NEP là hằng số ức chế (pK_i). Trị số pK_i là loga cơ số 10 âm của hằng số phân ly (K_i), thường được trích dẫn dưới dạng các đơn vị mol. Hợp chất theo sáng chế có pK_i ở NEP $\geq 9,0$. Các tính chất và tính hữu dụng khác của hợp chất 1 có thể được chứng minh bằng cách sử dụng các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, không kể những thử nghiệm khác, các thử nghiệm được mô tả trong patent Mỹ số 8,586,536.

Hợp chất 1, cũng như các hợp chất khác được sử dụng trong quy trình tổng hợp nó, có thể còn bao gồm các hợp chất được đánh dấu bằng chất đồng vị, tức là, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử được làm giàu các nguyên tử có nguyên tử khối khác với nguyên tử khối chiếm ưu thế được thấy trong tự nhiên. Các ví dụ về các chất đồng vị có thể được kết hợp vào các hợp chất được mô tả trong sáng chế, ví dụ, gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{36}Cl , và ^{18}F . Được quan tâm đặc biệt là hợp chất 1 được làm giàu triti hoặc cacbon-14 mà có thể được sử dụng, ví dụ, trong các nghiên cứu phân bố mô; Hợp chất 1 được làm giàu đoteri đặc biệt là tại vị trí chuyển hóa, tạo ra, ví dụ, hợp chất có độ ổn định chuyển hóa lớn hơn; và hợp chất 1 được làm giàu chất đồng vị phát xạ positron, như ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O và ^{13}N , mà có thể được sử dụng, ví dụ, trong các nghiên cứu chụp ảnh cắt lớp phát xạ positron (Positron Emission Topography - PET).

Các công thức cấu tạo hóa học được gọi tên trong bản mô tả này theo các

quy ước IUPAC như được thu nhận bằng cách sử dụng phần mềm ChemDraw (Perkin Elmer, Inc., Cambridge, MA).

Các định nghĩa

Khi mô tả các hợp chất, chế phẩm, phương pháp và quy trình theo sáng chế, các thuật ngữ nêu dưới đây có các nghĩa nêu dưới đây, trừ khi có quy định khác. Ngoài ra, trong bản mô tả này, các dạng số ít bao gồm cả các dạng số nhiều tương đương trừ khi ngữ cảnh sử dụng thể hiện rõ ràng theo cách khác. Các thuật ngữ "chứa", "bao gồm", và "có" được dự định là bao gồm và có nghĩa là có thể có các dấu hiệu bổ sung ngoài các dấu hiệu được liệt kê. Tất cả các số biểu hiện lượng của các thành phần, các tính chất như phân tử lượng, điều kiện phản ứng, và v.v. được sử dụng trong bản mô tả này sẽ được hiểu là được thay đổi trong tất cả các trường hợp bởi thuật ngữ "khoảng", trừ khi có quy định khác. Theo đó, các con số được thể hiện trong bản mô tả này là các con số xấp xỉ mà có thể thay đổi tùy thuộc vào các tính chất muốn đạt được được tìm kiếm bởi sáng chế. Ít nhất, và không phải là nỗ lực nhằm hạn chế việc áp dụng thuyết tương đương vào phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ, mỗi con số nên được hiểu ít nhất là theo các chữ số có ý nghĩa được trình bày và bằng cách áp dụng các kỹ thuật làm tròn thông thường.

Thuật ngữ "khoảng" hoặc "xấp xỉ" khi được sử dụng trong trường hợp mô tả về đặc tính nhiệt của hợp chất 1 được xác định là $\pm 1-3^{\circ}\text{C}$. Thuật ngữ "xấp xỉ" khi được sử dụng trong trường hợp mô tả % liều lượng của hợp chất 1 bài tiết trong nước tiểu được xác định bởi biên độ sai số thường gấp khoảng hai lần độ lệch chuẩn hoặc nửa độ rộng của khoảng tin cậy 95%. Thuật ngữ "xấp xỉ" trong các phần khác của bản mô tả có thể được sử dụng dùng để chỉ độ lệch chuẩn hoặc lượng biến đổi hoặc phân tán của tập hợp các trị số dữ liệu.

Thuật ngữ "giải phóng có kiểm soát" trong bản mô tả này là đồng nghĩa với giải phóng duy trì và giải phóng kéo dài và dùng để chỉ lượng thuốc được phân phối trong khoảng thời gian kéo dài cho đối tượng. Nói chung, các viên nén và viên nang giải phóng có kiểm soát giải phóng hoạt tính vào đối tượng trong khoảng thời gian bằng khoảng 8, 12, 16, và 24 giờ. Mặt khác, thuật ngữ "giải phóng tức thì" dùng để

chỉ hoạt tính được giải phóng ở đối tượng trong khoảng thời gian ngắn, thường là ít hơn khoảng 30 phút. Thuật ngữ “giải phóng trì hoãn” dùng để chỉ viên nén và viên nang giải phóng liều lượng được phẩm sau một khoảng thời gian đã định. Dạng liều lượng này thường được bao tan trong ruột để ngăn sự giải phóng trong dạ dày nhưng lại cho giải phóng trong ống ruột.

Trong bản mô tả này, cụm từ "thuộc công thức" hoặc "có công thức" không được dự định là làm giới hạn và được sử dụng theo cùng một cách mà thuật ngữ "chứa" thường được sử dụng. Ví dụ, nếu một công thức cấu tạo được mô tả, thì cần phải hiểu rằng tất cả các dạng đồng phân lập thể và tautome đều được bao gồm, trừ khi được chỉ ra khác đi.

Nhìn chung, khi mô tả được phẩm dạng rắn, thuật ngữ "không được solvat hóa" hàm ý là "không có dung môi". Do đó, khi dạng tinh thể theo sáng chế được mô tả là "không được solvat hóa", thì nó được hiểu rằng các hạt tinh thể về cơ bản chỉ chứa các phân tử axit (2*R*,4*R*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic; dạng này không chứa các phân tử dung môi có trong mạng tinh thể khác với lượng đáng kể, hoặc nói cách khác, dung môi không được kết hợp một cách đáng kể vào mạng tinh thể. Thuật ngữ “không được solvat hóa” cũng có nghĩa là không được hydrat hóa hoặc khan khi nước là dung môi.

Thuật ngữ “nhiệt độ nóng chảy” trong bản mô tả này có nghĩa là nhiệt độ mà tại đó quan sát thấy dòng thu nhiệt cực đại bằng phương pháp đo nhiệt lượng quét vi sai, đối với sự chuyển hóa nhiệt tương ứng với sự thay đổi pha từ rắn sang lỏng.

Thuật ngữ "được dụng" dùng để chỉ vật liệu mà không phải là không thể chấp nhận được về mặt sinh học hoặc về mặt khác khi được sử dụng trong sáng chế. Ví dụ, thuật ngữ "chất mang được dụng" dùng để chỉ vật liệu có thể được kết hợp vào được phẩm và được dụng cho bệnh nhân mà không gây ra các tác động sinh học không chấp nhận được hoặc tương tác theo cách không thể chấp nhận được với các thành phần khác của được phẩm. Các vật liệu được dụng như vậy thường đáp ứng các tiêu chuẩn cần thiết của thử nghiệm độc tính và sản xuất, và bao gồm các

vật liệu được xác nhận là các thành phần không có hoạt tính thích hợp bởi Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (U.S. Food and Drug administration).

Thuật ngữ "muối được dụng" dùng để chỉ muối được điều chế từ bazơ hoặc axit chấp nhận được để dùng cho bệnh nhân, như động vật có vú (ví dụ, các muối có độ an toàn chấp nhận được đối với động vật có vú để dùng cho chế độ cấp liều đã cho). Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng các muối thuộc phạm vi của sáng chế không nhất thiết phải là các muối được dụng, như các muối của các hợp chất trung gian mà không được dự định để dùng cho bệnh nhân. Muối được dụng có thể có nguồn gốc từ các bazơ vô cơ hoặc hữu cơ được dụng và từ các axit vô cơ hoặc hữu cơ được dụng. Ngoài ra, khi một hợp chất chứa cả gốc bazơ, như amin, pyridin hoặc imidazol, và gốc axit như axit carboxylic hoặc tetrazol, thì ion lưỡng tính có thể được tạo thành và được bao hàm trong thuật ngữ "muối" trong bản mô tả này. Các muối có nguồn gốc từ các bazơ vô cơ được dụng bao gồm các muối amoni, canxi, đồng, sắt, sắt (II), lithi, magie, mangan, mangan (II), kali, natri, và kẽm, và các muối tương tự như vậy. Các muối có nguồn gốc từ bazơ hữu cơ được dụng bao gồm các muối của các amin bậc một, bậc hai và bậc ba, bao gồm các amin được thế, amin vòng, amin có trong tự nhiên và các bazơ hữu cơ tương tự như vậy, như arginin, betain, cafein, cholin, *N,N'*-dibenzyletylendiamin, dietylamín, 2-dietylaminioetanol, 2-dimetylaminioetanol, etanolamin, etylendiamin, *N*-etylmorpholin, *N*-etylpiiperidin, glucamin, glucosamin, histidin, hydrabamin, isopropylamin, lysin, metylglucamin, morpholin, piperazin, piperadin, nhựa polyamin, procain, purin, theobromin, trietylamin, trimetylamin, tripropylamin, tromethamin và các bazơ hữu cơ tương tự. Các muối có nguồn gốc từ các axit vô cơ được dụng bao gồm các muối của axit boric, axit cacbonic, axit hydrohalic (bromhydric, clohydric, flohydric hoặc iothydric), axit nitric, axit phosphoric, axit sulfamic và axit sulfuric. Các muối có nguồn gốc từ được dụng axit hữu cơ bao gồm các muối của axit hydroxyl béo (ví dụ, axit xitric, axit gluconic, axit glycolic, axit lactic, axit lactobionic, axit malic, và axit tartaric), axit monocarboxylic béo (ví dụ, axit axetic, axit butyric, axit formic, axit propionic và axit trifloaxetic), axit amin (ví dụ, axit aspartic và axit glutamic), axit carboxylic thơm (ví dụ, axit

benzoic, axit p-clobenzoic, axit diphenylaxetic, axit gentisic, axit hipuric, và axit triphenylaxetic), axit hydroxyl thơm (ví dụ, axit o-hydroxybenzoic, axit p-hydroxybenzoic, axit 1-hydroxynaphtalen-2-carboxylic và axit 3-hydroxynaphtalen-2-carboxylic), axit ascorbic, axit dicarboxylic (ví dụ, axit fumaric, axit maleic, axit oxalic và axit succinic), axit glucuronic, axit mandelic, axit mucic, axit nicotinic, axit orotic, axit pamoic, axit pantothenic, axit sulfonic (ví dụ, axit benzensulfonic, axit camphosulfonic, axit edisylic, axit etansulfonic, axit isethionic, axit metansulfonic, axit naphtalensulfonic, axit naphtalen-1,5-disulfonic, axit naphtalen-2,6-disulfonic và axit p-toluensulfonic), axit xinafoic, và các axit tương tự như vậy.

Thuật ngữ "lượng cho tác dụng điều trị bệnh" dùng để chỉ lượng đủ để điều trị hiệu quả khi được dùng cho bệnh nhân cần điều trị, tức là, lượng thuốc cần để đạt được tác dụng điều trị bệnh mong muốn. Ví dụ, lượng cho tác dụng điều trị bệnh để điều trị bệnh cao huyết áp là lượng hợp chất cần để, ví dụ, làm giảm, ức chế, loại bỏ, hoặc ngăn ngừa các triệu chứng của bệnh cao huyết áp, hoặc để điều trị căn nguyên của bệnh cao huyết áp. Theo một phương án, lượng cho tác dụng điều trị bệnh là lượng thuốc cần để làm giảm huyết áp hoặc lượng thuốc cần để duy trì huyết áp bình thường. Mặt khác, thuật ngữ "lượng cho tác dụng" dùng để chỉ lượng đủ để đạt được kết quả mong muốn, mà có thể không nhất thiết phải là kết quả điều trị bệnh. Ví dụ, khi nghiên cứu hệ chứa enzym NEP, "lượng cho tác dụng" có thể là lượng cần để ức chế enzym này.

Thuật ngữ "điều trị" hoặc "việc điều trị" trong bản mô tả này có nghĩa là điều trị hoặc việc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế (như bệnh cao huyết áp) ở bệnh nhân, như động vật có vú (đặc biệt là người) mà bao gồm một hoặc nhiều mục đích trong số các mục đích sau đây: (a) ngăn ngừa không cho bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế xảy ra, tức là, ngăn ngừa sự tái phát của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế hoặc điều trị dự phòng cho bệnh nhân đã có khuynh hướng bị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế từ trước; (b) cải thiện bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế, tức là, loại bỏ hoặc làm thoái lui bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế ở bệnh nhân; (c) kìm hãm bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế, tức là, làm chậm hoặc kìm nén sự phát triển của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế ở bệnh nhân; hoặc (d) làm thuyên giảm các

triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế ở bệnh nhân. Ví dụ, thuật ngữ "điều trị bệnh cao huyết áp" sẽ bao gồm việc ngăn ngừa không cho bệnh cao huyết áp xảy ra, cải thiện bệnh cao huyết áp, kìm hãm bệnh cao huyết áp, và làm thuyên giảm các triệu chứng của bệnh cao huyết áp (ví dụ, làm hạ huyết áp). Thuật ngữ "đối tượng" hoặc "bệnh nhân" được dự định là bao gồm động vật có vú, như người, cần điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc hiện đang được điều trị để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế cụ thể, cũng như các đối tượng thử nghiệm trong đó hợp chất kết tinh đang được đánh giá hoặc đang được sử dụng trong thử nghiệm, ví dụ mô hình động vật.

Tất cả các thuật ngữ khác được sử dụng trong bản mô tả này được dự định là có nghĩa thông thường của chúng như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có liên quan.

Các quy trình tổng hợp chung

Hợp chất 1 theo sáng chế và dạng tinh thể không được solvat hóa của nó có thể được tổng hợp từ các vật liệu ban đầu đã có sẵn như được mô tả dưới đây và trong các ví dụ. Sẽ cần phải hiểu rằng, khi các điều kiện quy trình điển hình hoặc được ưu tiên (tức là, nhiệt độ phản ứng, thời gian phản ứng, tỷ lệ mol của chất phản ứng, dung môi, áp suất, v.v.) được nêu, thì các điều kiện quy trình khác cũng có thể được sử dụng trừ khi có quy định khác. Sẽ cần phải hiểu rằng, trong khi các điều kiện quy trình cụ thể (tức là, nhiệt độ kết tinh, thời gian kết tinh, tỷ lệ mol của chất phản ứng, dung môi, áp suất, v.v.) được nêu, thì các điều kiện quy trình khác cũng có thể được sử dụng trừ khi có quy định khác. Trong một số trường hợp, các phản ứng hoặc quy trình kết tinh được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng và không có phép đo nhiệt độ thực tế nào được thực hiện. Cần phải hiểu rằng nhiệt độ trong phòng có thể có nghĩa là nhiệt độ nằm trong khoảng thường liên quan đến nhiệt độ môi trường xung quanh trong môi trường phòng thí nghiệm, và sẽ thường nằm trong khoảng từ khoảng 15°C đến khoảng 30°C, như nằm trong khoảng từ khoảng 20°C đến khoảng 25°C. Trong các trường hợp khác, các phản ứng hoặc quy trình kết tinh được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng và nhiệt độ này được đo trên thực tế và được ghi lại.

Tỷ lệ mol bất kỳ được mô tả trong các phương pháp theo sáng chế có thể được xác định dễ dàng bằng các phương pháp khác nhau đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, tỷ lệ mol như vậy có thể được xác định dễ dàng bằng ^1H NMR. Theo cách khác, phép phân tích nguyên tố và phương pháp HPLC có thể được sử dụng để xác định tỷ lệ mol.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến axit $(2R,4R)$ -5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic (1) hoặc muối được dùng của nó.

Theo một phương án khác, hợp chất 1 có thể được điều chế bằng cách liên hợp etyl este của axit $(2R,4R)$ -4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxypentanoic với axit 2-metyloxazol-2-carboylic để tạo ra hợp chất 1.

Theo một phương án khác nữa, hợp chất 1 có thể được điều chế bằng cách (a) kết hợp axit 2-metyloxazol-2-carboylic và N,N,N',N' -tetrametyl-O-(7-azabenzotriazol-1-yl)uroni hexaflophosphat (HATU) trong N,N -dimetylformamit (DMF) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng; (b) bổ sung etyl este của axit $(2R,4R)$ -4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxypentanoic và N,N -diisopropyletylamin vào và khuấy ở nhiệt độ trong phòng; (c) tách và sau đó hòa tan chất rắn tạo thành trong etanol khô và tetrahydrofuran khô; (d) bổ sung dung dịch chứa lithi hydroxit trong nước; và (e) tách chất rắn tạo thành để tạo ra hợp chất 1. Chất rắn tạo thành trong các bước (c) và (e) trước đó cũng có thể được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký.

Việc điều chế dạng tinh thể thường được tiến hành trong chất pha loãng trợ thích hợp, các ví dụ về các chất pha loãng trợ này gồm, nhưng không bị giới hạn ở, axeton, axetonitril, etyl axetat, metyl etyl keton, metanol, etanol, isopropanol, isobutanol, diclometan, metyl *t*-butyl ete, xyclopentyl metyl ete, hexan, và các chất tương tự, và hỗn hợp của chúng, tùy ý có chứa nước. Hỗn hợp của các chất pha loãng trợ (còn được gọi là hệ dung môi) bao gồm axeton với nước, axetonitril với nước, etanol và etyl axetat, etyl axetat và hexan, và rượu bậc thấp ($\text{C}_{1-6}\text{alkyl-OH}$) với nước, ví dụ, metanol và nước và isopropanol và nước. Hệ dung môi đặc biệt

thích hợp bao gồm etyl axetat và hexan. Ngay khi hoàn thành quy trình kết tinh, hợp chất kết tinh có thể được tách khỏi hỗn hợp phản ứng bằng các phương pháp thông thường như kết tủa, lọc, cô đặc, ly tâm, sấy khô *in vacuo*, và các phương pháp tương tự.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến dạng tinh thể của axit (2*R*,4*R*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic. Theo một phương án khác, dạng tinh thể là dạng tinh thể không được solvat hóa của axit (2*R*,4*R*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic (1').

Theo một phương án khác, dạng tinh thể (1') có thể được điều chế bằng cách (a) hòa tan axit (2*R*,4*R*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic (1) trong etyl axetat và hexan để hòa tan hoàn toàn; và (b) tách chất rắn tạo thành để tạo ra dạng tinh thể (1'). Bước (a) thường được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng.

Theo một phương án khác nữa, dạng tinh thể (1') có thể được điều chế bằng cách (a) liên hợp etyl este của axit (2*R*,4*R*)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxypentanoic với natri 5-metyloxazol-2-carboxylat để tạo ra axit (2*R*,4*R*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic; (b) xử lý axit (2*R*,4*R*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic bằng etyl axetat và hexan để hòa tan hoàn toàn; và (c) tách chất rắn tạo thành để tạo ra dạng tinh thể (1').

Các tính chất kết tinh

Như đã biết rõ trong lĩnh vực phân tích nhiễu xạ bột tia X (PXRD), độ cao đỉnh tương đối của các mẫu PXRD tùy thuộc vào nhiều yếu tố liên quan đến việc điều chế mẫu và hình dạng của thiết bị, trong khi các vị trí đỉnh tương đối không nhạy với các chi tiết thử nghiệm. Các quy trình PXRD, đo nhiệt lượng quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC), phân tích nhiệt trọng lượng (thermal gravimetric analyses - TGA), và đánh giá sự hấp phụ hơi ẩm động lực (dynamic moisture sorption - DMS) (cũng được biết là quy trình phân tích giải hấp - hấp phụ

hơi ẩm) được tiến hành như được nêu trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến axit (2*R*,4*R*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyl-oxazol-2-cacbonyl)amino] pentanoic ở dạng tinh thể. Theo một phương án khác, dạng tinh thể không được solvat hóa (1') và được đặc trưng bởi mẫu PXRD, trong đó các vị trí đỉnh gần như phù hợp với các vị trí được thể hiện trên Fig. 1. Việc lồng vào đường chấm chấm trên Fig. 1 thể hiện mẫu được phóng đại y, để làm nổi bật các đỉnh với cường độ thấp hơn.

Các đỉnh với cường độ tương đối lớn hơn 1% diện tích được liệt kê trong bảng dưới đây. Mẫu này thể hiện các đỉnh nhiễu xạ rõ rệt nằm trong khoảng từ 5 đến 35° theo trị số 2θ. Các đỉnh này và các đỉnh khác trong mẫu nhiễu xạ có thể được sử dụng để nhận biết dạng này.

2θ*	d (Å)	Diện tích	% diện tích
7,51	11,77	769,8	3,0
8,48	10,42	25471,2	100,0
14,19	6,24	6344,6	24,9
16,09	5,51	246,5	1,0
17,03	5,20	3143,3	12,3
17,62	5,03	771,3	3,0
17,87	4,96	1491,9	5,9
18,70	4,74	579,1	2,3
19,21	4,62	538,0	2,1
19,40	4,57	653,4	2,6
20,59	4,31	1862,4	7,3
21,15	4,20	7421,4	29,1
21,64	4,10	600,3	2,4
21,88	4,06	1289,8	5,1
22,25	3,99	424,4	1,7
24,45	3,64	1608,3	6,3
24,78	3,59	1954,8	7,7
25,41	3,50	3196,3	12,5
25,67	3,47	1909,9	7,5
26,43	3,37	419,7	1,6
27,67	3,22	1377,9	5,4
28,22	3,16	1430,4	5,6
28,55	3,12	1242,2	4,9
30,73	2,91	1221,6	4,8
31,10	2,87	439,5	1,7
32,64	2,74	861,6	3,4

2 θ *	d (Å)	Diện tích	% diện tích
33,14	2,70	645,9	2,5
34,46	2,60	1246,1	4,9

*Trị số 2 θ được báo cáo dưới dạng trị số $\pm 0,20$.

Do đó, theo một phương án, dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi mẫu PXRD bao gồm các đỉnh nhiễu xạ tại trị số 2 θ bằng $8,48 \pm 0,20$, $14,19 \pm 0,20$, $17,03 \pm 0,20$, $21,15 \pm 0,20$, và $25,41 \pm 0,20$.

Theo một phương án khác, dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi mẫu PXRD bao gồm các đỉnh nhiễu xạ tại trị số 2 θ bằng $7,51 \pm 0,20$, $8,48 \pm 0,20$, $14,19 \pm 0,20$, $17,03 \pm 0,20$, $17,62 \pm 0,20$, $17,87 \pm 0,20$, $20,59 \pm 0,20$, $21,15 \pm 0,20$, $21,88 \pm 0,20$, $24,45 \pm 0,20$, $24,78 \pm 0,20$, $25,41 \pm 0,20$, $25,67 \pm 0,20$, $27,67 \pm 0,20$, và $28,22 \pm 0,20$.

Theo một phương án khác, dạng tinh thể 1' còn được đặc trưng bởi có một hoặc nhiều đỉnh nhiễu xạ bổ sung tại trị số 2 θ được chọn từ $16,09 \pm 0,20$, $18,70 \pm 0,20$, $19,21 \pm 0,20$, $19,40 \pm 0,20$, $21,64 \pm 0,20$, $22,25 \pm 0,20$, $26,43 \pm 0,20$, $28,55 \pm 0,20$, $30,73 \pm 0,20$, $31,10 \pm 0,20$, $32,64 \pm 0,20$, $33,14 \pm 0,20$, và $34,46 \pm 0,20$; và theo một phương án khác nữa, hợp chất kết tinh còn được đặc trưng bởi có ba hoặc nhiều hơn ba đỉnh nhiễu xạ bổ sung như vậy.

Theo một phương án, dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi nhiệt độ DSC hoặc vết phân tích nhiệt lượng quét vi sai về cơ bản phù hợp với dạng tinh thể được thể hiện trên Fig. 2. Dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi vết phân tích nhiệt lượng quét vi sai được ghi lại ở tốc độ gia nhiệt bằng 10°C trên mỗi phút mà thể hiện trị số cực đại trong dòng nhiệt thu nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 165°C đến 169°C . Nhiệt độ DSC hoặc vết phân tích nhiệt lượng quét vi sai minh họa đường thu nhiệt nóng chảy với đỉnh ở nhiệt độ khoảng $167,1^\circ\text{C}$, khởi đầu ở nhiệt độ khoảng $165,2^\circ\text{C}$, và với diện tích dưới đường thu nhiệt tương ứng với 114 J/g . Việc phân hủy hợp chất này rừng khớp với sự nóng chảy và sự đóng góp của 114 J/g vào entanpy nóng chảy không được thiết lập.

Theo một phương án, dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi profin TGA trên Fig. 3. Profin này không thể hiện sự giảm khối lượng cho đến nhiệt độ khoảng

150°C; hợp chất kết tinh phân hủy sau khi nóng chảy, như được quan sát bởi sự giảm trọng lượng đáng kể xuất hiện khi khởi đầu ở nhiệt độ xấp xỉ 159°C.

Theo một phương án, dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi đường đẳng nhiệt DMS trên Fig. 4. Dạng này là dạng rắn không hút ẩm. Tổng mức tăng thêm hơi ẩm quan sát được là nhỏ hơn 0,025% trọng lượng khi được tiếp xúc với độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 5 đến 70%. Tổng mức tăng thêm hơi ẩm nhỏ hơn 0,235% trọng lượng khi được tiếp xúc với độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 5 đến 90%. Không có hiện tượng trễ đáng kể nào được phát hiện thấy giữa hai chu kỳ hấp phụ - giải hấp liên tiếp. Chất rắn thu được sau các chu kỳ hấp phụ - giải hấp cho thấy cùng một mẫu PXRD làm vật liệu ban đầu, cho thấy rằng không có thay đổi về dạng sau thử nghiệm này.

Dạng tinh thể 1' có thể được đặc trưng bởi ảnh PLM trên Fig. 5, cho thấy dạng này là dạng tinh thể, khúc xạ kép, với các hạt có hình dạng từ hình kim mỏng đến hình bản mỏng.

Tính hữu dụng

Việc ngoại suy đặc tính của thuốc *in vitro* sang *in vivo* ở đối tượng tiếp tục được cải tiến (xem trong tài liệu, ví dụ, Chiba *et al.*, AAPS J., 2009 June; 11(2): 262-276). Theo sáng chế, hoạt tính ức chế neprilysin ở người *in vitro* được đánh giá (thử nghiệm 1) để xác định hoạt tính ức chế neprilysin của hợp chất 1. Ngưỡng $pK_i \geq 9,0$ là phù hợp. Tuy nhiên, các thử nghiệm *in vivo* khác nữa cũng được tiến hành thêm để dự đoán chính xác hơn đặc tính của hợp chất 1 ở đối tượng.

Liên quan đến đặc tính *in vivo*, cần có một số tính chất hữu ích để đánh giá xem liệu một lượng thuốc đủ có được phân phối vào huyết tương để đạt được lợi ích điều trị bệnh cần thiết hay không, ví dụ, độ thanh thải trong huyết tương thấp trong số tất cả các loài được thử nghiệm, độ sinh khả dụng qua đường miệng cao, hoạt lực có lợi của đáp ứng guanosin monophosphat vòng (cyclic guanosine monophosphat - cGMP) và độ thanh thải trong thận thấp đối với các đối tượng có chức năng thận giảm.

Theo sáng chế, các nghiên cứu dược động học trong tĩnh mạch và qua đường

miệng được tiến hành ở cả loài chuột và loài chó để xác định độ sinh khả dụng qua đường miệng của hợp chất 1 so với các chất ức chế neprilysin khác (thử nghiệm 2). Thử nghiệm này cũng được sử dụng để xác định tốc độ thanh thải trong huyết tương đối với các hợp chất này; tốc độ thanh thải thấp được cho là có thể dự đoán được xem hợp chất này được giữ lại trong quá trình lưu thông bao lâu, tức là, độ ổn định và độ bền *in vivo* mà không cần nhận diện các quy trình bài tiết riêng lẻ có liên quan. Ngoài ra, các nghiên cứu về độ sinh khả dụng qua đường miệng và tốc độ thanh thải trong huyết tương ở loài khỉ cũng được tiến hành (thử nghiệm 4).

Các nghiên cứu dược động học/dược lực học được tiến hành ở chuột thường để xác định mức ức chế neprilysin đạt được bởi hợp chất 1 so với các chất ức chế neprilysin khác (thử nghiệm 3). Trong thử nghiệm này, mức guanosin monophosphat vòng (cyclic guanosine monophosphat - cGMP) được đo. cGMP là phân tử tác động xuôi dòng của thụ thể gắn kết peptit natri lợi niệu và do đó đóng vai trò làm chỉ thị sinh học *in vivo* hiệu quả của hoạt tính peptit natri lợi niệu. Mức cGMP tăng khi động vật được cho dùng chất ức chế neprilysin so với giả dược. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng peptit natri lợi niệu tâm nhĩ (atrial natriuretic peptide - ANP) hoặc các mức cơ sở cGMP ở đối tượng bị bệnh cao huyết áp, bệnh suy tim, hoặc bệnh thận bao gồm bước cho đối tượng này dùng một lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó. Các mức ANP và cGMP được đo trong nước tiểu hoặc huyết tương hoặc cả hai ở đối tượng. Theo một phương án khác, mức ANP hoặc cGMP được tăng cao gấp ít nhất $\geq 1,1$ lần, $\geq 1,2$ lần, $\geq 1,3$ lần, $\geq 1,4$ lần, $\geq 1,5$ lần, ≥ 2 lần, ≥ 3 lần, ≥ 4 lần, hoặc ≥ 5 lần trong thời gian 24 giờ ở đối tượng khi được cho dùng một lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó.

Hợp chất 1 ức chế enzym NEP, và do đó được mong chờ là hữu dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh lý y tế đáp ứng với sự ức chế NEP. Do đó, mong chờ rằng bệnh nhân mắc bệnh hoặc rối loạn mà được điều trị bằng cách ức chế enzym NEP hoặc bằng cách làm tăng lượng cơ chất peptit của nó, có thể được điều trị bằng cách cho dùng một lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hợp chất 1. Ví dụ, bằng cách ức chế NEP, hợp chất 1 được mong chờ là tăng cường hiệu

lực cho các tác dụng sinh học của peptit nội sinh được chuyển hóa bằng NEP, như peptit natri lợi niệu, bombesin, bradykinin, canxitonin, endothelin, enkephalin, neurotensin, chất P và peptit ruột vận mạch. Do đó, hợp chất này được mong chờ là có các tác động sinh lý khác, ví dụ, đến hệ thận, hệ thần kinh trung ương, hệ sinh sản và hệ dạ dày-ruột.

Thuốc được loại ra khỏi cơ thể đối tượng bằng các quy trình thải bỏ khác nhau mà được phân loại chung là quy trình bài tiết và quy trình biến nạp sinh học. Quy trình bài tiết dùng để chỉ việc loại bỏ thuốc không dễ bay hơi còn nguyên chủ yếu bởi thận (cật) vào bàng quang, vào nước tiểu trong khi các con đường bài tiết khác bao gồm mật (gan), mồ hôi, nước bọt, sữa (thông qua sự tiết sữa) hoặc các dịch thể khác. Các thuốc dễ bay hơi như rượu và thuốc gây mê dạng khí được bài tiết thông qua phổi vào khí thở ra. Mặt khác, quy trình biến nạp sinh học, hoặc hiện tượng chuyển hóa thuốc, dùng để chỉ thuốc được chuyển hóa về mặt hóa học trong cơ thể thành sản phẩm chuyển hóa và thường là quy trình enzym. Ngoại lệ của trường hợp này là khi thuốc được thay đổi về mặt hóa học không cần đến enzym, ví dụ, sự thủy phân este. Enzym liên quan đến quy trình biến nạp sinh học thuốc chủ yếu nằm trong gan. Các mô khác như thận, phổi, ruột non và da cũng chứa các enzym chuyển hóa.

Các nghiên cứu dược động học cũng có thể được sử dụng để nghiên cứu các con đường thải bỏ ở đối tượng, ví dụ, thanh thải trong thận thông qua sự bài tiết thuốc đã được dùng trong nước tiểu theo thời gian. Sự bài tiết qua thận của hợp chất 1 ở các loài chuột thường, chó, và khỉ được tiến hành để đánh giá sự bài tiết qua thận dưới dạng con đường bài tiết (thử nghiệm 5). Con đường thải bỏ này là quan trọng đối với các đối tượng có chức năng thận giảm và cần đến các liệu pháp được thanh thải tối thiểu bằng sự bài tiết qua thận. Theo một phương án, sự bài tiết qua thận của hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó ở đối tượng là xấp xỉ $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1\%$ hoặc $\leq 0,5\%$ liều đã được dùng trong thời gian trên 24 giờ.

Như được mô tả trong phần thử nghiệm dưới đây, cùng với hợp chất 1 trong thử nghiệm enzym NEP *in vitro*, và trong các phương pháp xác định *in vivo* về độ thanh thải trong huyết tương, độ sinh khả dụng qua đường miệng, và sự bài tiết qua

thận ở nhiều loài động vật, là hợp chất so sánh có công thức hóa học tương tự. Đáng ngạc nhiên là, quan sát thấy các chênh lệch đáng kể về kết quả. Trong khi các hợp chất so sánh riêng lẻ thể hiện các tính chất tương tự với các tính chất của hợp chất 1 trong một hoặc nhiều thử nghiệm, thì chỉ có hợp chất 1 là thể hiện, cùng một lúc, hoạt tính ức chế neprilysin ở người cao, độ sinh khả dụng qua đường miệng cao, độ thanh thải trong huyết tương thấp, hoạt lực của cGMP gia tăng và mức độ bài tiết qua thận thấp được mong chờ là có thể đặc biệt hữu dụng để điều trị bệnh.

Bệnh về tim mạch

Nhờ tăng cường hiệu lực cho các tác dụng của các peptit hoạt mạch như peptit natri lợi niệu và bradykinin, hợp chất 1 được mong chờ là hữu dụng trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa các tình trạng bệnh lý y tế như các bệnh về tim mạch. Xem, ví dụ, ấn phẩm Roques et al. (1993) *Pharmacol. Rev.* 45:87-146 và Dempsey et al. (2009) *Amer. J. of Pathology* 174(3):782-796. Bệnh về tim mạch được quan tâm đặc biệt bao gồm bệnh cao huyết áp và bệnh suy tim. Bệnh cao huyết áp bao gồm, chỉ nhằm minh họa và không làm giới hạn sáng chế: bệnh cao huyết áp nguyên phát, cũng được gọi là bệnh cao huyết áp vô căn hoặc bệnh cao huyết áp tự phát; bệnh cao huyết áp thứ phát; bệnh cao huyết áp có kèm theo các bệnh thận; bệnh cao huyết áp nghiêm trọng có kèm theo hoặc không kèm theo các bệnh thận; bệnh cao huyết áp phổi, bao gồm bệnh cao huyết áp động mạch phổi; và bệnh cao huyết áp kháng trị. Bệnh suy tim bao gồm, chỉ nhằm minh họa và không làm giới hạn sáng chế: bệnh suy tim xung huyết; bệnh suy tim cấp tính; bệnh suy tim mạn tính, ví dụ với phân suất tổng máu thất trái giảm (còn được gọi là bệnh suy tim tâm thu) hoặc với phân suất tổng máu thất trái được duy trì (còn được gọi là bệnh suy tim tâm trương); và bệnh suy tim mất bù cấp và mạn tính. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh cao huyết áp, đặc biệt là bệnh cao huyết áp nguyên phát hoặc bệnh cao huyết áp động mạch phổi, bao gồm bước cho bệnh nhân dùng một lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hợp chất 1.

Để điều trị bệnh cao huyết áp nguyên phát, lượng cho tác dụng điều trị bệnh thường là lượng đủ để làm hạ huyết áp của bệnh nhân. Bệnh này bao gồm cả bệnh cao huyết áp từ nhẹ đến vừa phải và bệnh cao huyết áp nghiêm trọng. Khi được sử

dụng để điều trị bệnh cao huyết áp, hợp chất 1 có thể được sử dụng kết hợp với các chất trị liệu khác như chất đối kháng aldosteron, chất ức chế aldosteron synthaza, chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin và enzym chuyển hóa angiotensin tác động kép/chất ức chế neprilysin, các chất hoạt hóa và chất kích thích enzym chuyển hóa angiotensin 2 (ACE2), vacxin angiotensin-II, chất chống bệnh đái đường, chất kháng lipid, chất chống huyết khối, chất đối kháng thụ thể AT_1 và chất đối kháng thụ thể/chất ức chế neprilysin AT_1 tác động kép, chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin β_1 , chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin β /chất đối kháng thụ thể α_1 , các chất phong bế kênh canxi, thuốc lợi tiểu, chất đối kháng thụ thể endothelin, chất ức chế enzym chuyển hóa endothelin, chất ức chế neprilysin, peptit natri lợi niệu và các chất tương tự của chúng, chất đối kháng thụ thể thanh thải peptit natri lợi niệu, chất cho nitơ oxit, chất kháng viêm không steroid, chất ức chế phosphodiesteraza (đặc biệt là chất ức chế PDE-V), chất chủ vận thụ thể prostaglandin, chất ức chế renin, chất kích thích và chất hoạt hóa guanylat xyclaza dễ tan, và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, hợp chất theo sáng chế được kết hợp với chất đối kháng thụ thể AT_1 , chất phong bế kênh canxi, thuốc lợi tiểu, hoặc hỗn hợp của chúng, và được sử dụng để điều trị bệnh cao huyết áp nguyên phát. Theo một phương án cụ thể khác của sáng chế, hợp chất theo sáng chế được kết hợp với chất đối kháng thụ thể AT_1 , và được sử dụng để điều trị bệnh cao huyết áp có kèm theo các bệnh thận. Khi được sử dụng để điều trị bệnh cao huyết áp kháng trị, hợp chất này có thể được sử dụng kết hợp với các chất trị liệu khác như chất ức chế aldosteron synthaza.

Để điều trị bệnh cao huyết áp động mạch phổi, lượng cho tác dụng điều trị bệnh thường là lượng đủ để làm giảm trở kháng mạch phổi. Các đích điều trị khác là nhằm cải thiện khả năng vận động của bệnh nhân. Ví dụ, trong thử nghiệm lâm sàng, lượng cho tác dụng điều trị bệnh có thể là lượng cải thiện khả năng đi bộ một cách thoải mái của bệnh nhân trong khoảng thời gian là 6 phút (bao gồm khoảng cách nằm trong khoảng từ 20 đến 40 mét). Khi được sử dụng để điều trị bệnh cao huyết áp động mạch phổi, hợp chất 1 có thể được sử dụng kết hợp với các chất trị liệu khác như chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin α , chất đối kháng thụ

thể tác động kiểu adrenalin β_1 , chất chủ vận thụ thể tác động kiểu adrenalin β_2 , chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin, chất chống đông, chất phong bế kênh canxi, thuốc lợi tiểu, chất đối kháng thụ thể endothelin, chất ức chế PDE-V, các chất tương tự prostaglandin, chất ức chế sự tái hấp thu serotonin chọn lọc, và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, hợp chất 1 được kết hợp với chất ức chế PDE-V hoặc chất ức chế sự tái hấp thu serotonin chọn lọc và được sử dụng để điều trị bệnh cao huyết áp động mạch phổi.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp xử lý bệnh suy tim, cụ thể là bệnh suy tim xung huyết (bao gồm cả bệnh suy tim xung huyết tâm trương và tâm thu), bao gồm bước cho bệnh nhân dùng một lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hợp chất 1. Thông thường, lượng cho tác dụng điều trị bệnh là lượng đủ để làm hạ huyết áp và/hoặc cải thiện chức năng thận. Trong thử nghiệm lâm sàng, lượng cho tác dụng điều trị bệnh có thể là lượng đủ để cải thiện huyết động tim, ví như làm giảm áp suất nêm, áp suất nhĩ phải, áp suất chứa đầy, và trở kháng mạch. Theo một phương án, hợp chất này được sử dụng ở dạng liều lượng dùng trong tĩnh mạch. Khi được sử dụng để điều trị bệnh suy tim, hợp chất 1 có thể được sử dụng kết hợp với các chất trị liệu khác như chất đối kháng thụ thể adenosin, chất phá vỡ sản phẩm cuối của quá trình glycat nâng cao, chất đối kháng aldosteron, chất đối kháng thụ thể AT_1 , chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin β_1 , chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin β tác động kép/chất đối kháng thụ thể α_1 , chất ức chế chymaza, digoxin, thuốc lợi tiểu, chất ức chế enzym chuyển hóa endothelin (ECE), chất đối kháng thụ thể endothelin, peptit natri lợi niệu và các chất tương tự của chúng, chất đối kháng thụ thể thanh thải peptit natri lợi niệu, chất cho nitơ oxit, các chất tương tự prostaglandin, chất ức chế PDE-V, chất hoạt hóa và chất kích thích guanylat xyclaza dễ tan, và chất đối kháng thụ thể vasopresin. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, hợp chất 1 được kết hợp với chất đối kháng aldosteron, chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin β_1 , chất đối kháng thụ thể AT_1 , hoặc thuốc lợi tiểu, và được sử dụng để điều trị bệnh suy tim xung huyết.

Bệnh tiêu chảy

Với vai trò là chất ức chế NEP, hợp chất 1 được mong chờ là ức chế sự thoái biến các enkephalin nội sinh và do đó hợp chất như vậy cũng có thể hữu ích trong điều trị bệnh tiêu chảy, bao gồm bệnh tiêu chảy do nhiễm khuẩn và bệnh tiêu chảy mất nước/bệnh tiêu chảy xuất tiết. Xem, ví dụ, ấn phẩm Baumer et al. (1992) *Gut* 33:753-758; Farthing (2006) *Digestive Diseases* 24:47-58; và Marçais-Collado (1987) *Eur. J. Pharmacol.* 144(2):125-132. Khi được sử dụng để điều trị bệnh tiêu chảy, hợp chất 1 có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất chống tiêu chảy bổ sung.

Bệnh thận

Nhờ tăng cường hiệu lực cho các tác dụng của peptit hoạt mạch như các peptit natri lợi niệu và bradykinin, hợp chất 1 được mong chờ là sẽ tăng cường chức năng thận (xem ấn phẩm Chen et al. (1999) *Circulation* 100:2443-2448; Lipkin et al. (1997) *Kidney Int.* 52:792-801; và Dussaule et al. (1993) *Clin. Sci.* 84:31-39) và hữu dụng trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh thận ở đối tượng bị suy thận. Các bệnh thận được quan tâm đặc biệt bao gồm bệnh thận đái tháo đường, bệnh thận mạn tính, chứng protein niệu, và đặc biệt là tổn thương thận cấp (nguyên nhân là do, ví dụ, phẫu thuật tim mạch, hóa trị, hoặc sử dụng thuốc nhuộm tương phản trong chẩn đoán hình ảnh y học) hoặc bệnh suy thận cấp tính (xem ấn phẩm Sharkovska et al. (2011) *Clin. Lab.* 57:507-515 và Newaz et al. (2010) *Renal Failure* 32:384-390).

Đối tượng bị suy thận mắc bệnh thận mạn tính (CKD) có thể được phân nhóm theo các chỉ dẫn theo Sáng kiến chất lượng tiên lượng bệnh thận-Hội đồng thận học Quốc gia (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative-NKF KDOQI). Ngay khi mắc bệnh thận mạn tính, tức là, sự hư hại thận hoặc độ lọc cầu thận (glomerular filtration rate - GFR) $<60 \text{ mL/phút/1,73m}^2 \geq 3$ tháng, thì giai đoạn bệnh có thể được chỉ định theo phân loại KDOQI CKD. Các giai đoạn này bao gồm Giai đoạn 1 (sự hư hại thận với GFR bình thường hoặc gia tăng): $\text{GFR} \geq 90$; Giai đoạn 2 (sự hư hại thận với GFR giảm vừa phải): $\text{GFR } 60\text{-}89$; Giai đoạn 3 (GFR giảm vừa phải): $\text{GFR } 30\text{-}59$; Giai đoạn 4 (GFR giảm nghiêm

trọng): GFR 15-29; và Giai đoạn 5 (suy thận): GFR <15 (hoặc lọc máu). GFR được xác định theo đơn vị là mL/phút/1,73m².

Một phương án bao gồm phương pháp điều trị cho đối tượng bị suy thận bao gồm bước dùng một lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó, cụ thể là dạng tinh thể 1'. Phương pháp này còn bao gồm bước điều trị cho đối tượng bị suy thận có bệnh cao huyết áp hoặc bệnh suy tim. Khi được sử dụng để điều trị bệnh thận, hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó, cụ thể là dạng tinh thể 1' có thể được sử dụng kết hợp với các chất trị liệu khác như chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin, chất đối kháng thụ thể AT₁, và thuốc lợi tiểu.

Một phương án khác bao gồm phương pháp điều trị cho đối tượng bị suy thận mắc bệnh thận mạn tính với độ lọc cầu thận ước tính (estimated glomerular filtration rate - eGFR) nằm trong khoảng từ 60 mL/phút/1,73m² đến 15 mL/phút/1,73m² bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng một lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó, cụ thể là dạng tinh thể 1'. Một phương án khác bao gồm phương pháp điều trị cho đối tượng bị suy thận mắc bệnh thận mạn tính với độ lọc cầu thận (estimated glomerular filtration rate - eGFR) ước tính ≥ 90 mL/phút/1,73m² (giai đoạn 1) hoặc eGFR <15 mL/phút/1,73m² (giai đoạn 5) bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng một lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó, cụ thể là dạng tinh thể 1'. Đối với các mục đích của sáng chế, bệnh thận nghiêm trọng có thể được phân loại khi eGFR <30 mL/phút/1,73m². Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng bị suy thận mắc bệnh thận mạn tính được phân loại là giai đoạn 1, giai đoạn 2, giai đoạn 3, giai đoạn 4, giai đoạn 5 hoặc các khoảng eGFR trên một hoặc nhiều giai đoạn này bằng hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó, cụ thể là dạng tinh thể 1'.

Liệu pháp ngăn ngừa

Nhờ tăng cường hiệu lực cho các tác dụng của peptit natri lợi niệu, hợp chất 1 cũng được mong chờ là hữu dụng trong liệu pháp ngăn ngừa, do tác dụng chống phù đại và chống xơ hóa của peptit natri lợi niệu (xem ấn phẩm Potter et al. (2009)

Handbook of Experimental Pharmacology 191:341-366), chẳng hạn như trong ngăn ngừa sự tiến triển của chứng suy tim sau khi bị nhồi máu cơ tim, ngăn ngừa sự tái phát hẹp động mạch sau khi phẫu thuật tạo hình mạch, ngăn ngừa sự dày lên của thành mạch máu sau khi phẫu thuật mạch máu, ngăn ngừa xơ vữa động mạch, và ngăn ngừa bệnh mạch máu do đái tháo đường.

Bệnh tăng nhãn áp

Nhờ tăng cường hiệu lực cho các tác dụng của peptit natri lợi niệu, hợp chất 1 được mong chờ là hữu dụng để điều trị bệnh tăng nhãn áp. Xem, ví dụ, ấn phẩm Diestelhorst et al. (1989) *International Ophthalmology* 12:99-101. Khi được sử dụng để điều trị bệnh tăng nhãn áp, hợp chất 1 có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất chống tăng nhãn áp bổ sung.

Giảm đau

Với vai trò là chất ức chế NEP, hợp chất 1 được mong chờ là ức chế sự thoái biến của các enkephalin nội sinh và vì thế hợp chất này cũng có thể hữu dụng làm thuốc giảm đau. Xem, ví dụ, ấn phẩm Roques et al. (1980) *Nature* 288:286-288 và Thanawala et al. (2008) *Current Drug Targets* 9:887-894. Khi được sử dụng để điều trị cơn đau, hợp chất 1 có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất chống cảm thụ đau bổ sung như chất ức chế aminopeptidaza N hoặc dipeptidyl peptidaza III, chất kháng viêm không steroid, chất ức chế sự tái hấp thu monoamin, chất giãn cơ, chất đối kháng thụ thể NMDA, chất chủ vận thụ thể opioit, chất chủ vận thụ thể serotonin 5-HT_{1D}, và các chất chống trầm cảm dạng ba vòng.

Các tính hữu dụng khác

Do các tính chất ức chế NEP của nó, nên hợp chất 1 cũng được mong chờ là hữu dụng làm thuốc chống ho, cũng như hữu dụng trong điều trị bệnh cao huyết áp cửa liên quan đến bệnh xơ gan (xem ấn phẩm Sansoe et al. (2005) *J. Hepatol.* 43:791-798), bệnh ung thư (xem ấn phẩm Vesely (2005) *J. Investigative Med.* 53:360-365), bệnh trầm cảm (xem ấn phẩm Noble et al. (2007) *Exp. Opin. Ther. Targets* 11:145-159), rối loạn kinh nguyệt, sinh non, tiền sản giật, bệnh lạc nội mạc tử cung, rối loạn sinh sản (ví dụ, vô sinh ở nam và nữ, hội chứng buồng trứng đa

nang, thất bại cấy ghép), và rối loạn chức năng tình dục ở nam và nữ, bao gồm rối loạn cương ở nam và rối loạn hưng phấn tình dục ở nữ. Cụ thể hơn, hợp chất 1 được mong chờ là hữu dụng trong điều trị rối loạn chức năng tình dục ở nữ (xem ấn phẩm Pryde et al. (2006) *J. Med. Chem.* 49:4409-4424), mà thường được định nghĩa là sự khó khăn hoặc sự bất lực của bệnh nhân nữ trong việc thấy thỏa mãn xúc cảm tình dục. Bệnh này bao gồm nhiều loại rối loạn hoạt động tình dục nữ khác nhau bao gồm, chỉ nhằm minh họa và không làm giới hạn sáng chế, rối loạn suy giảm ham muốn tình dục, rối loạn hưng phấn tình dục, rối loạn cực khoái và rối loạn đau khi quan hệ tình dục. Khi được sử dụng để điều trị các rối loạn như vậy, đặc biệt là rối loạn chức năng tình dục ở nữ, hợp chất theo sáng chế có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất thứ yếu sau đây: chất ức chế PDE-V, chất chủ vận dopamin, chất chủ vận thụ thể estrogen và/hoặc chất đối kháng, androgen, và estrogen. Do tính chất ức chế NEP của nó, nên hợp chất 1 cũng được mong chờ là có tính chất chống viêm, và được mong chờ là có tính hữu dụng như vậy, đặc biệt là khi được sử dụng kết hợp với statin.

Các nghiên cứu mới đây đề xuất rằng NEP có vai trò trong việc điều hòa chức năng thần kinh ở bệnh đái tháo đường do thiếu hụt insulin và béo phì do chế độ ăn gây ra. Coppey et al. (2011) *Neuropharmacology* 60:259-266. Do đó, do tính chất ức chế NEP của nó, nên hợp chất 1 cũng được mong chờ là hữu dụng trong việc đem lại sự bảo vệ khỏi chứng suy giảm chức năng thần kinh gây ra bởi bệnh đái tháo đường hoặc béo phì do chế độ ăn gây ra.

Lượng hợp chất 1 dùng trong mỗi liều lượng hoặc tổng lượng dùng mỗi ngày có thể được định trước hoặc có thể được xác định dựa theo từng bệnh nhân cụ thể bằng việc xem xét nhiều yếu tố, bao gồm bản chất và độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý của bệnh nhân, tình trạng bệnh lý đang được điều trị, độ tuổi, cân nặng, và tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân, khả năng dung nạp hoạt chất ở bệnh nhân, đường dùng, các chỉ tố đánh giá dược lý như các profin hoạt tính, độ hiệu nghiệm, dược động học và độc tính của hợp chất và các chất thứ yếu bất kỳ được dùng, và các yếu tố tương tự. Việc điều trị cho bệnh nhân bị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế (như bệnh cao huyết áp) có thể bắt đầu với liều định trước hoặc

liều lượng được xác định bởi bác sỹ điều trị, và sẽ tiếp tục trong một khoảng thời gian cần để ngăn ngừa, cải thiện, kìm hãm, hoặc làm thuyên giảm các triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế này. Bệnh nhân nhận điều trị như vậy thường sẽ được theo dõi trên cơ sở định kỳ để xác định hiệu quả trị liệu. Ví dụ, trong điều trị bệnh cao huyết áp, đo huyết áp có thể được sử dụng để xác định hiệu quả điều trị. Các chất chỉ thị tương tự dùng cho các bệnh và tình trạng bệnh lý khác được nêu trong bản mô tả này, cũng được biết rõ và dễ dàng mua được đối với bác sỹ điều trị. Việc bác sỹ theo dõi liên tục sẽ bảo đảm rằng hợp chất 1 sẽ được dùng với lượng tối ưu trong thời gian cho trước bất kỳ, cũng như tạo thuận lợi cho việc xác định khoảng thời gian điều trị. Đặc biệt đây là trị số khi các chất thứ yếu cũng được dùng, do sự lựa chọn, liều lượng, và khoảng thời gian trị liệu của chúng cũng có thể cần đến sự điều chỉnh. Theo cách này, chế độ điều trị và lịch trình dùng liều có thể được điều chỉnh trong khoảng thời gian điều trị sao cho hoạt chất biểu hiện hiệu quả mong muốn được dùng với lượng thấp nhất và, thêm nữa, việc dùng thuốc chỉ được tiếp tục với điều kiện là cần để điều trị thành công bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế.

Hợp chất 1 cũng hữu dụng dưới dạng hợp chất trung gian hữu ích để điều chế dạng tinh thể của hợp chất 1, bao gồm, ví dụ, dạng tinh thể 1'.

Công cụ nghiên cứu

Do hợp chất 1 mang hoạt tính ức chế enzyme NEP, nên nó cũng hữu dụng làm công cụ nghiên cứu để khảo sát hoặc nghiên cứu các mẫu hoặc hệ sinh học có enzyme NEP, ví dụ, để nghiên cứu các bệnh trong đó enzyme NEP hoặc các cơ chất peptit của nó có vai trò đối với các bệnh này. Mẫu hoặc hệ sinh học thích hợp bất kỳ có enzyme NEP có thể được sử dụng trong các nghiên cứu như vậy mà có thể được tiến hành *in vitro* hoặc *in vivo*. Các mẫu hoặc hệ sinh học tiêu biểu thích hợp cho các nghiên cứu này gồm, nhưng không bị giới hạn ở, tế bào, dịch chiết tế bào, màng sinh chất, mẫu mô, cơ quan được phân lập, động vật có vú (như chuột nhắt, chuột thường, chuột lang nhà, thỏ, chó, lợn, người, và v.v.), và các dạng tương tự, trong đó động vật có vú được quan tâm đặc biệt. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, hoạt tính của enzyme NEP ở động vật có vú được ức chế bằng cách dùng

một lượng ức chế NEP của hợp chất 1.

Khi được sử dụng làm công cụ nghiên cứu, thì mẫu hoặc hệ sinh học chứa enzym NEP thường được cho tiếp xúc với một lượng ức chế enzym NEP của hợp chất 1. Sau khi mẫu hoặc hệ sinh học này được tiếp xúc với hợp chất, thì các tác dụng ức chế enzym NEP được xác định bằng cách sử dụng quy trình và thiết bị thông thường, như bằng cách xác định mức độ gắn kết thụ thể trong thử nghiệm gắn kết hoặc xác định các thay đổi qua trung gian phối tử trong thử nghiệm chức năng. Sự tiếp xúc bao gồm cho các tế bào hoặc mô tiếp xúc với hợp chất, cho động vật có vú dùng hợp chất, ví dụ, bằng đường *i.p.*, *p.o.*, *i.v.*, *s.c.*, hoặc xông hít, và v.v.. Bước xác định này có thể bao gồm bước đo đáp ứng (phân tích định lượng) hoặc có thể bao gồm bước tiến hành quan sát (phân tích định tính). Việc đo đáp ứng bao gồm, ví dụ, xác định tác dụng của hợp chất đến mẫu hoặc hệ sinh học bằng cách sử dụng quy trình và thiết bị thông thường, như các thử nghiệm hoạt tính enzym và đo cơ chất enzym hoặc các thay đổi qua trung gian sản phẩm trong các thử nghiệm chức năng. Các kết quả thử nghiệm này có thể được sử dụng để xác định mức hoạt tính cũng như lượng hợp chất cần để đạt được kết quả mong muốn, tức là, lượng ức chế enzym NEP. Thông thường, bước xác định sẽ bao gồm bước xác định các tác dụng ức chế enzym NEP.

Ngoài ra, hợp chất 1 có thể được sử dụng làm công cụ nghiên cứu để đánh giá các hợp chất hóa học khác, và do đó cũng hữu dụng trong các thử nghiệm sàng lọc để phát hiện, ví dụ, các hợp chất mới có hoạt tính ức chế NEP. Theo cách này, hợp chất 1 được sử dụng làm chuẩn trong thử nghiệm để cho phép so sánh các kết quả thu được bằng hợp chất thử nghiệm và bằng hợp chất 1 để nhận biết các hợp chất thử nghiệm có hoạt tính cao hơn hoặc bằng nhau, nếu cần. Ví dụ, dữ liệu pK_i đối với hợp chất thử nghiệm hoặc nhóm các hợp chất thử nghiệm được so sánh với dữ liệu pK_i đối với hợp chất 1 để nhận biết các hợp chất thử nghiệm có các đặc tính mong muốn, ví dụ, các hợp chất thử nghiệm có trị số pK_i bằng hoặc cao hơn so với hợp chất theo sáng chế. Khía cạnh này của sáng chế bao gồm, dưới dạng các phương án riêng rẽ, cả việc tạo ra dữ liệu so sánh (sử dụng các thử nghiệm thích hợp) và cả việc phân tích dữ liệu thử nghiệm để nhận biết các hợp chất thử nghiệm

đang nói đến. Do đó, hợp chất thử nghiệm có thể được đánh giá trong thử nghiệm sinh học, bằng phương pháp bao gồm các bước: (a) tiến hành thử nghiệm sinh học với hợp chất thử nghiệm để có được trị số thử nghiệm thứ nhất; (b) tiến hành thử nghiệm sinh học với hợp chất 1 để có được trị số thử nghiệm thứ hai; trong đó bước (a) được tiến hành trước, sau hoặc đồng thời với bước (b); và (c) so sánh trị số thử nghiệm thứ nhất từ bước (a) với trị số thử nghiệm thứ hai từ bước (b). Các thử nghiệm sinh học lấy làm ví dụ bao gồm thử nghiệm ức chế enzym NEP.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp nghiên cứu mẫu hoặc hệ sinh học chứa enzym NEP, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho mẫu hoặc hệ sinh học tiếp xúc với hợp chất 1; và (b) xác định các ảnh hưởng gây ra bởi hợp chất đối với mẫu hoặc hệ sinh học.

Dược phẩm và chế phẩm

Hợp chất 1 thường được dùng cho bệnh nhân ở dạng dược phẩm hoặc chế phẩm. Dược phẩm như vậy có thể được dùng cho bệnh nhân bằng đường dùng chấp nhận được bất kỳ gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các đường dùng qua đường miệng, qua trực tràng, qua âm đạo, qua mũi, xông hít, khu trú (bao gồm qua da), qua mắt, và ngoài đường tiêu hóa. Hơn nữa, hợp chất 1 có thể được dùng, ví dụ, qua đường miệng, với nhiều liều mỗi ngày (ví dụ, hai, ba, hoặc bốn lần mỗi ngày), với một liều mỗi ngày hoặc một liều mỗi tuần. Cần phải hiểu rằng dạng bất kỳ của hợp chất 1, (tức là, bazơ tự do, axit tự do, muối dược dụng, solvat, v.v.) mà thích hợp cho chế độ dùng cụ thể có thể được sử dụng trong dược phẩm được nêu trong bản mô tả này.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa chất mang dược dụng và hợp chất 1. Dược phẩm này có thể chứa các chất trị liệu và/hoặc chất bào chế nếu muốn. Khi đề cập đến dược phẩm, "hợp chất 1" cũng có thể còn được gọi là "hoạt chất", để phân biệt nó với các thành phần khác của chế phẩm, như chất mang. Do đó, cần hiểu rằng thuật ngữ "hoạt chất" bao gồm hợp chất 1 cũng như muối dược dụng của nó.

Dược phẩm theo sáng chế thường chứa một lượng cho tác dụng điều trị bệnh

của hợp chất 1. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng dược phẩm này có thể chứa nhiều hơn lượng cho tác dụng điều trị bệnh, như trong chế phẩm liều lớn, hoặc ít hơn lượng cho tác dụng điều trị bệnh, tức là, các liều đơn vị riêng rẽ được thiết kế để dùng nhiều lần để đạt được lượng cho tác dụng điều trị bệnh. Thông thường, dược phẩm sẽ chứa hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 95% trọng lượng, bao gồm, khoảng từ 0,01 đến 30% trọng lượng, như khoảng từ 0,01 đến 10% trọng lượng, với lượng thực tế phụ thuộc vào chính chế phẩm đó, đường dùng, tần suất sử dụng theo liều lượng, và v.v.. Theo một phương án, dược phẩm thích hợp cho dạng liều lượng dùng qua đường miệng, ví dụ, có thể chứa hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 70% trọng lượng, hoặc khoảng từ 10 đến 60% trọng lượng.

Chất mang hoặc tá dược thông thường bất kỳ có thể được sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế. Việc lựa chọn chất mang hoặc tá dược cụ thể, hoặc hỗn hợp của các chất mang hoặc tá dược này, sẽ phụ thuộc vào chế độ dùng được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân cụ thể hoặc kiểu tình trạng bệnh lý y tế hoặc tình trạng bệnh cụ thể. Liên quan đến vấn đề này, việc bào chế dược phẩm thích hợp cho chế độ dùng cụ thể cũng sẽ nằm trong phạm vi kiến thức của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực dược phẩm. Ngoài ra, chất mang hoặc tá dược được sử dụng trong dược phẩm như vậy có thể mua được trên thị trường. Nhằm minh họa thêm, các kỹ thuật bào chế thông thường như được mô tả trong ấn phẩm *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); và H. C. Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Các ví dụ tiêu biểu về các vật liệu có thể đóng vai trò là chất mang dược dụng gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các vật liệu sau đây: đường, như lactoza, glucoza và sucroza; tinh bột, như tinh bột ngô và tinh bột khoai tây; xenluloza, như xenluloza vi tinh thể, và các dẫn xuất của nó, như natri carboxymetyl xenluloza, etyl xenluloza và xenluloza axetat; muối của axit béo, như magie stearat; tragacan dạng bột; mạch nha; gelatin; bột talc; tá dược, như bơ cacao và sáp thuốc đạn; dầu,

như dầu lạc, dầu hạt bông, dầu rum, dầu vừng, dầu ôliu, dầu ngô và dầu đậu nành; glycol, như propylen glycol; rượu polyhydric, như glyxerin, sorbitol, manitol và polyetylen glycol; este, như etyl oleat và etyl laurat; thạch; chất đệm, như magie hydroxit và nhôm hydroxit; axit alginic; nước không chứa pyrogen; dung dịch muối đẳng trương; dung dịch Ringer; rượu etylic; dung dịch đệm phosphat; khí đẩy được nén, như cloflocacbon và hydroflocacbon; và các chất tương thích không độc khác được dùng trong dược phẩm.

Theo một phương án của sáng chế, chất mang dược dụng là magie stearat. Ví dụ, dược phẩm có thể chứa hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' và magie stearat ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 3:1 đến 10:1 của hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' so với magie stearat. Các tỷ lệ khác của hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' so với magie stearat gồm, nhưng không bị giới hạn ở, 1:1, 5:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1 và 50:1.

Dược phẩm thường được bào chế bằng cách trộn hoặc phối trộn đều và kỹ hoạt chất với chất mang dược dụng và một hoặc nhiều thành phần tùy ý. Sau đó hỗn hợp được phối trộn đồng nhất thu được có thể được tạo hình hoặc được nhồi vào viên nén, viên nang, viên tròn, hộp nhỏ, vỏ đựng, dụng cụ phân tán và dạng tương tự bằng cách sử dụng quy trình và thiết bị thông thường.

Theo một phương án, dược phẩm có thể thích hợp để dùng qua đường miệng. Dược phẩm thích hợp để dùng qua đường miệng có thể ở dạng viên nang, viên nén, viên tròn, viên ngậm, viên nhện, viên bao đường, bột, hạt; dung dịch hoặc hỗn dịch trong dịch lỏng chứa nước hoặc dịch lỏng không chứa nước; nhũ tương lỏng dầu trong nước hoặc nước trong dầu; cồn ngọt hoặc si-rô; và các dạng tương tự; mỗi loại chứa một lượng định trước của hoạt chất.

Khi dược dự định dùng qua đường miệng ở dạng liều lượng rắn (viên nang, viên nén, viên tròn và dạng tương tự), thì dược phẩm thường sẽ chứa hoạt chất và một hoặc nhiều chất mang dược dụng, như natri xitrat, dicanxi phosphat, hoặc magie stearat. Các dạng liều lượng rắn cũng có thể bao gồm chất bổ sung hoặc chất độn, như tinh bột, xenluloza vi tinh thể, lactoza, sucroza, glucoza, manitol, và/hoặc axit silixic; chất kết dính, như carboxymetylxenluloza, alginat, gelatin, polyvinyl

pyrrolidon, sucroza và/hoặc keo acacia; chất giữ ẩm, như glyxerol; chất phân rã, như thạch-thạch, canxi cacbonat, tinh bột khoai tây hoặc bột sắn, axit alginic, một số silicat, và/hoặc natri cacbonat; chất làm chậm hòa tan, như parafin; chất thúc đẩy hấp thụ, như hợp chất amoni bậc bốn; chất thấm ướt, như rượu xetylic và/hoặc glyxerol monostearat; chất hấp thụ, như cao lanh và/hoặc đất sét bentonit; chất bôi trơn, như bột talc, canxi stearat, magie stearat, polyetylen glycol rắn, natri lauryl sulfat, và/hoặc hỗn hợp của chúng; chất tạo màu; và chất đệm. Đối với mục đích của sáng chế, thuật ngữ “chất mang dược dụng” bao gồm tất cả các thuật ngữ như chất mang, chất bổ sung hoặc chất độn, chất kết dính, chất giữ ẩm, chất làm chậm hòa tan, chất thấm ướt, chất hấp thụ, chất bôi trơn, chất tạo màu và chất đệm được mô tả ở trên.

Chất giải phóng, chất thấm ướt, chất bao, chất làm ngọt, chất tạo hương vị và mùi thơm, chất bảo quản và chất chống oxy hóa cũng có thể có trong dược phẩm. Chất bao lấy làm ví dụ đối với viên nén, viên nang, viên tròn và các dạng tương tự, bao gồm các chất được sử dụng cho lớp bao tan trong ruột, như xenluloza axetat phtalat, polyvinyl axetat phtalat, hydroxypropyl metylxenluloza phtalat, copolyme của este của axit metacrylic-axit metacrylic, xenluloza axetat trimelitat, carboxymetyl etyl xenluloza, hydroxypropyl metyl xenluloza axetat succinat, và các chất tương tự. Các ví dụ về chất chống oxy hóa được dụng bao gồm: chất chống oxy hóa tan được trong nước, như axit ascorbic, xystein hydroclorua, natri bisulfat, natri metabisulfat natri sulfit và các chất tương tự; chất chống oxy hóa tan được trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxyanisol butylat, hydroxytoluen butylat, lexithin, propyl galat, alpha-tocopherol, và các chất tương tự; và chất chelat hóa kim loại, như axit xitric, axit etylendiamin tetraaxetic, sorbitol, axit tartric, axit phosphoric, và các chất tương tự.

Dược phẩm cũng có thể được bào chế để đem lại sự giải phóng chậm hoặc có kiểm soát của hoạt chất bằng cách sử dụng, ví dụ, hydroxypropyl metyl xenluloza theo các tỷ lệ biến đổi hoặc các chất nền polyme khác, liposom và/hoặc vi cầu. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất cản quang và có thể được bào chế sao cho chúng chỉ giải phóng hoạt chất, hoặc ưu tiên giải phóng hoạt

chất, trong một phần nhất định của ống dạ dày - ruột, tùy ý, theo cách trì hoãn. Các ví dụ về được phẩm nhúng có thể được sử dụng bao gồm chất polyme và sáp. Hoạt chất cũng có thể ở dạng bao vi nang, tùy ý với một hoặc nhiều tá được được mô tả ở trên.

Một phương án theo sáng chế bao gồm dạng liều lượng qua đường miệng chứa hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' trong viên nang, viên nén, chất lỏng hoặc hỗn dịch. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến dạng liều lượng qua đường miệng trong đó việc giải phóng hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' ở đối tượng là sự giải phóng trung gian, được kiểm soát hoặc trì hoãn. Nếu viên nang được sử dụng ở dạng liều lượng qua đường miệng, một phương án khác bao gồm viên nang được chứa gelatin, polysaccharit hoặc polyme tổng hợp. Theo một phương án cụ thể, viên nang bao gồm hydroxypropyl methylxenluloza.

Vật liệu thích hợp dùng cho viên nang theo sáng chế được chọn từ gelatin, các dẫn xuất xenluloza, tinh bột, các dẫn xuất tinh bột, chitosan và nhựa tổng hợp. Nếu gelatin được sử dụng dưới dạng vật liệu dùng cho nang, nó có thể được sử dụng kết hợp với các chất phụ gia khác được chọn từ polyetylglycol (PEG), glyxerol, sorbitol, polypropylenglycol, copolyme khối PEO-PPO và các rượu polyhydric khác và polyete. Khi dẫn xuất của xenluloza được sử dụng làm vật liệu dùng cho viên nang, thì hydroxypropylmethylxenluloza, hydroxypropylxenluloza, methylxenluloza, hydroxymethylxenluloza và hydroxyethylxenluloza là các polyme được ưu tiên. Nếu nhựa tổng hợp được sử dụng làm vật liệu dùng cho viên nang, thì polyetylen, polycarbonat, polyeste, polypropylen và polyetylen terephthalat là các vật liệu được ưu tiên. Được ưu tiên đặc biệt theo sáng chế là polyetylen, polycarbonat hoặc polyetylen terephthalat.

Dạng liều lượng lỏng thích hợp để sử dụng qua đường miệng gồm, bằng cách minh họa, nhũ tương, vi nhũ tương, dung dịch, hỗn dịch, sirô và cốm ngọt được dùng. Các dạng liều lượng lỏng thường chứa hoạt chất và chất pha loãng trợ, như, ví dụ, nước hoặc các dung môi khác, chất hòa tan và chất nhũ hóa, như rượu etylic, rượu isopropylic, etyl cacbonat, etyl axetat, rượu benzylic, benzyl benzoat, propylen

glycol, 1,3-butylen glycol, dầu (ví dụ, dầu hạt bông, dầu cây thân củ, dầu ngô, dầu mầm, dầu ôliu, dầu thầu dầu và dầu vừng), glyxerol, rượu tetrahydrofurylic, polyetylen glycol và este axit béo của sorbitan, và hỗn hợp của chúng. Hỗn dịch có thể chứa các chất tạo hỗn dịch như, ví dụ, rượu isostearylic được etoxy hóa, polyoxyetylen sorbitol và este sorbitan, xenluloza vi tinh thể, nhôm metahydroxit, bentonit, thạch-thạch và tragacan, và hỗn hợp của chúng.

Khi được dự định để dùng qua đường miệng, các dược phẩm theo sáng chế có thể được đóng gói ở dạng liều đơn vị. Thuật ngữ "dạng liều đơn vị" chỉ đơn vị rời rạc về mặt vật lý thích hợp để định liều cho bệnh nhân, tức là, mỗi đơn vị chứa một lượng định trước của hoạt chất được tính toán để đem lại tác dụng điều trị bệnh mong muốn một mình hoặc ở dạng tổ hợp với một hoặc nhiều đơn vị bổ sung. Ví dụ, các dạng liều đơn vị có thể là viên nang, viên nén, viên tròn, và dạng tương tự.

Theo một phương án khác, dược phẩm theo sáng chế thích hợp dùng để xông hít, và thường sẽ ở dạng sol khí hoặc bột. Các dược phẩm như vậy nói chung được dùng bằng cách sử dụng các thiết bị phân phối vào cơ thể đã biết, như ống phun sương, bột khô, hoặc bình xông hít định liều. Dụng cụ phun sương tạo ra dòng không khí vận tốc cao mà khiến cho dược phẩm phun ở dạng sương mù được đưa vào đường hô hấp của bệnh nhân. Chế phẩm dạng phun sương lấy làm ví dụ bao gồm hoạt chất được hòa tan trong chất mang để tạo ra dung dịch, hoặc được micron hóa và được kết hợp với chất mang để tạo ra hỗn dịch chứa các hạt được micron hóa có kích thước hít thở được. Bình xông hít bột khô phân phối hoạt chất dưới dạng bột chảy tự do được phân tán trong đường thở của bệnh nhân trong khi xông hít. Chế phẩm bột khô lấy làm ví dụ chứa hoạt chất được phối trộn khô với tá dược như lactoza, tinh bột, manitol, dextroza, axit polylactic, polylactit-co-glycolit, và hỗn hợp của chúng. Bình xông hít định liều xả một lượng hoạt chất định trước bằng cách sử dụng khí đẩy được nén. Chế phẩm định liều lấy làm ví dụ bao gồm dung dịch hoặc hỗn dịch chứa hoạt chất trong chất đẩy dạng lỏng, như cloflocarbon hoặc hydrofloalkan. Các thành phần tùy ý của các chế phẩm này bao gồm đồng dung môi, như etanol hoặc pentan, và chất hoạt động bề mặt, như sorbitan trioleat, axit oleic, lexithin, glyxerin, và natri lauryl sulfat. Chế phẩm như vậy thường được điều

chế bằng cách bổ sung hydrofloalkan đã được làm lạnh hoặc được ép vào vật chứa thích hợp chứa hoạt chất, etanol (nếu có) và chất hoạt động bề mặt (nếu có). Để pha chế hỗn dịch, hoạt chất được micron hóa và sau đó được kết hợp với chất đẩy. Theo cách khác, chế phẩm dạng hỗn dịch có thể được điều chế bằng cách sấy phun lớp phủ chứa chất hoạt động bề mặt trên hoạt chất dạng hạt được micron hóa. Sau đó chế phẩm này được nạp vào hộp sol khí mà tạo thành một phần của bình xông hít.

Hợp chất 1 và chế phẩm chứa chúng cũng có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, bằng cách tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, hoặc trong màng bụng. Đối với đường dùng như vậy, hoạt chất được cung cấp trong dung dịch vô trùng, hỗn dịch, hoặc chất nhũ hóa. Dung môi lấy làm ví dụ để điều chế chế phẩm như vậy bao gồm nước, nước muối, chất điện phân, rượu có phân tử lượng thấp như propylen glycol và polyetylen glycol, dầu, axit amin, gelatin, đường, este của axit béo như etyl oleat, và các chất tương tự. Chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất chống oxy hóa, chất hòa tan, chất ổn định, chất bảo quản, chất làm ướt, chất nhũ hóa, và chất phân tán. Chất hoạt động bề mặt, các chất ổn định hoặc chất điều chỉnh độ pH bổ sung (axit, bazơ hoặc dung dịch đệm) và chất chống oxy hóa là đặc biệt hữu ích để đem lại độ ổn định cho chế phẩm, ví dụ, để giảm thiểu tối đa hoặc tránh được sự thủy phân các liên kết este và amit có thể có trong hợp chất. Các chế phẩm này có thể được vô trùng bằng cách sử dụng môi trường tiệt trùng, chất tiệt trùng, bộ lọc, bức xạ, hoặc nhiệt.

Các chất mang chứa nước sinh lý dụng tiêu biểu gồm, ví dụ, nước vô trùng dùng để tiêm, USP; dung dịch tiêm Dextroza, USP (ví dụ, dextroza 2,5, 5,0, 10, 20%, bao gồm dung dịch tiêm Dextroza 5% (D5/W)); dung dịch tiêm Dextroza và Natri clorua, USP (ví dụ, lượng dextroza thay đổi từ 2,5 đến 10% và lượng natri clorua thay đổi từ 0,12 (19 mEq natri) đến 0,9% (154 mEq natri)); dung dịch tiêm Manitol, USP, (ví dụ, manitol 5, 10, 15, 20 và 25%); dung dịch tiêm Ringer (Ringer's Injection), USP (ví dụ, 147 mEq natri, 4 mEq kali, 4,5 mEq canxi và 156 mEq clorua trên mỗi lít); dung dịch Ringer được lactat hóa, USP (ví dụ, 2,7 mEq canxi, 4 mEq kali, 130 mEq natri, và 28 mEq lactat trên mỗi lít); dung dịch tiêm natri clorua, USP (ví dụ, natri clorua 0,9%) và các dung dịch tương tự.

Khi được dùng cho bệnh nhân, hợp chất 1 thường sẽ được pha loãng trong chất mang chứa nước với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 mL đến 10 mL trên mỗi mg hợp chất 1, như nằm trong khoảng từ 0,6 đến 8 mL trên mỗi mg.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa chứa dung dịch cyclodextrin chứa nước dưới dạng chất mang được dùng. Cyclodextrin thích hợp gồm các phân tử vòng chứa sáu hoặc nhiều hơn sáu đơn vị α -D-glucopyranoza được liên kết ở các vị trí 1,4 nhờ liên kết như trong amylaza, β -cyclodextrin hoặc cycloheptaamyloza. Cyclodextrin lấy làm ví dụ gồm các dẫn xuất cyclodextrin như hydroxypropyl và sulfobutyl ete cyclodextrin như hydroxypropyl- β -cyclodextrin và sulfobutyl ete β -cyclodextrin. Dung dịch đệm lấy làm ví dụ đối với chế phẩm này gồm dung dịch đệm gốc axit carboxylic như các dung dịch đệm xitrat, lactat và maleat. Theo một phương án của sáng chế, dạng liều lượng trong tĩnh mạch chứa hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' trong dung dịch đệm.

Theo một phương án, hợp chất 1 hoặc dược phẩm chứa chúng là bột được làm khô lạnh. Thông thường, bột được làm khô lạnh này vô trùng và được đóng gói trong lọ nhỏ hoặc ống thuốc tiêm được hàn kín hoặc vật chứa tương tự.

Hợp chất 1 cũng có thể được sử dụng qua da bằng cách sử dụng các hệ phân phối qua da và tá dược. Ví dụ, hợp chất 1 có thể được phối trộn với chất tăng cường thẩm, như propylen glycol, polyetylen glycol monolaurat, azaxycloalkan-2-on và các chất tương tự, và được kết hợp vào miếng đắp hoặc hệ thống phân phối tương tự. Tá dược bổ sung bao gồm các chất tạo gel, chất nhũ hóa và dung dịch đệm, có thể được sử dụng trong chế phẩm dùng qua da này nếu muốn.

Chất thứ yếu

Hợp chất 1 có thể hữu dụng dưới dạng thuốc điều trị bệnh duy nhất hoặc có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung để đạt được tác dụng điều trị bệnh mong muốn. Do đó, theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế chứa các thuốc khác mà được sử dụng đồng thời với hợp chất 1. Ví dụ, dược phẩm này còn có thể chứa một hoặc nhiều thuốc (còn được gọi là "(các) chất thứ yếu"). Các chất trị liệu này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm chất đối

kháng thụ thể adenosin, chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin α , chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin β_1 , chất chủ vận thụ thể tác động kiểu adrenalin β_2 , chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin β /chất đối kháng thụ thể α_1 tác động kép, chất phá vỡ sản phẩm cuối của quá trình glycat nâng cao, chất đối kháng aldosteron, chất ức chế aldosteron synthaza, chất ức chế aminopeptidaza N, androgen, chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin và enzym chuyển hóa angiotensin /chất ức chế neprilysin tác động kép, chất hoạt hóa và chất kích thích enzym chuyển hóa angiotensin 2, vacxin angiotensin-II, chất chống đông, chất chống bệnh đái đường, chất chống tiêu chảy, chất chống tăng nhãn áp, chất kháng lipid, chất chống cảm thụ đau, chất chống huyết khối, chất đối kháng thụ thể AT_1 và chất đối kháng thụ thể AT_1 /chất ức chế neprilysin tác động kép và chất phong bế thụ thể angiotensin đa chức, chất đối kháng thụ thể bradykinin, chất phong bế kênh canxi, chất ức chế chymaza, digoxin, thuốc lợi tiểu, chất chủ vận dopamin, chất ức chế enzym chuyển hóa endothelin, chất đối kháng thụ thể endothelin, chất ức chế HMG-CoA reductaza, estrogen, chất chủ vận và/hoặc chất đối kháng thụ thể estrogen, chất ức chế sự tái hấp thu monoamin, chất giãn cơ, peptit natri lợi niệu và các chất tương tự của chúng, chất đối kháng thụ thể thanh thải peptit natri lợi niệu, chất ức chế neprilysin, chất cho nitor oxit, chất kháng viêm không steroid, chất đối kháng thụ thể N-metyl D-aspartat, chất chủ vận thụ thể opioit, chất ức chế phosphodiesteraza, chất tương tự prostaglandin, chất chủ vận thụ thể prostaglandin, chất ức chế renin, chất ức chế sự tái hấp thu serotonin chọn lọc, chất phong bế kênh natri, chất kích thích và chất hoạt hóa guanylat xyclaza dễ tan, chất chống trầm cảm dạng ba vòng, chất đối kháng thụ thể vasopresin, và hỗn hợp của chúng. Các ví dụ cụ thể về các chất này được mô tả chi tiết trong bản mô tả này.

Một phương án cụ thể bao gồm dược phẩm chứa hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó và chất đối kháng thụ thể AT_1 , chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin, chất ức chế phosphodiesteraza (PDE), chất ức chế renin, thuốc lợi tiểu, hoặc hỗn hợp của chúng, và tùy ý một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

Do đó, theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, dược phẩm chứa hợp chất 1, hoạt chất thứ hai, và chất mang dược dụng. Hoạt chất thứ ba, thứ tư, v.v. cũng có

thể có trong dược phẩm. Trong liệu pháp kết hợp, lượng hợp chất 1 được sử dụng, cũng như lượng chất thứ yếu, có thể ít hơn lượng thường được sử dụng trong liệu pháp một loại thuốc.

Hợp chất 1 có thể được trộn bằng phương pháp vật lý với hoạt chất thứ hai để tạo ra chế phẩm chứa cả hai chất; hoặc mỗi chất có thể có mặt trong các chế phẩm riêng rẽ và tách biệt được dùng cho bệnh nhân đồng thời hoặc ở các thời điểm riêng rẽ. Ví dụ, hợp chất 1 có thể được kết hợp với hoạt chất thứ hai bằng cách sử dụng quy trình và thiết bị thông thường để tạo ra hỗn hợp của hoạt chất chứa hợp chất 1 và hoạt chất thứ hai. Ngoài ra, hoạt chất này có thể được kết hợp với chất mang dược dụng để tạo ra dược phẩm chứa hợp chất 1, hoạt chất thứ hai và chất mang dược dụng. Theo phương án này, các thành phần của chế phẩm thường được trộn hoặc phối trộn để tạo ra hỗn hợp vật lý. Hỗn hợp vật lý này sau đó được dùng với lượng cho tác dụng điều trị bệnh bằng cách sử dụng đường dùng bất kỳ trong số các đường dùng được nêu trong bản mô tả này.

Theo cách khác, các hoạt chất có thể vẫn ở trạng thái riêng rẽ và tách biệt trước khi dùng cho bệnh nhân. Theo phương án này, các chất này không được trộn bằng phương pháp vật lý cùng nhau trước khi dùng nhưng được dùng đồng thời hoặc tại các thời điểm riêng rẽ dưới dạng dược phẩm riêng rẽ. Các dược phẩm này có thể được đóng gói tách riêng hoặc có thể được đóng gói cùng nhau trong một bộ kit. Khi được dùng ở các thời điểm riêng rẽ, chất thứ yếu thường sẽ được sử dụng dưới 24 giờ sau khi dùng hợp chất 1, trong khoảng thời gian bất kỳ từ đồng thời với việc dùng hợp chất theo sáng chế đến khoảng 24 giờ sau khi dùng liều. Việc dùng này còn được gọi là sử dụng tuần tự. Do đó, hợp chất 1 có thể được dùng qua đường miệng đồng thời hoặc tuần tự với một hoạt chất khác bằng cách sử dụng hai viên nén, với một viên nén cho từng hoạt chất, trong đó việc dùng tuần tự có thể có nghĩa là được dùng ngay sau khi dùng hợp chất 1 hoặc ở một thời điểm định trước nào đó sau đó (ví dụ, một giờ sau đó hoặc ba giờ sau đó). Cũng dự tính rằng chất thứ yếu có thể được dùng trên 24 giờ sau khi sử dụng hợp chất 1. Theo cách khác, hỗn hợp này có thể được dùng bằng các đường dùng khác nhau, tức là, một là theo đường miệng và một là bằng cách xông hít.

Theo một phương án, bộ kit chứa dạng liều thứ nhất chứa hợp chất 1 và ít nhất một dạng liều bổ sung chứa một hoặc nhiều chất thứ yếu trong số các chất thứ yếu được nêu trong bản mô tả này, với lượng đủ để tiến hành các phương pháp theo sáng chế. Dạng liều thứ nhất và dạng liều thứ hai (hoặc thứ ba, v.v.) cùng chứa một lượng cho tác dụng điều trị bệnh của hoạt chất để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý y tế ở bệnh nhân.

(Các) chất thứ yếu, khi được bao gồm, có mặt với lượng cho tác dụng điều trị bệnh sao cho chúng thường được dùng với lượng tạo ra tác dụng có lợi cho việc điều trị bệnh khi được dùng đồng thời với hợp chất 1 theo sáng chế. Chất thứ yếu này có thể ở dạng muối dược dụng, solvat, chất đồng phân lập thể tinh khiết về mặt quang học, và v.v.. Chất thứ yếu này cũng có thể có dạng tiền dược chất, ví dụ, hợp chất có nhóm axit carboxylic đã được este hóa. Do đó, các chất thứ yếu được liệt kê ở đây được dự định là bao gồm tất cả các dạng như vậy, và có bán trên thị trường hoặc có thể được điều chế bằng cách sử dụng các quy trình và chất phản ứng thông thường.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể adenosin, các ví dụ về chúng bao gồm naxifylin, rolifylin, SLV-320, theophylin, và tonapofylin.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin α , các ví dụ về chúng bao gồm doxazosin, prazosin, tamsulosin, và terazosin.

Hợp chất 1 cũng có thể được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin β_1 ("chất phong bế β_1 "), các ví dụ về chúng bao gồm axebutolol, alprenolol, amosulalol, arotinolol, atenolol, befunolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bucindolol, bucumolol, bufetolol, bufuralol, bunitrolol, bupranolol, bubridin, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, cloranolol, dilevalol, epanolol, esmolol, indenolol, labetolol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol như metoprolol succinat và metoprolol tartrat, moprolol, nadolol, nadoxolol, nebivalol, nipradilol, oxprenolol,

penbutolol, perbutolol, pindolol, practolol, pronethalol, propranolol, sotalol, sufinalol, talindol, tertatolol, tilisolol, timolol, toliprolol, xibenolol, và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, chất đối kháng β_1 được chọn từ atenolol, bisoprolol, metoprolol, propranolol, sotalol, và hỗn hợp của chúng. Thông thường, chất phong bế β_1 sẽ được dùng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 2 đến 900 mg mỗi liều lượng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chủ vận thụ thể tác động kiểu adrenalin β_2 , các ví dụ về chúng bao gồm albuterol, bitolterol, fenoterol, formoterol, indacaterol, isoetharin, levalbuterol, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, salmefamol, salmeterol, terbutalin, vilanterol, và các chất tương tự. Thông thường, chất chủ vận thụ thể tác động kiểu adrenalin β_2 này sẽ được dùng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 0,05 đến 500 μg trên mỗi liều lượng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất phá vỡ sản phẩm cuối của quá trình glycat hóa nâng cao (AGE), các ví dụ về chúng bao gồm alagebrium (hoặc ALT-711) và TRC4149.

Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng aldosteron, các ví dụ về chúng bao gồm eplerenon, spironolacton, và hỗn hợp của chúng. Thông thường, chất đối kháng aldosteron sẽ được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 5 đến 300 mg mỗi ngày.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất ức chế aminopeptidaza N hoặc dipeptidyl peptidaza III, các ví dụ về chúng bao gồm bestatin và PC18 (2-amino-4-metylsulfonyl butan thiol, methionin thiol).

Hợp chất 1 cũng có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin (ACE), các ví dụ về chúng bao gồm acxupril, alaxepiril, benazepril, benazeprilat, captopril, ceranapril, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, fosinoprilat, imidapril, lisinopril, moexipril, monopril, moveltipril, pentopril, perindopril, quinapril, quinaprilat, ramipril, ramiprilat, saralasin axetat, spirapril, temocapril, trandolapril, zofenopril, và hỗn hợp của chúng. Theo một

phương án cụ thể, chất ức chế ACE được chọn từ: benazepril, captopril, enalapril, lisinopril, ramipril, và hỗn hợp của chúng. Thông thường, chất ức chế ACE sẽ được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 1 đến 150 mg mỗi ngày.

Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin /neprilysin (ACE/NEP) tác động kép, các ví dụ về chúng bao gồm: AVE-0848 (axit (4*S*, 7*S*, 12*bR*)-7-[3-metyl-2(*S*)-sulfanylbutyramido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12*b*-octahydropyrido[2,1-*a*][2]-benzazepin-4-carboxylic); AVE-7688 (ilepatril) và hợp chất gốc của nó; axit BMS-182657 (2-[2-oxo-3(*S*)-[3-phenyl-2(*S*)-sulfanylpropionamido]-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-1-benzazepin-1-yl]axetic); CGS-35601 (N-[1-[4-metyl-2(*S*)-sulfanylpentanamido]xyclopentyl-cacbonyl]-L-tryptophan); fasidotril; fasidotrilat; enalaprilat; ER-32935 (axit (3*R*, 6*S*, 9*aR*)-6-[3(*S*)-metyl-2(*S*)-sulfanylpentanamido]-5-oxoperhydrothiazolo[3,2-*a*]azepin-3-carboxylic); gempatrilat; MDL-101264 (axit (4*S*, 7*S*, 12*bR*)-7-[2(*S*)-(2-morpholinoacetylthio)-3-phenylpropionamido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12*b*-octahydropyrido[2,1-*a*][2]benzazepin-4-carboxylic); MDL-101287 (axit [4*S*-[4 α , 7 α (*R**), 12*b* β]]-7-[2-(carboxymetyl)-3-phenylpropionamido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12*b*-octahydropyrido[2,1-*a*][2]benzazepin-4-carboxylic); omapatrilat; RB-105 (N-[2(*S*)-(mercaptometyl)-3(*R*)-phenylbutyl]-L-alanin); sampatrilat; SA-898 ((2*R*, 4*R*)-N-[2-(2-hydroxyphenyl)-3-(3-mercaptopropionyl)thiazolidin-4-ylcacbonyl]-L-phenylalanin); Sch-50690 (N-[1(*S*)-carboxy-2-[N2-(metansulfonyl)-L-lysylamino]etyl]-L-valyl-L-tyrosin); và hỗn hợp của chúng, cũng có thể được bao gồm. Theo một phương án cụ thể, chất ức chế ACE/NEP được chọn từ: AVE-7688, enalaprilat, fasidotril, fasidotrilat, omapatrilat, sampatrilat, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất hoạt hóa hoặc chất kích thích enzym chuyển hóa angiotensin 2 (ACE2).

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với vaccin angiotensin-II, các ví dụ về chúng bao gồm ATR12181 và CYT006-AngQb.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chống đông,

các ví dụ về chúng bao gồm: coumarin như warfarin; heparin; và chất ức chế thrombin trực tiếp như argatroban, bivalirudin, dabigatran, và lepirudin.

Theo một phương án khác nữa, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chống bệnh đái đường, các ví dụ về chúng bao gồm thuốc tiêm cũng như thuốc hữu hiệu qua đường miệng, và hỗn hợp của chúng. Các ví dụ về thuốc tiêm bao gồm insulin và các dẫn xuất của insulin. Các ví dụ về thuốc hữu hiệu qua đường miệng bao gồm: biguanit như metformin; chất đối kháng glucagon; các chất ức chế α -glucosidaza như acarboza và miglitol; các chất ức chế dipeptidyl peptidaza IV (chất ức chế DPP-IV) như alogliptin, denagliptin, linagliptin, saxagliptin, sitagliptin, và vildagliptin; meglitinit như repaglinit; oxadiazolidindion; sulfonylure như clorpropamit, glimepirit, glipizit, glyburit, và tolazamit; thiazolidindion như pioglitazon và rosiglitazon; và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với các chất điều trị chống tiêu chảy. Các lựa chọn điều trị tiêu biểu bao gồm dung dịch tái hydrat hóa dùng qua đường miệng (ORS), loperamit, diphenoxylat, và bitmut subsalixylat.

Theo một phương án khác nữa, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chống tăng nhãn áp, các ví dụ về chúng bao gồm: chất chủ vận tác động kiểu adrenalin α như brimonidin; chất đối kháng thụ thể tác động kiểu adrenalin β_1 ; chất phong bế β_1 cục bộ như betaxolol, levobunolol, và timolol; chất ức chế cacbonic anhydraza như axetazolamit, brinzolamit, hoặc dorzolamit; chất chủ vận gây tiết cholin như xevimelin và DMXB-anabasein; hợp chất epinephrin; chất co đồng tử như pilocarpin; và các chất tương tự prostaglandin.

Theo một phương án khác nữa, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất kháng lipid, các ví dụ về chúng bao gồm: chất ức chế protein vận chuyển cholesteryl este (CETP) như anaxetrapib, dalxetrapib, và torxetrapib; statin như atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin và simvastatin; và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chống huyết

khối, các ví dụ về chúng bao gồm: aspirin; chất kháng tiểu cầu như clopidogrel, prasugrel, và ticlopidin; heparin, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể AT₁, còn được biết đến là chất phong bế thụ thể angiotensin II type 1 (ARB). Các ARB tiêu biểu bao gồm abitesartan, azilsartan (ví dụ, azilsartan medoxomil), benzylosartan, candesartan, candesartan cilexetil, elisartan, embusartan, enoltasartan, eprosartan, EXP3174, fonsartan, forasartan, glyxylosartan, irbesartan, isoteolin, losartan, medoxomil, milfasartan, olmesartan (ví dụ, olmesartan medoxomil), opomisartan, prazosartan, ripisartan, saprisartan, saralasin, sarmesin, TAK-591, tasosartan, telmisartan, valsartan, zolasartan, và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, ARB được chọn từ azilsartan medoxomil, candesartan cilexetil, eprosartan, irbesartan, losartan, olmesartan medoxomil, saprisartan, tasosartan, telmisartan, valsartan, và hỗn hợp của chúng. Các muối và/hoặc tiền dược chất lấy làm ví dụ bao gồm candesartan cilexetil, eprosartan mesylat, muối losartan kali, và olmesartan medoxomil. Thông thường, ARB sẽ được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 4 đến 600 mg mỗi liều lượng, với liều lượng hàng ngày lấy làm ví dụ nằm trong khoảng từ 20 đến 320 mg mỗi ngày.

Hợp chất 1 cũng có thể được sử dụng kết hợp với chất tác động kép, như chất ức chế chất đối kháng thụ thể AT₁/chất ức chế neprilysin (ARB/NEP), các ví dụ về chúng bao gồm các hợp chất được mô tả trong Patent Mỹ số 7,879,896 và 8,013,005, và cả ấn phẩm Allegretti et al., như hợp chất, axit 4'-{2-etoxy-4-etyl-5-[(*S*)-2-mercapto-4-methylpentanoylamino)-metyl]imidazol-1-ylmetyl}-3'-flobiphenyl-2- carboxylic.

Hợp chất 1 cũng có thể được sử dụng kết hợp với chất phong bế thụ thể angiotensin đa chức như được mô tả trong tài liệu Kurtz & Klein (2009) *Hypertension Research* 32:826-834.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể bradykinin, ví dụ, icatibant (HOE-140). Mong chờ rằng liệu pháp kết hợp

này có thể có ưu điểm là ngăn ngừa tình trạng phù mạch hoặc các hậu quả không muốn khác do lượng bradykinin tăng cao.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất phong bế kênh canxi, các ví dụ về chúng bao gồm amlodipin, anipamil, aranipin, barnidipin, benxyclan, benidipin, bepridil, clentiazem, cilnidipin, cinarizin, diltiazem, efonidipin, elgodipin, etafenon, felodipin, fendilin, flunarizin, galopamil, isradipin, lacidipin, lercanidipin, lidoflazin, lomerizin, manidipin, mibefradil, nicardipin, nifedipin, niguldipin, niludipin, nilvadipin, nimodipin, nisoldipin, nitrendipin, nivaldipin, perhexilin, prenylamin, ryosidin, semotiadil, terodilin, tiapamil, verapamil, và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, chất phong bế kênh canxi được chọn từ amlodipin, bepridil, diltiazem, felodipin, isradipin, lacidipin, nicardipin, nifedipin, niguldipin, niludipin, nimodipin, nisoldipin, ryosidin, verapamil, và hỗn hợp của chúng. Thông thường, chất phong bế kênh canxi này sẽ được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 2 đến 500 mg trên mỗi liều lượng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất ức chế chymaza, như TPC-806 và 2-(5-formylamino-6-oxo-2-phenyl-1,6-dihydropyrimidin-1-yl)-N-[{3,4-dioxo-1-phenyl-7-(2-pyridyloxy)}-2-heptyl]axetamit (NK3201).

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với thuốc lợi tiểu, các ví dụ về chúng bao gồm: chất ức chế cacbonic anhydrase như axetazolamit và diclophenamit; thuốc lợi tiểu vòng lặp, bao gồm các dẫn xuất sulfonamit như axetazolamit, ambusit, azosemit, bumetanit, butazolamit, cloraminophenamit, clofenamit, clopamit, clorexolon, disulfamit, ethoxzolamit, furosemit, mefrusit, methazolamit, piretanit, torsemit, tripamit, và xipamit, cũng như thuốc lợi tiểu không sulfonamit như axit etacrynic và các hợp chất axit phenoxyaxetic khác như axit tienilic, axit indacrinon và quincabat; thuốc lợi tiểu thẩm thấu như manitol; thuốc lợi tiểu giữ kali, bao gồm chất đối kháng aldosteron như spironolacton, và chất ức chế kênh Na^+ như amilorit và triamteren; thiazit và thuốc lợi tiểu giống thiazit như althiazit, bendroflumethiazit, benzyhydroclothiazit, benzthiazit,

buthiazit, clothalidon, clothiazit, xyclopenthiazit, xyclothiazit, epithiazit, ethiazit, fenquizon, flumethiazit, hydroclothiazit, hydroflumethiazit, indapamit, metylclothiazit, meticran, metolazon, paraflutizit, polythiazit, quinethazon, teclothiazit, và triclomethiazit; và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, thuốc lợi tiểu được chọn từ amilorit, bumetanit, clothiazit, clothalidon, diclophenamit, axit etacrynic, furosemit, hydroclothiazit, hydroflumethiazit, indapamit, metylclothiazit, metolazon, torsemit, triamteren, và hỗn hợp của chúng. Thuốc lợi tiểu này sẽ được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 5 đến 50 mg mỗi ngày, điển hình hơn là từ 6 đến 25 mg mỗi ngày, với liều lượng phổ biến là 6,25 mg, 12,5 mg hoặc 25 mg mỗi ngày.

Hợp chất 1 cũng có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế enzyme chuyển hóa endothelin (ECE), các ví dụ về chúng bao gồm phosphoramidon, CGS 26303, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể endothelin, các ví dụ về chúng bao gồm: chất đối kháng thụ thể endothelin chọn lọc mà tác động đến các thụ thể endothelin A, như avosentan, ambrisentan, atrasentan, BQ-123, clazosentan, darusentan, sitaxentan, và zibotentan; và chất đối kháng thụ thể endothelin kép mà tác động đến cả hai thụ thể endothelin A và B, như bosentan, macitentan, và tezosentan.

Theo một phương án khác nữa, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất ức chế HMG-CoA reductaza, còn được gọi là statin. Các statin tiêu biểu bao gồm atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin và simvastatin.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất ức chế sự tái hấp thu monoamin, các ví dụ về chúng bao gồm chất ức chế sự tái hấp thu norepinephrin như atomoxetin, bupropion và chất chuyển hóa bupropion hydroxybupropion, maprotilin, reboxetin, và viloxazin; chất ức chế sự tái hấp thu serotonin chọn lọc (SSRI) như xitalopram và chất chuyển hóa xitalopram desmetylxitalopram, dapoxetine, esxitalopram (ví dụ, esxitalopram oxalat), floxetin

và chất chuyển hóa floxetin desmetyl norfloxetin, fluvoxamin (ví dụ, fluvoxamin maleat), paroxetin, sertralin và chất chuyển hóa sertralin demetylsertralin; chất ức chế sự tái hấp thu serotonin- norepinephrin (SNRI) như bixifadin, duloxetine, milnacipran, nefazodon, và venlafaxin; và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất giãn cơ, các ví dụ về chúng bao gồm: carisoprodol, clozoxazon, xyclobenzaprin, diflunisal, metaxalon, metocarbamol, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với peptit natri lợi niệu hoặc chất tương tự, các ví dụ về chúng bao gồm: carperitit, CD-NP (Nile Therapeutics), CU-NP, nesiritit, PL-3994 (Palatin Technologies, Inc.), ularitit, xenderitit, và các hợp chất được mô tả trong ấn phẩm Ogawa et al (2004) *J.Biol.Chem.* 279:28625-31. Các hợp chất này còn được gọi là chất chủ vận thụ thể A peptit natri lợi niệu A (NPR-A). Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể thanh thải peptit natri lợi niệu (NPR-C) như SC-46542, cANF (4-23), và AP-811 (Veale (2000) *Bioorg Med Chem Lett* 10:1949-52). Ví dụ, AP-811 cho thấy tính hiệp đồng khi kết hợp với chất ức chế NEP, thiorphan (Wegner (1995) *Clin.Exper.Hypert.* 17:861-876).

Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất ức chế neprilysin (NEP), các ví dụ về chúng bao gồm: AHU-377; candoxatril; candoxatrilat; dexecadotril ((+)-N-[2(R)-(axetylthiometyl)-3-phenylpropionyl]glyxin benzyl este); CGS-24128 (axit 3-[3-(biphenyl-4-yl)-2-(phosphonomethylamino)propionamido]propionic); CGS-24592 (axit (S)-3-[3-(biphenyl-4-yl)-2-(phosphonomethylamino)propionamido]propionic); CGS-25155 các dẫn xuất của axit (N-[9(R)-(axetylthiometyl)-10-oxo-1-azaxyclodecan-2(S)-ylcarbonyl]-4(R)-hydroxy-L-prolin benzyl este); 3-(1-carbamoylxyclohexyl)propionic được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2006/027680 của Hepworth et al. (Pfizer Inc.); JMV-390-1 (2(R)-benzyl-3-(N-hydroxycarbamoyl)propionyl-L-isoleuxyl-L-leuxin); ecadotril; phosphoramidon; retrothiorphan; RU-42827 (2-(mercaptometyl)-N-(4-pyridinyl)benzenpropionamit); RU-44004 (N-(4-morpholinyl)-3-phenyl-2-(sulfanylmetyl)propionamit); SCH-

32615 ((*S*)-N-[N-(1-carboxy-2-phenylethyl)-L-phenylalanyl]-β-alanin) và tiền dược chất của nó SCH-34826 ((*S*)-N-[N-[1-[[2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy]carbonyl]-2-phenylethyl]-L-phenylalanyl]-β-alanin); sialorphan; SCH-42495 (N-[2(*S*)-(acetysulfanylmethyl)-3-(2-methylphenyl)propionyl]-L-methionine ethyl ester); spinorphan; SQ-28132 (N-[2-(mercaptomethyl)-1-oxo-3-phenylpropyl]leuxin); SQ-28603 (N-[2-(mercaptomethyl)-1-oxo-3-phenylpropyl]-β-alanin); SQ-29072 (axit 7-[[2-(mercaptomethyl)-1-oxo-3-phenylpropyl]amino]heptanoic); thiorphan và tiền dược chất của nó raxecadotril; UK-69578 (axit cis-4-[[[1-[2-carboxy-3-(2-methoxyethoxy)propyl]cyclopentyl]carbonyl]amino] cyclohexanecarboxylic); UK-447,841 (axit 2-{1-[3-(4-chlorophenyl)propylcarbamoyl]-cyclopentylmethyl}-4-methoxybutyric); UK-505,749 (axit (*R*)-2-methyl-3-{1-[3-(2-methylbenzothiazol-6-yl)propylcarbamoyl]cyclopentyl}propionic); axit 5-biphenyl-4-yl-4-(3-carboxypropionylamino)-2-methylpentanoic và etyl este của axit 5-biphenyl-4-yl-4-(3-carboxypropionylamino)-2-methylpentanoic (WO 2007/056546); daglutril [axit (3*S*,2'*R*)-3-{1-[2'-(ethoxycarbonyl)-4'-phenylbutyl]-cyclopentan-1-carbonylamino}-2,3,4,5-tetrahydro-2-oxo-1H-1-benzazepin-1-axetic] được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2007/106708 của Khder et al. (Novartis AG); và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, chất ức chế NEP được chọn từ AHU-377, candoxatril, candoxatrilat, CGS-24128, phosphoramidon, SCH-32615, SCH-34826, SQ-28603, thiorphan, và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, chất ức chế NEP là hợp chất như daglutril hoặc CGS-26303 (axit [N-[2-(biphenyl-4-yl)-1(*S*)-(1H-tetrazol-5-yl)ethyl]amino]methylphosphonic), có hoạt tính dưới cả hai dạng là chất ức chế của enzym chuyển hóa endothelin (ECE) và của NEP. Hợp chất ECE/NEP tác động kép khác cũng có thể được sử dụng. Chất ức chế NEP sẽ được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 20 đến 800 mg mỗi ngày, với các liều lượng hàng ngày thông thường nằm trong khoảng từ 50 đến 700 mg mỗi ngày, phổ biến hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 600 hoặc khoảng từ 100 đến 300 mg mỗi ngày.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất cho nitơ oxit, các ví dụ về chúng bao gồm: nicorandil; nitrat hữu cơ như pentaerythritol

tetranitrat; và sydnonimin như linsidomin và molsidomin.

Theo một phương án khác nữa, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất kháng viêm không sterotit (non-steroidal anti-inflammatory agent - NSAID), các ví dụ về chúng bao gồm: axemetaxin, axit axetyl salixylic, alclofenac, alminoprofen, amfenac, amipriloza, aloxiprin, anirolac, apazon, azapropazon, benorilat, benoxaprofen, bezpiperylon, broperamol, axit bucloxic, carprofen, clidanac, diclofenac, diflunisal, diftalon, enolicam, etodolac, etoricoxib, fenbufen, fenclofenac, axit fenclozic, fenoprofen, fentiazac, feprazon, axit flufenamic, flufenisal, fluprofen, flurbiprofen, furofenac, ibufenac, ibuprofen, indomethaxin, indoprofen, isoxepac, isoxicam, ketoprofen, ketorolac, lofemizol, lornoxicam, meclofenamat, axit meclofenamic, axit mefenamic, meloxicam, mesalamin, mioprofen, mofebutazon, nabumeton, naproxen, axit niflumic, oxaprozin, oxpinac, oxyphenbutazon, phenylbutazon, piroxicam, pirprofen, pranoprofen, salsalat, sudoxicam, sulfasalazin, sulindac, suprofen, tenoxicam, tiopinac, axit tiaprofenic, tioxaprofen, axit tolfenamic, tolmetin, triflumidat, zidometaxin, zomepirac, và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, NSAID được chọn từ etodolac, flurbiprofen, ibuprofen, indomethaxin, ketoprofen, ketorolac, meloxicam, naproxen, oxaprozin, piroxicam, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể N-metyl d-aspartat (NMDA), các ví dụ về chúng bao gồm amantadin, dextromethorphan, dextropropoxyphen, ketamin, ketobemidon, memantin, methadon, và v.v...

Theo một phương án khác nữa, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chủ vận thụ thể opioit (còn được gọi là chất giảm đau opioit). Chất chủ vận thụ thể opioit tiêu biểu bao gồm: buprenorphin, butorphanol, codein, dihydrocodein, fentanyl, hydrocodon, hydromorphon, levalorphan, levorphanol, meperidin, methadon, morphin, nalbuphin, nalmefen, nalorphin, naloxon, naltrexon, nalorphin, oxycodon, oxymorphon, pentazoxin, propoxyphen, tramadol, và hỗn hợp của chúng. Theo các phương án đã biết, chất chủ vận thụ thể opioit được chọn từ codein, dihydrocodein, hydrocodon, hydromorphon, morphin, oxycodon,

oxymorphon, tramadol, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất ức chế phosphodiesteraza (PDE), đặc biệt là chất ức chế PDE-V. Chất ức chế PDE-V tiêu biểu bao gồm avanafil, lodenafil, mirodenafil, sildenafil (Revatio®), tadalafil (Adcirca®), vardenafil (Levitra®), và udenafil.

Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với các chất tương tự prostaglandin (còn được gọi là prostanoid hoặc chất tương tự prostacyclin). Các chất tương tự prostaglandin tiêu biểu bao gồm beraprost natri, bimatoprost, epoprostenol, iloprost, latanoprost, tafluprost, travoprost, và treprostinil, với bimatoprost, latanoprost, và tafluprost được quan tâm đặc biệt.

Theo một phương án khác nữa, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chủ vận thụ thể prostaglandin, các ví dụ về chúng bao gồm bimatoprost, latanoprost, travoprost, và v.v..

Hợp chất 1 cũng có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế renin, các ví dụ về chúng bao gồm aliskiren, enalkiren, remikiren, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất ức chế sự tái hấp thu serotonin chọn lọc (SSRI), các ví dụ về chúng bao gồm: xitalopram và chất chuyển hóa xitalopram desmethyl-xitalopram, dapoxetine, esxitalopram (ví dụ, esxitalopram oxalat), floxetin và chất chuyển hóa floxetin desmethyl norfloxetin, fluvoxamin (ví dụ, fluvoxamin maleat), paroxetine, sertraline và chất chuyển hóa sertraline demethylsertraline, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chủ vận thụ thể serotonin 5-HT_{1D}, các ví dụ về chúng bao gồm, triptan như almotriptan, avitriptan, eletriptan, frovatriptan, naratriptan, rizatriptan, sumatriptan, và zolmitriptan.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất phong bế kênh natri, các ví dụ về chúng bao gồm carbamazepin, fosphenytoin, lamotrigine, lidocaine, mexiletin, oxcarbazepin, phenytoin, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với các chất ức chế hoặc chất hoạt hóa guanylat xyclaza dễ tan, các ví dụ về chúng bao gồm ataxiguat, rioxiguat, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chống trầm cảm dạng ba vòng (TCA), các ví dụ về chúng bao gồm amitriptylin, amitriptylinoxit, butriptylin, clomipramin, demexiptilin, desipramin, dibenzepin, dimetacrin, dosulepin, doxepin, imipramin, imipraminoxit, lofepramin, melitracen, metapramin, nitroxazepin, nortriptylin, noxiptilin, pipofezin, propizepin, protriptylin, quinupramin, và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể vasopresin, các ví dụ về chúng bao gồm conivaptan và tolvaptan.

Các chất trị liệu thứ cấp kết hợp cũng có thể hữu hiệu trong liệu pháp kết hợp khác với hợp chất theo sáng chế. Ví dụ, hợp chất theo sáng chế có thể được kết hợp với thuốc lợi tiểu và ARB, hoặc chất phong bế kênh canxi và ARB, hoặc thuốc lợi tiểu và chất ức chế ACE, hoặc chất phong bế kênh canxi và statin. Các ví dụ cụ thể bao gồm, hỗn hợp của chất ức chế ACE enalapril (dưới dạng muối maleat) và thuốc lợi tiểu hydroclothiazit, được bán với nhãn hiệu là Vaseretic®, hoặc hỗn hợp của chất phong bế kênh canxi amlodipin (dưới dạng muối besylat) và ARB olmesartan (dưới dạng tiền dược chất medoxomil), hoặc hỗn hợp của chất phong bế kênh canxi và statin, tất cả các chất này có thể cũng được sử dụng với hợp chất 1. Các chất trị liệu khác như chất chủ vận thụ thể tác động kiểu adrenalin α_2 và chất đối kháng thụ thể vasopresin cũng có thể hữu ích trong liệu pháp kết hợp. Chất chủ vận thụ thể tác động kiểu adrenalin α_2 lấy làm ví dụ bao gồm clonidin, dexmedetomidin, và guanfaxin.

Các chế phẩm sau đây minh họa được phẩm tiêu biểu theo sáng chế.

Viên nang gelatin cứng lấy làm ví dụ để dùng qua đường miệng

Hợp chất theo sáng chế (50 g), 440 g lactoza đã được sấy phun và 10 g magie stearat được phối trộn kỹ. Sau đó, chế phẩm tạo thành được nạp vào trong viên nang gelatin cứng (500 mg chế phẩm trong mỗi viên nang). Theo cách khác,

hợp chất 1 (20 mg) được trộn kỹ với tinh bột (89 mg), xenluloza vi tinh thể (89 mg) và magie stearat (2 mg). Sau đó, hỗn hợp này được cho đi qua sàng mắt lưới Mỹ số 45 và được nạp vào trong viên nang gelatin cứng (200 mg chế phẩm trong mỗi viên nang).

Theo cách khác, hợp chất 1 (30 g), chất thứ yếu (20 g), 440 g lactoza được sấy phun và 10 g magie stearat được phối trộn kỹ, và được xử lý như được mô tả ở trên.

Chế phẩm viên nang gelatin lấy làm ví dụ để dùng qua đường miệng

Hợp chất 1 (100 mg) được trộn kỹ với polyoxyetylen sorbitan monooleat (50 mg) và bột tinh bột (250 mg). Sau đó hỗn hợp này được nạp vào trong viên nang gelatin (400 mg chế phẩm trong mỗi viên nang). Theo cách khác, hợp chất 1 (70 mg) và chất thứ yếu (30 mg) được phối trộn kỹ với polyoxyetylen sorbitan monooleat (50 mg) và bột tinh bột (250 mg), và hỗn hợp tạo thành được nạp vào trong viên nang gelatin (400 mg chế phẩm trong mỗi viên nang).

Theo cách khác, hợp chất 1 (40 mg) được trộn kỹ với xenluloza vi tinh thể (Avicel PH 103; 259,2 mg) và magie stearat (0,8 mg). Sau đó hỗn hợp này được nạp vào trong viên nang gelatin (Size #1, White, Opaque) (300 mg chế phẩm trong mỗi viên nang).

Viên nang Hydroxypropyl Metylxenluloza (HPMC) lấy làm ví dụ để dùng qua đường miệng

Hợp chất 1 (50 mg hoặc 100 mg) được nạp trực tiếp vào viên nang HPMC.

Chế phẩm viên nén lấy làm ví dụ để dùng qua đường miệng

Hợp chất 1 (10 mg), tinh bột (45 mg) và xenluloza vi tinh thể (35 mg) được cho đi qua sàng mắt lưới Mỹ số 20 và được trộn kỹ. Các hạt được tạo ra theo cách đó được sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 60°C và được cho đi qua sàng mắt lưới Mỹ số 16. Dung dịch chứa polyvinylpyrrolidon (4 mg dưới dạng dung dịch 10% trong nước vô trùng) được trộn với tinh bột natri carboxymetyl (4,5 mg), magie stearat (0,5 mg), và bột talc (1 mg), và sau đó hỗn hợp này được cho đi qua

sàng mắt lưới Mỹ số 16. Sau đó, tinh bột natri carboxymetyl, magie stearat và bột talc được bổ sung vào các hạt đó. Sau khi trộn, hỗn hợp này được nén trên máy nén tạo viên để tạo ra viên nén có trọng lượng là 100 mg.

Theo cách khác, hợp chất 1 (250 mg) được trộn kỹ với xenluloza vi tinh thể (400 mg), silic dioxit hóa sinh (10 mg), và axit stearic (5 mg). Sau đó hỗn hợp này được nén để tạo ra viên nén (665 mg chế phẩm trong mỗi viên nén).

Theo cách khác, hợp chất 1 (400 mg) được trộn kỹ với tinh bột ngô (50 mg), croscarmellose natri (25 mg), lactose (120 mg), và magie stearat (5 mg). Sau đó hỗn hợp này được nén để tạo ra viên nén một khía (600 mg chế phẩm trong mỗi viên nén).

Theo cách khác, hợp chất 1 (100 mg) được trộn kỹ với tinh bột ngô (100 mg) với dung dịch trong nước chứa gelatin (20 mg). Hỗn hợp này được sấy khô và được nghiền thành bột mịn. Xenluloza vi tinh thể (50 mg) và magie stearat (5 mg) sau đó được trộn lẫn với chế phẩm gelatin, được tạo hạt và hỗn hợp tạo thành được nén để tạo ra viên nén (100 mg hợp chất theo sáng chế trong mỗi viên nén).

Chế phẩm dạng hỗn dịch lấy làm ví dụ để dùng qua đường miệng

Các thành phần sau đây được trộn để tạo ra hỗn dịch chứa 100 mg hợp chất 1 trên mỗi 10 mL hỗn dịch:

Thành phần	Lượng
Hợp chất 1	1,0 g
Axit fumaric	0,5 g
Natri clorua	2,0 g
Metyl paraben	0,15 g
Propyl paraben	0,05 g
Đường dạng hạt	25,5 g
Sorbitol (dung dịch 70%)	12,85 g
Veegum® K (magie nhôm silicat)	1,0 g
Chất tạo hương vị	0,035 mL
Chất tạo màu	0,5 mg
Nước cất	Vừa đủ đến 100 mL

Chế phẩm lỏng lấy làm ví dụ để dùng qua đường miệng

Chế phẩm lỏng thích hợp là chế phẩm có dung dịch đậm gốc axit carboxylic

như các dung dịch đệm xitrat, lactat và maleat. Ví dụ, hợp chất 1 (mà có thể được trộn sẵn với DMSO) được phối trộn với dung dịch đệm amoni xitrat 100 mM và độ pH được điều chỉnh đến độ pH=5, hoặc được phối trộn với dung dịch axit xitric 100 mM và độ pH được điều chỉnh đến độ pH=2. Các dung dịch này cũng có thể bao gồm tá dược hòa tan như xyclodextrin chẳng hạn, dung dịch này có thể bao gồm hydroxypropyl- β -cyclodextrin 10% trọng lượng.

Các chế phẩm thích hợp khác bao gồm dung dịch NaHCO_3 5%, có hoặc không có xyclodextrin.

Chế phẩm IV dùng ngoài đường tiêu hóa lấy làm ví dụ để dùng bằng cách tiêm

Hợp chất 1 (0,2 g) được phối trộn với dung dịch đệm natri axetat 0,4 M (2,0 mL). Độ pH của dung dịch tạo thành được điều chỉnh đến độ pH=4 bằng cách sử dụng axit clohydric trong nước 0,5 N hoặc natri hydroxit chứa nước 0,5 N, nếu cần, và sau đó một lượng nước đủ để tiêm được bổ sung vào để tạo ra tổng thể tích bằng 20 mL. Hỗn hợp này sau đó được lọc qua bộ lọc vô trùng (0,22 micron) để tạo ra dung dịch vô trùng thích hợp để dùng bằng cách tiêm.

Các chế phẩm sau đây minh họa các dược phẩm tiêu biểu theo sáng chế.

Ví dụ chế phẩm A

Dung dịch đông lạnh thích hợp để điều chế dung dịch tiêm được pha chế như sau:

Thành phần	Lượng
Hợp chất hoạt tính 1 hoặc 1'	từ 10 đến 1000 mg
Tá dược (ví dụ, dextroza)	từ 0 đến 50 g
Nước dùng cho dung dịch tiêm	từ 10 đến 100 mL

Quy trình tiêu biểu: các tá dược, nếu có, được hòa tan trong khoảng 80% nước dùng để tiêm và hợp chất hoạt tính 1 hoặc 1' được bổ sung vào và được hòa tan.

Độ pH được điều chỉnh bằng natri hydroxit 1 M đến độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 4,5 và sau đó thể tích được điều chỉnh đến 95% thể tích cuối cùng với nước dùng để tiêm. Độ pH được kiểm tra và được điều chỉnh, nếu cần, và thể tích được điều chỉnh đến thể tích cuối cùng với nước dùng để tiêm. Chế phẩm này sau đó được lọc vô trùng qua bộ vi lọc 0,22 và được đưa vào lọ nhỏ vô trùng trong các điều kiện vô trùng. Lọ nhỏ này được đậy nắp, dán nhãn và được bảo quản đông lạnh.

Ví dụ chế phẩm B

Bột được làm khô lạnh hoặc chất rắn tinh thể thích hợp để pha chế dung dịch tiêm được điều chế như sau:

Thành phần	Lượng
Hợp chất hoạt tính 1 hoặc 1'	10 đến 1000 mg
Tá dược (ví dụ, manitol và/hoặc sucroza)	0 đến 50 g
Chất đệm (ví dụ, xitrat)	0 đến 500 mg
Nước dùng để tiêm	10 đến 100 mL

Quy trình tiêu biểu: Tá dược và/hoặc chất đệm, nếu có, được hòa tan trong khoảng 60% nước dùng để tiêm. Hợp chất hoạt tính 1 hoặc 1' được bổ sung vào và được hòa tan và độ pH được điều chỉnh bằng natri hydroxit 1 M đến độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 4,5 và thể tích được điều chỉnh đến 95% thể tích cuối cùng với nước dùng để tiêm. Độ pH được kiểm tra và điều chỉnh, nếu cần, và thể tích được điều chỉnh đến thể tích cuối cùng với nước dùng để tiêm. Chế phẩm này sau đó được lọc vô trùng qua bộ vi lọc 0,22 và được đưa vào lọ nhỏ vô trùng trong điều kiện vô trùng. Chế phẩm này sau đó được sấy đông lạnh bằng cách sử dụng chu trình làm khô lạnh thích hợp. Lọ nhỏ được đậy nắp (tùy ý trong điều kiện chân không một phần hoặc nitơ khô), được dán nhãn và được bảo quản lạnh.

Ví dụ chế phẩm C

Dung dịch tiêm để dùng trong tĩnh mạch cho bệnh nhân được pha chế từ Ví dụ chế phẩm B ở trên như sau:

Quy trình tiêu biểu: Bột được làm khô lạnh trong Ví dụ chế phẩm B (ví dụ, chứa

hợp chất hoạt tính 1 hoặc 1' với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1000 mg) được hoàn nguyên với 20 mL nước vô trùng và dung dịch tạo thành được pha loãng thêm với 80 mL nước muối vô trùng trong túi truyền dịch dung tích 100 mL. Sau đó dung dịch đã pha loãng được dùng cho bệnh nhân trong tĩnh mạch trong thời gian từ 30 đến 120 phút.

Chế phẩm lấy làm ví dụ để dùng bằng cách xông hít

Hợp chất 1 (0,2 mg) được micron hóa và sau đó được phối trộn với lactoza (25 mg). Hỗn hợp đã phối trộn này sau đó được nạp vào ống xông hít gelatin. Các thành phần của ống này được dùng bằng cách sử dụng dụng cụ xông hít bột khô chẳng hạn.

Theo cách khác, hợp chất 1 đã được micron hóa (10 g) được phân tán trong dung dịch pha chế bằng cách hòa tan lexithin (0,2 g) trong nước đã khử khoáng (200 mL). Hỗn dịch tạo thành được sấy phun và sau đó được micron hóa để tạo ra chế phẩm được micron hóa chứa các hạt có đường kính trung bình nhỏ hơn khoảng 1,5 μm . Chế phẩm đã micron hóa này sau đó được nạp vào ống xông hít định liều chứa 1,1,1,2-tetrafluoroetan đã ép với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 10 μg đến 500 μg hợp chất theo sáng chế trên mỗi liều lượng khi được dùng bằng dụng cụ xông hít.

Theo cách khác, hợp chất 1 (25 mg) được hòa tan trong dung dịch muối đẳng trương được đệm xitrat (độ pH=5) (125 mL). Hỗn hợp này được khuấy và được khuấy bằng sóng âm cho đến khi hợp chất được hòa tan. Độ pH của dung dịch được kiểm tra và được điều chỉnh, nếu cần, đến độ pH=5 bằng cách bổ sung từ từ dung dịch NaOH chứa nước 1 N. Dung dịch này được dùng bằng cách sử dụng dụng cụ phun sương mà cung cấp từ khoảng 10 μg đến khoảng 500 μg hợp chất 1 mỗi liều.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các quy trình điều chế và các ví dụ dưới đây được nêu nhằm minh họa các phương án cụ thể của sáng chế. Tuy nhiên, các phương án cụ thể này không được dự định nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ trừ khi có quy định

khác.

Các chữ viết tắt dưới đây có các nghĩa nêu dưới đây trừ khi có quy định khác và các chữ viết tắt bất kỳ khác được sử dụng trong bản mô tả này và không được định nghĩa sẽ có nghĩa tiêu chuẩn được chấp nhận phổ biến:

BOC	<i>t</i> -butoxycarbonyl (-C(O)OC(CH ₃) ₃)
DCM	diclometan hoặc metylen clorua
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyletylamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamit
EDTA	axit etylendiamintetraaxetic
EtOH	etanol
Et ₂ O	dietyl ete
EtOAc	etyl axetat
HATU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyl-O-(7-azabenzotriazol-1-yl)uroni hexaflophosphat
KHMDS	kali bis(trimetylsilyl)amit
MeCN	axetonitril
NaHMDS	natri bis(trimetylsilyl)amit
Pd(dppf) ₂ Cl ₂	1,1-bis(diphenylphosphino)feroxen paladi clorua
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0)
PE	ete dầu mỏ
PyBOP	benzotriazol-1-yloxytris(pyrolidino)phosphoni hexaflophosphat
TFA	axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran

Trừ khi có lưu ý khác, tất cả các vật liệu, như các chất phản ứng, vật liệu ban

đầu và dung môi, được mua từ các nhà cung cấp thương mại (như Sigma-Aldrich, Fluka Riedel-de Haën, và các nhà cung cấp tương tự) và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Các phản ứng được tiến hành trong môi trường khí nitơ, trừ khi có lưu ý khác. Quy trình phản ứng được theo dõi bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng (TLC), kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao phân tích (HPLC phân tích), và kỹ thuật phổ khối, phần mô tả chi tiết về các phương pháp này được đưa ra trong các ví dụ cụ thể. Nói chung, các dung môi được sử dụng trong HPLC phân tích là như sau: dung môi A là H₂O 98%/MeCN 2%/TFA 1,0 mL/L; dung dịch B là MeCN 90%/H₂O 10%/TFA 1,0 mL/L.

Các phản ứng được cho tiếp diễn như được mô tả cụ thể trong từng ví dụ điều chế; các hỗn hợp phản ứng phổ biến được tinh chế bằng các phương pháp chiết và các phương pháp tinh chế khác như kết tủa và kết tinh phụ thuộc vào nhiệt độ và dung môi. Ngoài ra, các hỗn hợp phản ứng được tinh chế theo cách thông thường bằng kỹ thuật HPLC điều chế, thường là sử dụng cột đóng gói Microsorb C18 và Microsorb BDS và các chất rửa giải thông thường. Sự tiến triển của các phản ứng thường được đo bằng phương pháp sắc ký lỏng-khối phổ (LCMS). Việc đặc trưng hóa các chất đồng phân được thực hiện bằng phương pháp quang phổ hiệu ứng Overhauser hạt nhân (Nuclear Overhauser effect spectroscopy) (NOE). Việc đặc trưng hóa sản phẩm phản ứng thường được tiến hành bằng phương pháp phổ khối và phổ ¹H-NMR. Đối với việc đo NMR, các mẫu được hòa tan trong dung môi đã được đơteri hóa (CD₃OD, CDCl₃, hoặc DMSO-*d*₆), và phổ ¹H-NMR được thu bằng thiết bị Varian Gemini 2000 (400 MHz) trong điều kiện quan sát tiêu chuẩn. Việc nhận biết các hợp chất dựa vào khối phổ thường được tiến hành bằng phương pháp ion hóa tia điện (ESMS) với thiết bị API 150 EX môđem Applied Biosystems (Foster City, CA) hoặc thiết bị 1200 LC/MSD môđem Agilent (Palo Alto, CA).

Các kỹ thuật đo

Nhiều xạ bột tia X

Phương pháp phân tích nhiễu xạ bột tia X được tiến hành bằng cách sử dụng

nhiều xạ kế tia X Bruker D8-Advance. Nguồn tia X là bức xạ Cu-K α với điện áp ra bằng 40 kV và dòng điện là 40 mA. Thiết bị này được hoạt động theo hình học Bragg-Brentano và Goebel Mirrors được sử dụng để thu được chùm tia X song song. Bất cứ sự phân kỳ nào trong chùm tia này cũng được giới hạn bởi độ phân kỳ thẳng đứng 0,2° tách tại nguồn và Soller tách (2,5°) tại nguồn và bộ dò. Đối với phép đo này, một lượng bột nhỏ (5-25 mg) được ép nhẹ lên trên thiết bị giữ mẫu silic nền 0 để tạo ra bề mặt nhẵn và cho tiếp xúc với tia X. Các mẫu được quét theo chế độ θ -2 θ kết hợp từ 2° đến 35° theo 2 θ với cỡ bước bằng 0,02° và tốc độ quét bằng 0,3 giây mỗi bước. Việc thu thập dữ liệu được kiểm soát bằng phần mềm Bruker DiffraSuite và được phân tích bằng phần mềm Jade (phiên bản 7.5.1). Thiết bị này được định chuẩn bằng tiêu chuẩn corundum, trong góc $\pm 0,02^\circ$ 2 θ .

Nên lưu ý rằng hình học Bragg-Brentano được sử dụng trong quá trình thu thập dữ liệu để có định hướng ưu tiên. Trong các điều kiện này, có thể là cường độ tương đối của các đỉnh nhiễu xạ không thể hiện các cường độ tương đối thực tế có được từ quá trình phân bố được lý tưởng hóa của các hạt hình cầu hoặc từ mẫu nhiễu xạ được mô phỏng từ dữ liệu tinh thể đơn. Cũng có thể là một số đỉnh không được quan sát thấy ở một số mẫu nhiễu xạ do sự định hướng ưu tiên hơn.

Phương pháp đo nhiệt lượng quét vi sai

Các phép đo DSC được tiến hành bằng cách sử dụng môđun TA Instruments Model Q-100 với bộ điều chỉnh phân tích nhiệt Thermal Analyst. Dữ liệu được thu thập và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích TA Instruments Universal (TA Instruments Universal Analysis software). Mẫu được cân chính xác vào chảo nhôm được che phủ. Sau khoảng thời gian làm cân bằng theo đường đẳng nhiệt 5 phút ở nhiệt độ 5°C, mẫu được gia nhiệt bằng cách sử dụng độ dốc gia nhiệt tuyến tính bằng 10°C/phút từ 0°C đến 200°C.

Phân tích nhiệt trọng

Các phép đo nhiệt trọng lượng được tiến hành bằng cách sử dụng môđun TA Instruments Model Q-500 (TA Instruments Model Q-500 module) được trang bị có khả năng phân giải cao. Dữ liệu được thu thập bằng cách sử dụng bộ điều chỉnh

phân tích nhiệt TA Instruments (TA Instruments Thermal Analyst Controller) và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích TA Instruments Universal (TA Instruments Universal Analysis software). Mẫu đã cân được đặt lên trên chảo platin và được quét với tốc độ gia nhiệt bằng $10^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ từ nhiệt độ môi trường đến nhiệt độ 200°C . Các buồng cân bằng và buồng đốt được dẫn lọc bằng dòng khí nitơ trong khi sử dụng.

Hiển vi ánh sáng phân cực

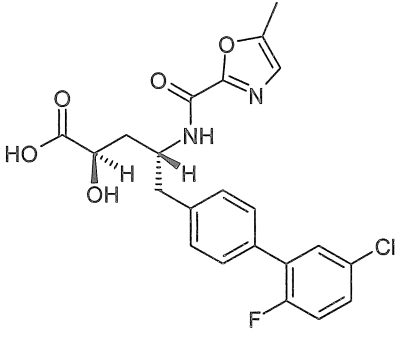
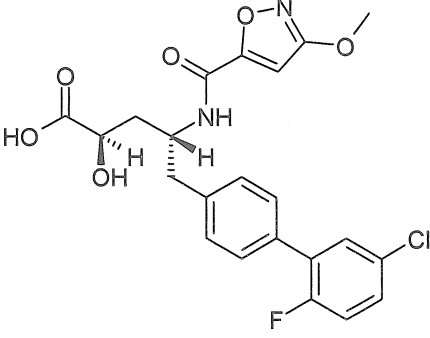
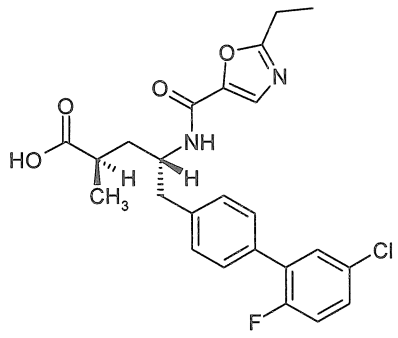
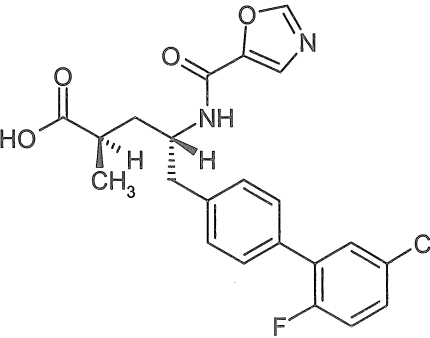
Đối với các nghiên cứu bằng kính hiển vi ánh sáng phân cực (polarized light microscope - PLM), các mẫu được thăm định dưới kính hiển vi quang học (Olympus BX51) có bộ lọc ánh sáng phân cực chéo. Các hình ảnh được thu bằng máy quay PaxCam được điều khiển bằng phần mềm chụp ảnh PaxIt (PaxIt Imaging Software) (phiên bản 6.4). Các mẫu được tạo ra trên các lát kính mỏng có dầu khoáng nhẹ làm môi trường ngâm. Tùy thuộc vào cỡ hạt, vật kính 4x, 10x hoặc 20x được sử dụng để phóng đại.

Đánh giá sự hấp phụ hơi ẩm động lực

Các phép đo DMS được tiến hành bằng cách sử dụng cân vi lượng khí quyển VTI, hệ thống SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Mẫu đã cân được sử dụng và độ ẩm là trị số thấp nhất có thể có (gần với độ ẩm tương đối 0%) khi bắt đầu phân tích. Phép phân tích DMS bao gồm tốc độ quét bằng độ ẩm tương đối 5%/bước trong khoảng độ ẩm đầy đủ nằm trong khoảng từ 5 đến 90%. Việc chạy DMS được tiến hành đẳng nhiệt ở nhiệt độ 25°C .

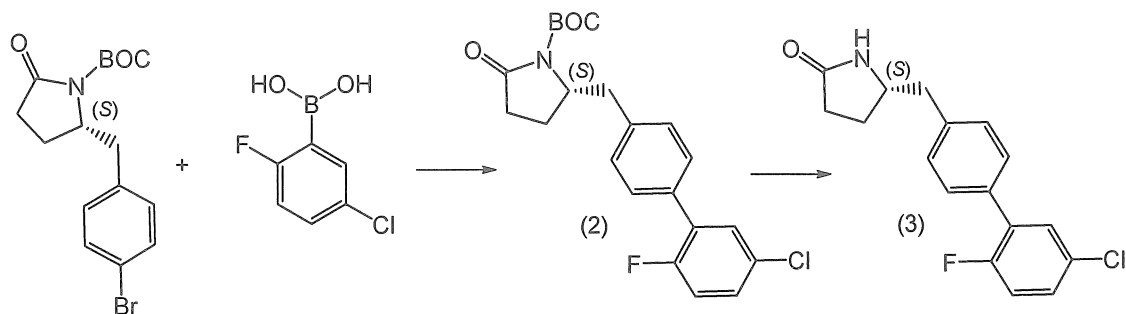
Quy trình tổng hợp và các ví dụ so sánh

Các hợp chất sau đây được tổng hợp và được đánh giá về hoạt tính ức chế enzym NEP:

Tên hợp chất	Quy trình điều chế/ Ví dụ	Công thức cấu tạo
Hợp chất 1	Quy trình điều chế 1/Ví dụ 1	
Hợp chất so sánh C2	Quy trình điều chế 1/Ví dụ 2	
Hợp chất so sánh C3	Quy trình điều chế 2/Ví dụ 3	
Hợp chất so sánh C4	Quy trình điều chế 2/Ví dụ 4	

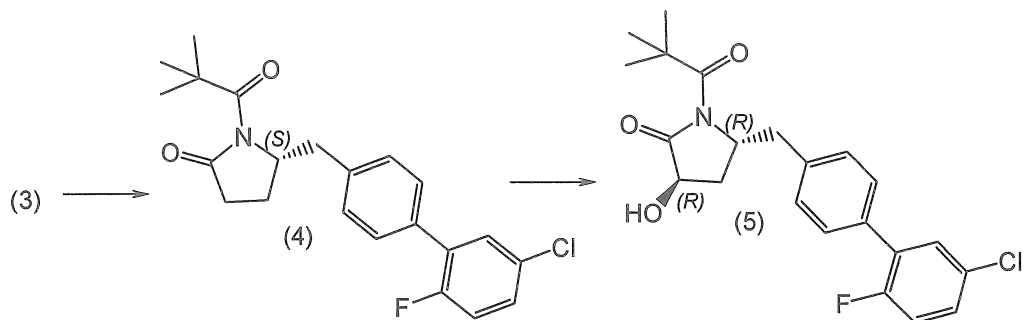
Quy trình điều chế 1: Etyl este của axit (2*R*,4*R*)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-

4-yl)-2-hydroxypentanoic (Hợp chất 7)



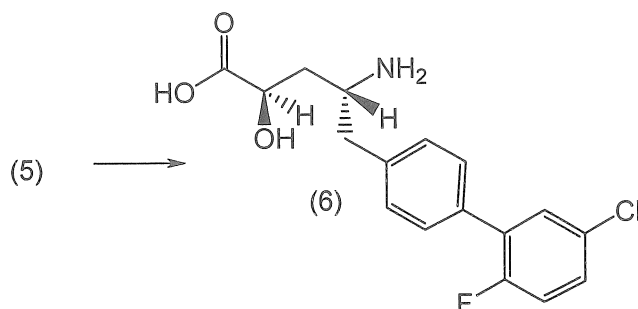
Bổ sung axit 5-clo-2-flophenylboronic (24,6 g, 141 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4,1 g, 3,5 mmol) và dung dịch chứa K_2CO_3 (17,8 g, 141 mmol) trong nước (90 mL) vào dung dịch chứa *t*-butyl este của axit (*S*)-2-(4-bromobenzyl)-5-oxopyrrolidin-1-carboxylic (25 g, 70,6 mmol) trong 1,4-dioxan (500 mL), ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường khí nitơ. Hỗn hợp được gia nhiệt đến nhiệt độ 60°C và được khuấy qua đêm. Nước (500 mL) được bổ sung vào và dung môi được làm bay hơi. Hỗn hợp này được chiết bằng EtOAc (200 mLx3). Các lớp hữu cơ đã kết hợp được rửa bằng dung dịch NaCl chứa nước bão hòa (300 mL) và được lọc. Phần lọc được cô để tạo ra cặn thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để tạo ra hợp chất 2 (22,7 g) ở dạng chất rắn màu vàng sáng. LC-MS: 829,2 $[2\text{M}+\text{Na}^+]$.

Bổ sung TFA (4,5 mL, 60,7 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất 2 (4,9 g, 12,1 mol) trong DCM (100 mL) ở nhiệt độ 0°C trong môi trường khí nitơ, và được khuấy trong thời gian 1 giờ. Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1,5 giờ. Sau khi làm bay hơi dung môi, cặn được pha loãng bằng EtOAc (100 mL), sau đó được rửa bằng dung dịch NaHCO_3 chứa nước bão hòa (100 mLx3), nước (100 mLx2), dung dịch NaCl chứa nước bão hòa (100 mL), và sau đó được làm khô trên Na_2SO_4 . Hỗn hợp này được lọc và phần lọc được cô để tạo ra hợp chất thô 3. LC-MS: 304 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

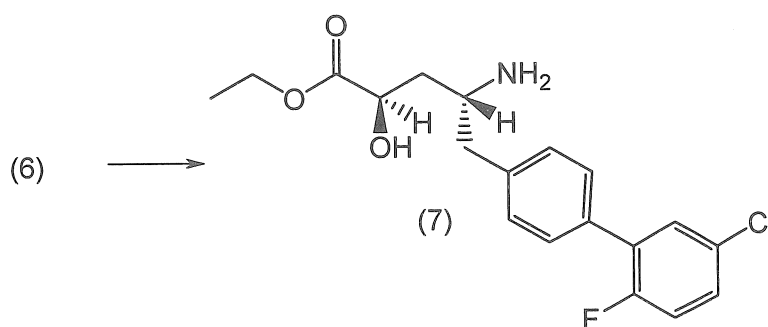


Bổ sung từng giọt dung dịch chứa hợp chất 3 (8,5 g, 278 mmol) vào dung dịch chứa NaH (2,4 g, 695 mmol) trong THF (200 mL) trong THF (50 mL) ở nhiệt độ 0°C trong môi trường khí nitơ. Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong thời gian 2 giờ. Sau khi làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C, pivaloyl clorua (5 g, 41,7 mmol) được bổ sung từng giọt vào trong thời gian 30 phút. Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong thời gian 9,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội bằng dung dịch NH₄Cl chứa nước bão hòa (250 mL) và được chiết bằng EtOAc (400 mLx3). Các lớp hữu cơ đã kết hợp được làm khô trên Na₂SO₄ và được cô để tạo ra cặn thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để tạo ra hợp chất 4 (18 g) ở dạng chất rắn màu vàng. LC-MS: 388 [M+H⁺].

Bổ sung từng giọt NaHMDS (20,9 mL, 41,8 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất 4 (9 g, 23,2 mmol) trong THF (200 mL) ở nhiệt độ -78°C trong môi trường khí nitơ. Sau khi khuấy trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ -78°C, dung dịch chứa (+)-(8,8-diclocamphorylsulfonyl)oxaziridin (10,4 g, 34,8 mmol) trong THF (50 mL) được bổ sung vào từng giọt. Sau khi khuấy ở nhiệt độ -78°C trong thời gian 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được làm nguội bằng dung dịch NH₄Cl chứa nước bão hòa (50 mL) và được chiết bằng EtOAc (400 mLx3). Các lớp hữu cơ đã kết hợp được rửa bằng HCl chứa nước 1M (400 mL), dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa (400 mL), và dung dịch NaCl chứa nước bão hòa (400 mL), được làm khô trên Na₂SO₄, và được cô để tạo ra cặn thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký để tạo ra hợp chất 5 (8,8 g) ở dạng bán rắn màu trắng. LC-MS: 426,1 [M+Na⁺].

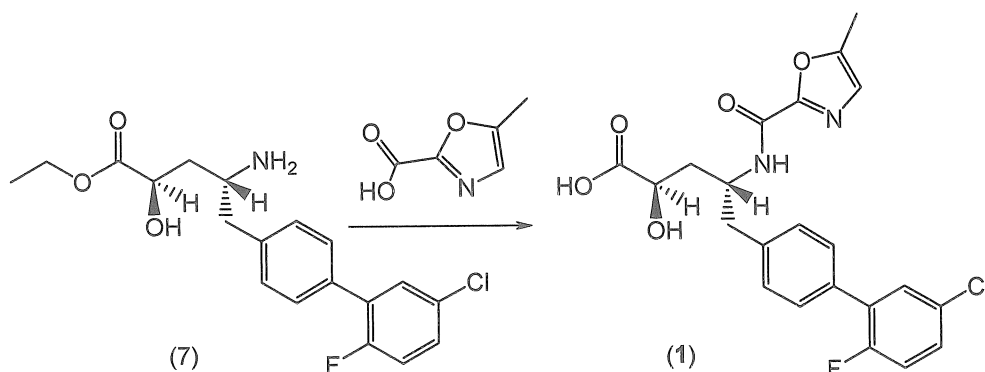


Dung dịch chứa hợp chất 5 (8,8 g, 21,8 mmol) trong EtOH (12 mL) được bổ sung vào HCl đậm đặc (200 mL) và được gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C và được khuấy qua đêm. Sau đó hỗn hợp này được cô để tạo ra cặn thô được tinh chế bằng cách rửa bằng Et₂O (100 mL) để tạo ra hợp chất 6 (7,5 g) ở dạng muối HCl rắn. LC-MS: 338 [M+ H⁺].



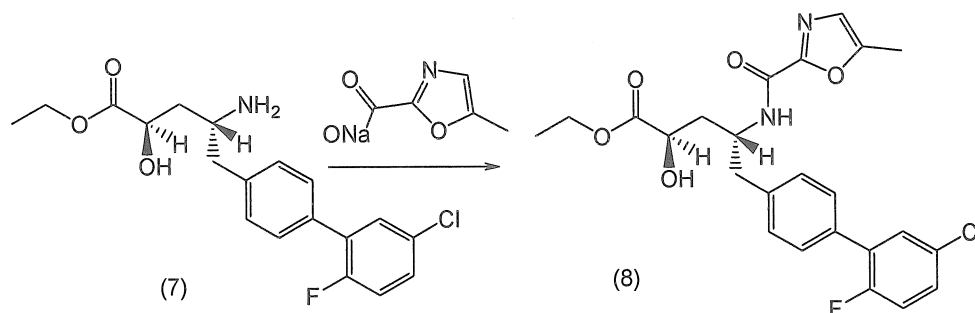
Dung dịch chứa hợp chất 6 (7,5 g, 20,1 mmol) trong EtOH/HCl 1:1 (100 mL) được gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hỗn hợp này được cô và cặn thô được tinh chế bằng cách rửa bằng Et₂O (200 mL) để tạo ra hợp chất 7 (6,5 g) ở dạng muối HCl rắn màu trắng. LC-MS: 366,1 [M+ H⁺].

Ví dụ 1: Axit (2*R*,4*R*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic (Hợp chất 1)



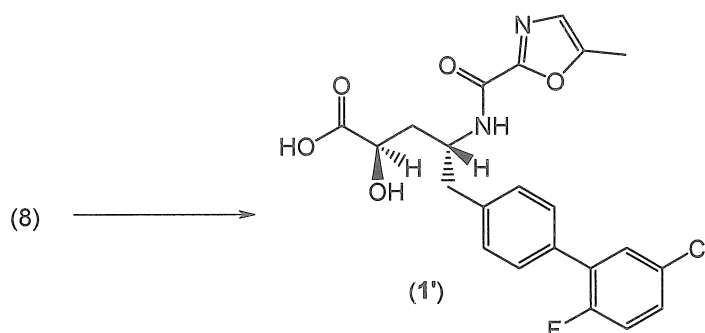
Axit 5-metyloxazol-2-carboxylic (182 mg, 1,4 mmol) và HATU (546 mg, 1,4 mmol) được kết hợp với DMF (3 mL) và được khuấy trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó hợp chất 7 (500 mg, 1,4 mmol) và DIPEA (716 μ L, 4,1 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp tạo thành được khuấy trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng, tại thời điểm đó LC/MS cho thấy sự hoàn thành phản ứng. Dung môi được loại bỏ trong môi trường chân không và cặn thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký nhanh thông thường (hexan:EtOAc 20-95%) để tạo ra chất rắn (590 mg, 1,2 mmol), mà được hòa tan trong EtOH khô (5 mL) và THF khô (5 mL). Sau đó dung dịch chứa LiOH 1N trong nước (9,9 mL, 9,9 mmol) được bổ sung vào. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, tại thời điểm đó LC/MS cho thấy sự hoàn thành phản ứng. Dung môi được loại bỏ trong môi trường chân không và cặn thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký pha đảo để tạo ra hợp chất 1 (490 mg) có dạng bột màu trắng. MS m/z $[M+H]^+$ theo tính toán đối với $C_{22}H_{20}ClFN_2O_5$, 447,10; trên thực tế 447,2.

Axit (2R,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic dạng tinh thể không được solvat hóa (Hợp chất 1')



Hợp chất 7 (HCl; 190,0 g, 472 mmol) được hòa tan trong DMF (2L) và hỗn hợp tạo thành được làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C. Natri 5-metyloxazol-2-carboxylat (73,9 g, 496 mmol) được bổ sung vào, sau đó DIPEA (124 mL, 708 mmol) được bổ sung vào với một phần. PyBOP (320 g, 614 mmol) được bổ sung vào với nhiều phần trong thời gian 20 phút, trong khi duy trì nhiệt độ bên trong dưới 10°C (tối đa 6,5°C), và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 1 giờ và sau đó ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 1 giờ, trong khi vẫn theo dõi phản ứng. Khi chuyển hóa >99%, thì sau đó hỗn hợp được khuấy trong thời gian 30 phút nữa ở

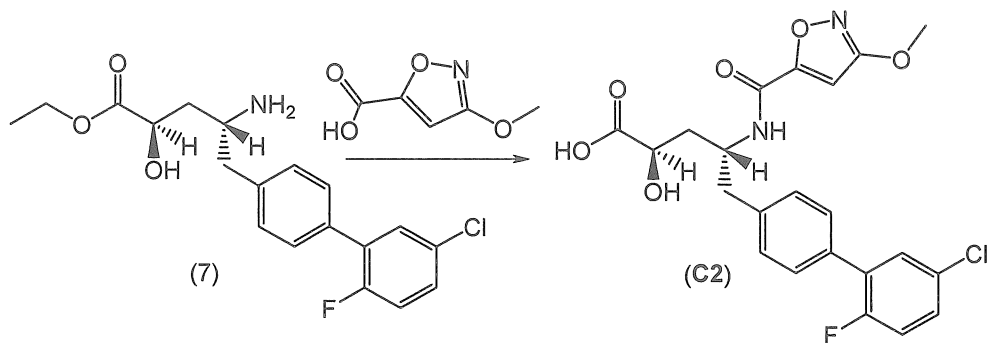
nhiệt độ trong phòng. EtOAc (6L) và nước (5L) được bổ sung vào và hỗn hợp tạo thành được khuấy trong thời gian 20 phút. Các pha được tách ra và lớp hữu cơ được rửa bằng HCl 0,5M (5L), dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa 5% (5L) và dung dịch NaCl chứa nước bão hòa 5% (5L). Lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄ trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được cô bằng thiết bị bay hơi kiểu quay. THF (500 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp tạo thành được cô để tạo ra hợp chất 8 dưới dạng dầu sền sệt.



Hợp chất thô 8 (224 g, 472 mmol) được hòa tan trong THF (2L). LiOH monohydrat (39,6 g, 944 mmol) đã được hòa tan trong nước (400 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ trong phòng, trong khi vẫn theo dõi phản ứng. Quan sát thấy sự chuyển hóa hoàn toàn sau thời gian 2 giờ. Sau đó hỗn hợp phản ứng được làm nguội bằng HCl chứa nước 1M (1180 mL, 1180 mmol). EtOAc (2L) và NaCl chứa nước bão hòa (2L) được bổ sung vào và hỗn hợp tạo thành được khuấy trong thời gian 15 phút. Các pha được tách ra và lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch HCl chứa nước 10% (3L) và được làm khô trên Na₂SO₄ (500 g) qua đêm, sau đó loại bỏ dung môi. Bổ sung EtOAc (2L) vào dầu tạo thành và thể tích được làm giảm xuống khoảng 500 mL. Huyền phù đặc tạo thành được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút, tạo ra độ đậm đặc để khuấy huyền phù đặc (tiếp tục trong thời gian 10 phút). Hexan (500 mL) được khuấy từ từ (trong thời gian 10 phút) và huyền phù đặc không chảy tạo thành được khuấy trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Lọc và làm khô để tạo ra hợp chất 1' (170 g; vật liệu tinh khiết 99,2%) ở dạng rắn. Sản phẩm này được phân tích bằng các phương pháp PXRD, DSC, và nhiệt trọng lượng, như được nêu trong bản mô tả này, và được xác định là vật liệu dạng tinh thể không được solvat hóa. Dữ liệu này

được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig. 1 đến Fig. 3.

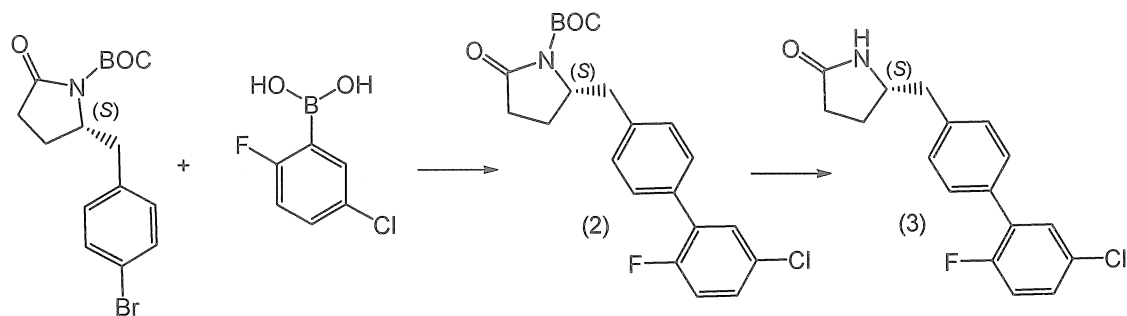
Ví dụ 2: Axit *(2R,4R)*-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(3-metoxisoxazol-5-cacbonyl)amino]pentanoic (Hợp chất so sánh C2)



DIPEA (227 μL , 1,3 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa axit 3-metoxisoxazol-5-carboxylic (74,7 mg, 522 μmol), hợp chất 7 (175 mg, 435 μmol) và HATU (248 mg, 653 μmol) trong DMF (2 mL). Hỗn hợp tạo thành được khuấy trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, tại thời điểm đó LC/MS cho thấy sự hoàn thành phản ứng. LiOH chứa nước 5,0 M (696 μL , 3,5 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. HCl đậm đặc (~0,4 mL) được bổ sung vào cho đến khi hỗn hợp phản ứng trở thành axit, và hỗn hợp thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký pha đảo (30-90% MeCN trong nước với 0,05% TFA) để tạo ra hợp chất so sánh C2 (132 mg) ở dạng chất rắn màu trắng. MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ theo tính toán đối với $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{ClFN}_2\text{O}_6$, 463,10; trên thực tế 463,2.

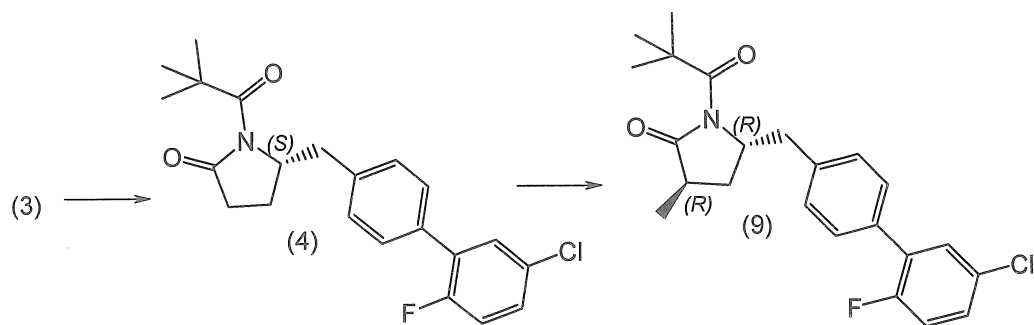
Hợp chất so sánh C2 is được mô tả trong ví dụ 19-9 trong Patent Mỹ số 8,586,536 của Gendron et al.

Quy trình điều chế 2: Ethyl este của axit *(2R,4S)*-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-methylpentanoic (Hợp chất 11)



t-butyl este của axit (*S*)-2-(4-bromobenzyl)-5-oxopyrrolidin-1-carboxylic (90 g, 254 mmol), 5-clo-2-flophenylboronic (48,7 g, 279,4 mmol), Pd(dppf)₂Cl₂ (5,6 g, 7,6 mmol), KF (29,5 g, 508 mmol) trong dioxan (900 mL) và nước (300 mL), được kết hợp ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường khí nitơ. Dung dịch tạo thành được gia nhiệt đến nhiệt độ 85°C và được khuấy trong thời gian 4 giờ. Nước (500 mL) được bổ sung vào, và hỗn hợp được chiết bằng EtOAc (500 mLx2). Các lớp hữu cơ đã kết hợp được rửa bằng dung dịch NaCl chứa nước bão hòa (500 mL), được làm khô, cô và tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký (PE/EtOAc=6:1 đến 3:1) để tạo ra hợp chất 2 (96 g) ở dạng chất rắn màu vàng. LC-MS: $m/z = 348[(M-56)^++1]$.

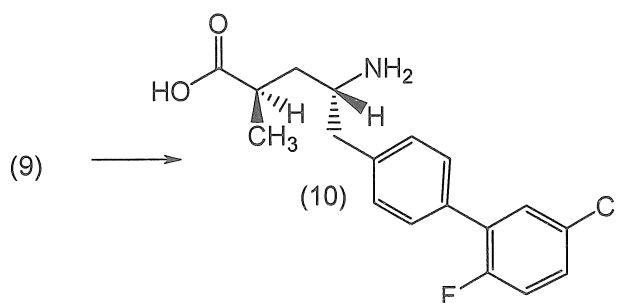
Bổ sung TFA (30 mL) vào dung dịch chứa hợp chất 2 (20 g, 49,5 mmol) trong DCM khan (200 mL) ở nhiệt độ 0°C trong môi trường khí nitơ. Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Sau khi làm bay hơi dung môi, cặn được pha loãng bằng EtOAc (200 mL), sau đó được rửa bằng dung dịch NaHCO₃ chứa nước bão hòa (200 mLx3) và dung dịch NaCl chứa nước bão hòa (200 mLx2). Lớp hữu cơ được làm khô và được cô để tạo ra hợp chất 3 (14 g, hợp chất thô) ở dạng dầu màu vàng. LC-MS: $m/z = 304[(M^++1)]$, $m/z = 607[(2M^++1)]$.



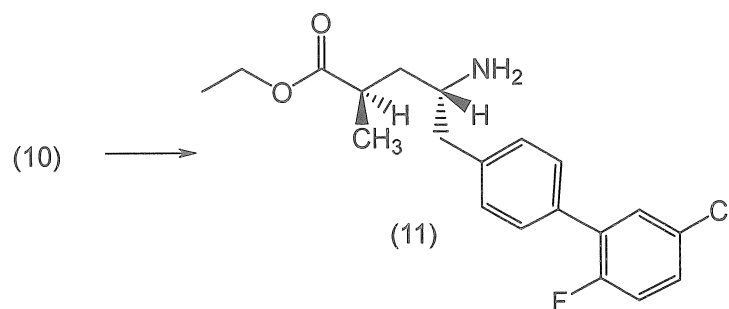
Dung dịch chứa *n*-butyllithi 2,5 M trong hexan (21 mL, 52,9 mmol) được bổ

sung từng giọt vào dung dịch chứa hợp chất 3 (14 g, 46 mmol) trong THF khan (150 mL) ở nhiệt độ -78°C trong môi trường khí nitơ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ -78°C trong thời gian 1 giờ. Sau đó pivaloyl clorua (7,2 g, 59,8 mmol) được bổ sung từng giọt vào ở nhiệt độ -78°C , và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ -78°C trong thời gian 2 giờ nữa. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội với nước (200 mL) và được chiết bằng EtOAc (200 mLx2). Các lớp hữu cơ đã kết hợp được rửa bằng dung dịch NaCl chứa nước bão hòa (200 mL), được làm khô trên Na_2SO_4 , được cô, và được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột (PE/EtOAc= 50:1) để tạo ra hợp chất 4 (14,6 g) ở dạng dầu màu vàng sáng. LC-MS: $m/z = 388[(\text{M}^++1)]$.

KHMDS (82 mL, 41,1 mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch chứa hợp chất 4 (14,6 g, 37,4 mmol) trong toluen (200 mL) ở nhiệt độ -78°C trong môi trường khí nitơ. Sau khi khuấy ở nhiệt độ -78°C trong thời gian 2 giờ, Me_2SO_4 (4,3 mL, 44,9 mmol) được bổ sung vào từng giọt. Sau khi khuấy ở nhiệt độ -78°C trong thời gian 2 giờ, hỗn hợp phản ứng được làm nguội bằng dung dịch NH_4Cl chứa nước bão hòa (100 mL) và được chiết bằng EtOAc (100 mLx2). Các lớp hữu cơ đã kết hợp được rửa bằng dung dịch NaCl chứa nước bão hòa (200 mL), được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc, và được cô để tạo ra sản phẩm thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký (PE/EtOAc=100:1) để tạo ra hợp chất 9 (3,4 g) ở dạng dầu không màu. LC-MS: $m/z = 402[(\text{M}^++1)]$.

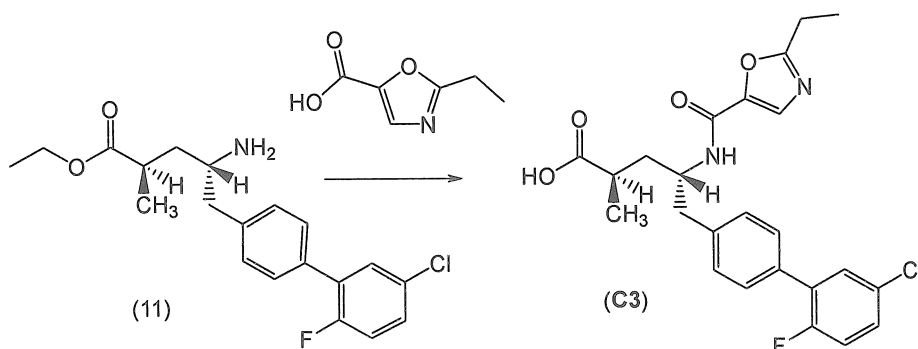


Dung dịch chứa hợp chất 9 (3,4 g, 8,5 mmol) trong HCl đặc (50 mL) được hồi lưu trong thời gian 2 ngày. Sau đó hỗn hợp này cô trong điều kiện áp suất giảm và cặn được tinh chế bằng cách rửa bằng EtOAc (20 mL) để tạo ra hợp chất 10 (2,2 g) ở dạng muối HCl rắn màu trắng đục. LC-MS: $m/z = 336[(\text{M}^++1)]$.



Dung dịch chứa hợp chất 10 (2,2 g, 5,9 mmol) trong HCl 4 M trong EtOH (15 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Sau đó hỗn hợp này cô trong điều kiện áp suất giảm và cặn được tinh chế bằng cách rửa bằng EtOAc (20 mL) để tạo ra hợp chất 11 (2,3 g) dưới dạng chất rắn màu trắng đục. LC-MS: $m/z = 364[(M^++1)]$ ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7,61-7,52 (m, 3H), 7,47 (ddd, $J = 8,7, 4,3, 2,7$ Hz, 1H), 7,38 (dd, $J = 13,5, 5,5$ Hz, 3H), 3,98 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,37 (d, $J = 11,1$ Hz, 1H), 3,11 (dd, $J = 13,7, 5,1$ Hz, 1H), 2,90-2,67 (m, 2H), 1,85 (ddd, $J = 14,0, 9,3, 4,8$ Hz, 1H), 1,68-1,54 (m, 1H), 1,13-0,99 (m, 6H).

Ví dụ 3: Axit (*2R,4S*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-[(2-etyloxazol-5-cacbonyl)amino]-2-metylpentanoic (Hợp chất so sánh C3)

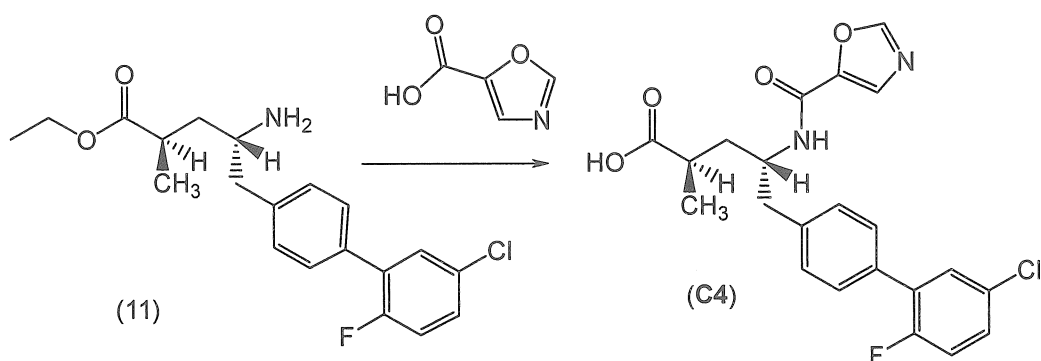


DIPEA (228 μL , 1,3 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa axit 2-etyloxazol-5-carboxylic (67,9 mg, 481 μmol), hợp chất 11 (175 mg, 437 μmol), và HATU (249 mg, 656 μmol) trong DMF (2,0 mL), và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút. LiOH chứa nước 5,0 M (699 μL , 3,5 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1,5 giờ. HCl đậm đặc ($\sim 0,5$ mL) được bổ sung vào cho đến khi hỗn hợp trở thành axit và hỗn hợp thô được tinh chế bằng HPLC điều chế (20-80% MeCN trong nước với TFA 0,05%) tạo ra hợp chất so sánh C3 (170 mg) ở dạng chất rắn màu trắng. MS

m/z $[M+H]^+$ theo tính toán đối với $C_{24}H_{24}ClFN_2O_4$, 459,14; trên thực tế 459,05.

Hợp chất so sánh **C3** được mô tả trong ví dụ 71-1 trong Patent Mỹ số 8,263,629 của Coppola et al.

Ví dụ 4: Axit (2*R*, 4*S*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-metyl-4-[(oxazol-5-cacbonyl)amino]pentanoic (Hợp chất so sánh **C4**)



DIPEA (228 μ L, 1,3 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa axit oxazol-5-carboxylic (49,4 mg, 437 μ mol), hợp chất 11 (HCl; 175 mg, 437 μ mol) và HATU (249 mg, 656 μ mol) trong DMF (2 mL). Hỗn hợp tạo thành được khuấy trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, tại thời điểm đó LC/MS cho thấy sự hoàn thành phản ứng. LiOH chứa nước 5,0 M (699 μ L, 3,5 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. HCl đậm đặc (~0,5 mL) được bổ sung vào cho đến khi hỗn hợp phản ứng trở thành axit và hỗn hợp thô được tinh chế bằng HPLC điều chế (20-80% MeCN trong nước với TFA 0,05%) để tạo ra hợp chất so sánh **C4** (103 mg) ở dạng chất rắn màu trắng. MS m/z $[M+H]^+$ theo tính toán đối với $C_{22}H_{20}ClFN_2O_4$, 431,11; trên thực tế 431,1.

Hợp chất so sánh **C4** được mô tả trong ví dụ 68-1 trong Patent Mỹ số 8,263,629 của Coppola et al.

Thử nghiệm

Hợp chất 1 và các hợp chất so sánh **C2**, **C3** và **C4** được đánh giá trong các thử nghiệm được mô tả dưới đây.

Thử nghiệm 1: Thử nghiệm *in vitro* để định lượng hoạt lực của chất ức chế tại NEP

ở người

Hoạt tính ức chế tại neprilysin ở người (EC 3.4.24.11; NEP) được xác định như sau.

NEP tái tổ hợp ở người mua được trên thị trường (R&D Systems, Minneapolis, MN, số danh mục 1182-ZN). Cơ chất peptit huỳnh quang Mca-D-Arg-Arg-Leu-Dap-(Dnp)-OH (Medeiros et al. (1997) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30:1157-62; Anaspec, San Jose, CA) được sử dụng.

Thử nghiệm được tiến hành trong đĩa màu trắng đục có 384 lỗ ở nhiệt độ 37°C sử dụng cơ chất peptit huỳnh quang ở nồng độ bằng 10 µM trong dung dịch đệm thử nghiệm (HEPES 50 mM, độ pH=7,5, NaCl 100 mM, polyetylen glycol sorbitan monolaurat 0,01% (Tween-20), ZnSO₄ 10 µM). Enzym được sử dụng ở nồng độ dẫn đến sự phân giải protein định lượng của 1 µM cơ chất sau thời gian 20 phút ở nhiệt độ 37°C.

Các hợp chất thử nghiệm được thử nghiệm trong khoảng nồng độ từ 10 µM đến 20 pM. Các hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào enzym và được ủ trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C trước khi bắt đầu phản ứng bằng cách bổ sung cơ chất. Phản ứng được kết thúc sau 20 phút ủ ở nhiệt độ 37°C bằng cách bổ sung axit axetic bằng vào nồng độ cuối cùng bằng 3,6% (thể tích/thể tích).

Các đĩa được đọc trên huỳnh quang kế với bước sóng kích thích và phát xạ được thiết lập ở 320 nm. Hằng số ức chế thu được bằng phương pháp hồi quy phi tuyến tính dữ liệu bằng cách sử dụng phương trình (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA):

$$v = v_0 / [1 + (I / K')]$$

trong đó v là tốc độ phản ứng, v_0 là tốc độ phản ứng không được ức chế, I là nồng độ chất ức chế và K' là hằng số ức chế biểu kiến.

Các hợp chất được thử nghiệm trong thử nghiệm này và phát hiện ra là có trị số pK_i ở NEP ở người như sau.

Hợp chất	pK _i
1	9,7
C2	9,9
C3	9,1
C4	9,3

Thử nghiệm 2: Nghiên cứu dược động học IV/PO ở chuột thường và chó

Mỗi nghiên cứu PK ở chuột thường và chó bắt đầu với chế phẩm chứa hợp chất thử nghiệm. Mỗi hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào thể tích chất dẫn thuốc (ví dụ, natri bicacbonat 5%, dextroza 5% trong H₂O) với các khối lượng thích hợp sao cho nồng độ cuối cùng của mỗi hợp chất là thích hợp được sử dụng theo liều lượng 2 mL/kg. Mặc dù hỗn dịch đồng nhất có thể được chấp nhận để sử dụng theo liều qua đường miệng, nhưng các dung dịch sử dụng theo liều trong tĩnh mạch được lọc vô trùng (0,2 µm) trước khi sử dụng theo liều để đảm bảo không còn dạng hạt lại được sử dụng.

Trong thử nghiệm ở chuột thường, chuột thường Sprague-Dawley đực được đặt trước ống thông (3 con đối với mỗi đường dùng) 8 đến 10 tuần tuổi có được từ thư viện Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Các chuột thường tiếp nhận một liều đưa bằng ống vào dạ dày qua miệng hoặc một liều trong tĩnh mạch (thông qua tĩnh mạch đuôi phía bên) của dung dịch sử dụng theo liều. Liều cuối cùng thường nằm trong khoảng từ 0,5 đến 3 mg/kg. Các mẫu máu theo thứ tự được thu gom qua ống thông cấy trong tĩnh mạch cảnh tại các thời điểm 3 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, và 24 giờ sau khi sử dụng theo liều. Việc lấy mẫu được tiến hành bằng tay hoặc bằng cách sử dụng thiết bị lấy mẫu tự động. Các mẫu được thu vào các ống Microtainer chứa EDTA làm chất chống đông và được xử lý để lấy huyết tương bằng cách ly tâm lạnh.

Trong nghiên cứu ở chó, chó săn thỏ đực (3 con đối với mỗi đường dùng) được nhốt trong phòng thí nghiệm Agilux Laboratories (Worcester, MA) và cân nặng nằm trong khoảng từ 7 đến 12 kg tiếp nhận một liều đưa bằng ống vào dạ dày qua đường miệng hoặc một liều trong tĩnh mạch (thông qua ống thông nằm trong) của dung dịch sử dụng theo liều. Liều cuối cùng thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2 mg/kg. Các mẫu máu theo thứ tự được thu gom thông qua phương pháp lấy

máu tĩnh mạch trực tiếp ở các thời điểm 3 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 12 giờ, và 24 giờ sau khi sử dụng theo liều. Tất cả các mẫu này được thu bằng tay vào ống Microtainer chứa EDTA làm chất chống đông và được xử lý để lấy huyết tương bằng cách ly tâm lạnh.

Các mẫu huyết tương được chiết bằng 3 thể tích của MeCN chứa chất nội chuẩn thích hợp. Dịch chiết được hoàn nguyên vào 3 thể tích nước chứa axit formic 1%, và được phân tích thông qua phương pháp MS/MS kết hợp HPLC. Dữ liệu về thời gian-nồng độ trong huyết tương được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Phoenix (Pharsight Corp., St. Louis, MO) để tính toán các thông số dược động học.

Độ thanh thải trong huyết tương được xác định từ nhánh tĩnh mạch của nghiên cứu, và thể hiện tốc độ tại đó huyết tương thanh thải hết thuốc. Lượng này bằng liều lượng chia cho diện tích dưới đường cong thời gian - nồng độ trong huyết tương. Ngoài độ thanh thải trong huyết tương, thuốc được dùng qua đường miệng cũng cần phải đạt được các mức hiệu nghiệm toàn thân sau khi phân phối qua đường miệng. Độ sinh khả dụng qua đường miệng là số đo của các lần tiếp xúc trong huyết tương sau khi sử dụng qua đường miệng so với các lần tiếp xúc sau khi sử dụng trong tĩnh mạch.

Dữ liệu dược động học ở chuột thường

Hợp chất được sử dụng theo liều	Đường dùng	AUC _{last} ^a ($\mu\text{g} \cdot \text{giờ}/\text{mL}$) Trung bình	CL _{last} ^b (L/giờ/kg) Trung bình	Độ sinh khả dụng qua đường miệng (%) ^c Trung bình
1	IV	0,61	0,83	-
	PO	0,40	-	67%
C2	IV	0,48	1,7	-
	PO	0,11	-	20%
C3	IV	1,5	0,60	-
	PO	0,88	-	60%
C4	IV	0,83	0,67	-
	PO	0,50	-	60%

^a AUC_{last} là diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết tương so với thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm sau khi sử dụng theo liều mà tại đó quan sát thấy nồng độ định lượng

được cuối cùng, ước tính bằng phương pháp hình thang tuyến tính

^b CL_{last} là liều lượng chia cho AUC_{last}

^c Độ sinh khả dụng qua đường miệng được tính là AUC_{last} sau khi dùng qua đường miệng, chia cho AUC_{last} sau khi dùng trong tĩnh mạch, được chuẩn hóa đối với các chênh lệch bất kỳ trong các liều được dùng, được thể hiện dưới dạng phần trăm

Dữ liệu ở chuột thường này cho thấy rằng hợp chất theo sáng chế (Hợp chất 1) có độ sinh khả dụng qua đường miệng cao (67%). Các hợp chất so sánh C3 và C4 thể hiện độ sinh khả dụng qua đường miệng tương tự nhau (60% và 60%, một cách tương ứng). Tuy nhiên, hợp chất so sánh C2 có độ sinh khả dụng qua đường miệng thấp hơn (20%). Dữ liệu ở chuột này cũng cho thấy rằng hợp chất 1 có tốc độ thanh thải thấp tương tự so với tốc độ thanh thải của các hợp chất so sánh C3 và C4 (0,83, 0,60, và 0,67, một cách tương ứng). Tuy nhiên, hợp chất so sánh C2 lại được thanh thải nhanh hơn nhiều (CL_{last} trung bình bằng 1,7).

Để có được sự xác định mang tính dự báo hơn về cách thức hợp chất này sẽ hoạt động ở người (ví dụ, độ an toàn và độ hiệu quả), thì bước đánh giá ở loài động vật thứ hai được tiến hành.

Dữ liệu dược động học ở chó

Hợp chất được sử dụng theo liều	Đường dùng	AUC_{last} ($\mu\text{g} \cdot \text{giờ}/\text{mL}$) Trung bình	CL_{last} ($\text{L}/\text{giờ}/\text{kg}$) Trung bình	Độ sinh khả dụng qua đường miệng (%) Trung bình
1	IV	0,51	0,29	-
	PO	0,53	-	>100%*
C2	IV	0,16	0,65	-
	PO	0,16	-	99%
C3	IV	0,17	0,59	-
	PO	0,13	-	64%
C4	IV	0,07	1,54	-
	PO	0,03	-	42%

*Độ sinh khả dụng trên 100% có thể liên quan đến các quy trình hấp thụ, phân phối và/hoặc bài tiết.

Dữ liệu ở chó này cho thấy rằng hợp chất theo sáng chế (Hợp chất 1) có độ sinh khả dụng qua đường miệng cao (>100%) và độ thanh thải trong huyết tương thấp. Trong khi hợp chất so sánh C2 thể hiện độ sinh khả dụng qua đường miệng tương tự (99%), các hợp chất so sánh C3 và C4 thể hiện độ sinh khả dụng qua đường miệng thấp hơn nhiều (64% và 42%, một cách tương ứng). Ngoài ra, dữ liệu ở chó này cho thấy rằng hợp chất 1 có tốc độ thanh thải thấp hơn (0,29) so với tốc độ thanh thải của tất cả ba hợp chất so sánh C2, C3, và C4 (0,65, 0,59, và 1,54, một cách tương ứng).

Cuối cùng, hợp chất 1 thể hiện một cách nhất quán cả độ sinh khả dụng qua đường miệng cao và độ thanh thải trong huyết tương thấp ở cả chuột thường và chó. Ngược lại, hợp chất so sánh C2 thể hiện độ sinh khả dụng ở chuột thấp hơn so với hợp chất 1 và độ thanh thải trong huyết tương ở cả chuột thường và chó cao hơn so với hợp chất 1. Các hợp chất so sánh C3 và C4, mặc dù tương đương ở cả độ sinh khả dụng qua đường miệng và độ thanh thải đối với hợp chất 1 ở chuột thường, thể hiện độ sinh khả dụng qua đường miệng thấp hơn và độ thanh thải cao so với hợp chất 1 ở chó.

Thử nghiệm 3: Thử nghiệm dược động học/dược lực học (PK-PD) về hoạt tính của NEP ở chuột Sprague-Dawley tỉnh táo có huyết áp bình thường

Từng hợp chất thử nghiệm với khối lượng thích hợp được bổ sung vào thể tích chất dẫn thuốc (ví dụ, natri bicarbonat 5%, dextroza 5% trong H₂O) sao cho nồng độ cuối cùng của mỗi hợp chất là thích hợp để sử dụng theo liều ở 2 mL/kg. Lưu ý rằng hỗn dịch đồng nhất được cho là chấp nhận được để sử dụng qua đường miệng.

Chuột Sprague-Dawley đực được đặt trước ống thông (3 con trên mỗi hợp chất được đánh giá) từ 8 đến 10 tuần tuổi có được từ phòng thí nghiệm Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Chuột thường được tiếp nhận một liều đưa bằng

ống vào dạ dày qua đường miệng chứa dung dịch dùng theo liều. Liều cuối cùng thường nằm trong khoảng từ 3 đến 30 mg/kg. Các mẫu máu theo thứ tự được thu gom thông qua ống thông cấy trong tĩnh mạch cảnh ở các thời điểm 3 phút, 15 phút, 35 phút, 45 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, và 24 giờ sau khi sử dụng theo liều. Các mẫu được thu vào các ống Microtainer chứa EDTA làm chất chống đông và được xử lý để lấy huyết tương bằng cách ly tâm lạnh. Mười lăm phút trước các mẫu ở thời điểm 45 phút, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, và 24 giờ, liều bolus IV (30 µg/kg) chứa peptit natri lợi niệu tâm nhĩ (atrial natriuretic peptide - ANP) được dùng. Nếu hợp chất thử nghiệm ức chế thành công neprilysin, một chất trung gian chính của độ thanh thải ANP, thì ANP được dùng sẽ làm gia tăng các mức cơ sở của ANP, nhờ đó tăng cường hiệu lực phát tín hiệu xuôi dòng. Nếu hợp chất thử nghiệm không ức chế thành công neprilysin, thì các mức ANP tuần hoàn và tăng tín hiệu xuôi dòng sẽ quay trở lại trạng thái cơ sở trong vòng 15 phút giữa thời điểm dùng bolus ANP và thời điểm mà tại đó mẫu huyết tương được lấy. Do liên kết của ANP với thụ thể của nó dẫn đến sự hoạt hóa guanylyl cyclase và sau đó sản sinh guanosin monophosphat vòng (cyclic guanosine monophosphate - cGMP), nên việc quan sát các mức tăng cao của cGMP (> 20 nM) trong huyết tương 15 phút sau khi dùng IV một liều bolus ANP được giải thích là bằng chứng của sự ức chế neprilysin đang tăng lên. Các mức cGMP trong huyết tương tăng cao 24 giờ sau khi sử dụng theo liều là chỉ thị cho tác dụng dược lý trong một khoảng thời gian, tương tự với trị số thanh thải trong huyết tương là chỉ thị cho độ bền được động học.

Các mẫu huyết tương được chiết bằng 3 thể tích MeCN chứa chất nội chuẩn thích hợp. Dịch chiết được hoàn nguyên vào 3 thể tích nước chứa axit formic 1%. cGMP trong huyết tương và nồng độ của hợp chất thử nghiệm được định lượng trong các mẫu huyết tương bằng phương pháp phát hiện khối phổ kết hợp HPLC.

Hợp chất được dùng theo liều	Liều lượng (mg/kg)	Nồng độ cGMP 24 giờ sau khi sử dụng theo liều (nM) Trung bình ^a
1	3	112
C2	3	45
C3	3	47
C4	3	53

^a Trị số trung bình của ba lần xác định

Do đó, hợp chất theo sáng chế (Hợp chất 1) thể hiện hoạt lực của cGMP 24 giờ lớn hơn trên 2 lần sau khi dùng theo liều khi so với hoạt lực đối với các hợp chất trong tình trạng kỹ thuật C2, C3, và C4.

Thử nghiệm 4: Nghiên cứu dược động học IV/PO của hợp chất 1 ở khỉ

Nghiên cứu PK ở khỉ được tiến hành với khối lượng thích hợp của hợp chất 1 trong thể tích chất dẫn thuốc (ví dụ, natri bicarbonat 5%, dextroza 5% trong H₂O, độ pH=7,4, đối với đường miệng và PEG200:EtOH:Nước (40:10:50), độ pH=7,0, lọc qua xi lanh PDVF 0,22 µM đối với IV) sao cho nồng độ cuối cùng được dùng theo liều ở 0,5 mL/kg (IV) hoặc 2,0 mL/kg (PO).

Khỉ đầu chó (cynomologus) được (3 con đối với mỗi đường dùng) được nhốt tại Xenometrics (Stilwell, KS) tiếp nhận liều IV hoặc PO của hợp chất 1 ở nồng độ 1 mg/kg. Các con khỉ dùng các liều IV tiếp cận thức ăn tùy ý và các con khỉ dùng các liều PO được cho nhịn đói qua đêm và tiếp nhận thức ăn khoảng 4 giờ sau khi sử dụng theo liều. Các mẫu máu được lấy từ mỗi con ở từng thời điểm (trước khi sử dụng theo liều, 0,083 giờ, 0,25 giờ, 0,5 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 12 giờ, và 24 giờ) thông qua tĩnh mạch đầu, đuôi, hoặc tĩnh mạch hiển trong thời gian 48 giờ. Tất cả các mẫu được thu vào các ống K₂EDTA và được đặt trên đá. Các mẫu được xử lý để lấy huyết tương bằng cách ly tâm (3200 vòng/phút, 10 phút, 5°C), và được axit hóa với nồng độ cuối cùng là axit axetic 2%. Phần phân ước của huyết tương được chuyển vào các ống của đĩa 96 lỗ và được bảo quản đông lạnh (-70°C) trước khi phân tích sinh học.

Nồng độ trong huyết tương của hợp chất 1 được xác định bằng LC/MS/MS. Các mẫu huyết tương nghiên cứu được lắc mạnh và được đưa vào đĩa 96 lỗ. Các mẫu được chiết bằng 200 µL axit formic 0,2% trong axetonitril bằng chất nội chuẩn. Dịch chiết được ly tâm trong thời gian 10 phút ở tốc độ 3700 vòng/phút và dịch nuôi cấy nổi bề mặt được trộn với axit formic 0,2% trong nước. Các mẫu (15 µL) được phun lên cột Thermo (C18 50x2,1mm) với tốc độ dòng bằng 0,3 mL/phút. Pha động A bao gồm axit formic 0,2% trong nước và pha động B bao gồm axit

formic 0,2% trong axetonitril. Việc rửa giải gradien bắt đầu bằng B từ 0% đến 95% trong thời gian từ 0,5 đến 1,5 phút, giữ ở 95% trong thời gian từ 1,5 đến 1,85 phút, sau đó là gradien từ 95% đến 0% của B trong thời gian từ 1,85 đến 1,86 phút và dừng lại ở 2,6 phút. Khoảng thử nghiệm của hợp chất 1 nằm trong khoảng từ 0,0005 đến 5 µg/mL. Các thông số dược động học của hợp chất 1 được xác định bằng phân tích không khoan vùng (Mô hình 201 và Mô hình 200 để dùng IV và PO, một cách tương ứng) bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin phiên bản 6.3 (Certara, Sunnyvale, CA) và sử dụng profin thời gian nồng độ trong huyết tương riêng lẻ từ 3 con khỉ.

Độ thanh thải trong huyết tương được xác định từ nhánh trong tĩnh mạch của nghiên cứu, và thể hiện tốc độ mà tại đó huyết tương được thanh thải sạch thuốc. Lượng này bằng liều lượng chia cho diện tích dưới đường cong thời gian - nồng độ trong huyết tương. Ngoài độ thanh thải trong huyết tương, thuốc được dùng qua đường miệng cũng cần phải đạt đến các mức hiệu nghiệm toàn thân sau khi phân phối qua đường miệng. Độ sinh khả dụng qua đường miệng là số đo của các lần tiếp xúc trong huyết tương sau khi dùng qua đường miệng so với các lần tiếp xúc sau khi dùng trong tĩnh mạch.

Dữ liệu dược động học ở khỉ

Hợp chất được sử dụng theo liều	Đường dùng	AUC _{last} (µg*giờ/mL) Trung bình	CL _{last} (L/giờ/kg) Trung bình	Độ sinh khả dụng qua đường miệng (%) Trung bình
1	IV	2,78	0,36	-
	PO	1,66	-	60 %

Dữ liệu này cho thấy rằng hợp chất theo sáng chế (Hợp chất 1) có độ sinh khả dụng qua đường miệng cao (xấp xỉ 60%) và độ thanh thải trong huyết tương thấp (xấp xỉ 0,36) ở khỉ đầu chó (cynomolgus) đực. Điều này nhất quán và tương tự với dữ liệu về độ sinh khả dụng và độ thanh thải được tạo ra từ các loài chuột thường và chó.

Thử nghiệm 5: Sự bài tiết qua thận của hợp chất 1 ở các loài chuột thường, chó và

khí

Một yếu tố quan trọng để bảo đảm cho việc sử dụng thuốc theo liều trong thời gian dài thích hợp và nồng độ thuốc ở trạng thái ổn định chính xác ở bệnh nhân là độ thanh thải của thuốc. Nhìn chung, độ thanh thải của thuốc giảm dẫn đến các nồng độ thuốc cao hơn và tác dụng của thuốc lớn hơn. Để hiểu về độ thanh thải trong thận của hợp chất 1, thì % liều dùng được thu hồi trong nước tiểu sau một liều IV được đánh giá ở ba loài động vật. Ba nghiên cứu riêng rẽ ở chuột thường Sprague Dawley đực, chó săn thỏ đực và khỉ đầu chó (*cynomolgus*) đực, một cách tương ứng, được tiến hành và quy trình và các kết quả thử nghiệm được mô tả dưới đây.

Chuột Sprague Dawley đực (N=3), có cân nặng từ 0,348 đến 0,362 kg, tiếp nhận liều IV của hợp chất 1 ở nồng độ 0,5 mg/kg dưới dạng một phần của casset sử dụng theo liều. Hợp chất 1 được hòa tan trong NaHCO₃ 5% trong D5W (dextroza 5% trong nước, độ pH=7,4) và được lọc qua đầu lọc mẫu polyvinyl diflorua (PVDF) 0,22 µM trước khi sử dụng. Chuột thường đã tiếp cận thức ăn tùy ý trước và sau khi sử dụng hợp chất 1. Các mẫu nước tiểu được thu trong các buồng chuyển hóa và được giữ trên đá khô đông lạnh trong khi thu. Các mẫu được rã đông và thể tích nước tiểu được ghi lại. Phần phân ước của mẫu nước tiểu được chuyển vào ống lưu trữ polypropylen, được làm đông lạnh và được bảo quản (-80°C) trước khi phân tích sinh học.

Nồng độ của hợp chất 1 trong nước tiểu của chuột thường được xác định bằng LC/MS/MS. Các mẫu nước tiểu được rã đông và được pha loãng 5 lần trong huyết tương K₂EDTA ở chuột thường. Phần phân ước 50 µL của nước tiểu đã pha loãng được chuyển vào đĩa 96 lỗ và được chiết với thể tích 200 µL của axit formic 2% trong axetonitril chứa chất nội chuẩn. Đĩa 96 lỗ được ly tâm trong thời gian 10 phút ở tốc độ 3700 vòng/phút và dịch nuôi cấy nổi bề mặt được chuyển vào đĩa 96 lỗ mới. Dịch nuôi cấy nổi bề mặt này được pha loãng trong axit formic 0,2% trong nước (pha loãng 4 lần). Thể tích 10 hoặc 20 µL được phun lên trên cột Xbridge phenyl (21x50mm; 5 µ). Pha động A bao gồm axit formic 0,2% trong nước và pha động B bao gồm axit formic 0,2% trong axetonitril. Việc rửa giải gradien bắt đầu

bằng B từ 20% đến 95% trong thời gian từ 0,5 đến 2,0 phút, giữ ở 95% trong thời gian từ 2,0 đến 2,2 phút, sau đó bằng gradien từ 95% đến 20% của B trong thời gian từ 2,2 đến 2,3 phút và được dừng lại ở 3,3 phút. Khoảng thử nghiệm của hợp chất 1 nằm trong khoảng từ 0,00125 đến 25 µg/mL.

Chó săn thỏ đực (N=6, hai nhóm mỗi nhóm có 3 con), có cân nặng từ 9,04 đến 10,2 kg và từ 10,8 đến 11,5 kg, tiếp nhận liều IV của hợp chất 1 ở nồng độ 0,1 mg/kg (nhóm I) và 1,255 mg/kg (nhóm II) dưới dạng một phần của caset sử dụng theo liều. Hợp chất 1 được hòa tan trong PEG-200:etanol:nước (40:10:50) và được lọc qua đầu lọc mẫu polyvinyl diflorua (PVDF) 0,22 mM trước khi sử dụng. Các con chó tiếp cận thức ăn tùy ý trước khi và sau khi sử dụng hợp chất 1. Các mẫu nước tiểu được thu trên các gói lạnh vào vật chứa đã cân trước mà đã được đổ 0,5 mL axit axetic băng từ trước. Các mẫu được cân lại và axit axetic băng bổ sung được bổ sung vào nếu cần đến nồng độ cuối cùng bằng 2%. Các mẫu được làm đông lạnh và được bảo quản (-80°C) trước khi phân tích sinh học.

Nồng độ của hợp chất 1 trong nước tiểu của chó được xác định bằng LC/MS/MS. Các mẫu nghiên cứu nước tiểu (được pha loãng trong huyết tương K₂EDTA(1:9)) được lắc mạnh và 25 µL được đưa vào đĩa 96 lỗ. Các mẫu được chiết bằng 100 µL trong axetonitril với chất nội chuẩn Glyburit. Dịch chiết được ly tâm trong thời gian 5 phút ở tốc độ 3100 vòng/phút và 75 µL dịch nuôi cấy nổi bề mặt được chuyển và được trộn với 150 µL nước. Các mẫu (12 µL) được phun lên trên cột Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1mm, 1,7µm) với tốc độ dòng bằng 0,9 mL/phút. Pha động A bao gồm 95:5:0.1 (thể tích:thể tích:thể tích) nước:axetonitril:axit formic và pha động B bao gồm 50:50:0.1 (thể tích:thể tích:thể tích) metanol:axetonitril:axit formic. Việc rửa giải gradien bắt đầu bằng B từ 35% đến 90% trong thời gian từ 0,2 đến 1,6 phút, giữ ở 95% trong thời gian từ 1,7 đến 2,2 phút, sau đó đến B từ 95% đến 35% trong thời gian từ 2,20 đến 2,30 phút. Khoảng thử nghiệm hợp chất 1 nằm trong khoảng từ 0,000100 đến 1,00 µg/mL.

Khỉ đầu chó (cynomolgus) đực (N=3), có cân nặng từ 4,42 đến 5,81 kg, tiếp nhận liều IV của hợp chất 1 ở nồng độ 1 mg/kg. Hợp chất 1 được hòa tan trong PEG-200:etanol:nước (40:10:50) và được lọc qua đầu lọc mẫu polyvinyl diflorua

(PVDF) 0,22 mM trước khi sử dụng. Các con thí nghiệm được tiếp cận với thức ăn tùy ý trước và sau khi sử dụng hợp chất 1. Các mẫu nước tiểu được thu trên đá khô trong khoảng thời gian thu gom, thể tích mẫu được ghi lại, và nước tiểu được axit hóa bằng axit axetic đến nồng độ cuối cùng của axit axetic xấp xỉ 2%. Các phần phân uốc được thu và được làm đông lạnh (-70°C) trước khi phân tích sinh học.

Nồng độ trong nước tiểu khí của hợp chất 1 được xác định bằng LC/MS/MS. Các mẫu nước tiểu được rã đông và được pha loãng trong huyết thanh K₂EDTA (1:4). Các mẫu được chiết bằng 200 µL axit formic 0,2% trong axetonitril với chất nội chuẩn. Dịch chiết được ly tâm trong thời gian 10 phút ở tốc độ 3700 vòng/phút và dịch nuôi cấy nổi bề mặt được trộn với axit formic 0,2% trong nước. Các mẫu (15 µL) được phun lên trên cột Thermo (C18 50x2,1mm) với tốc độ dòng bằng 0,3 mL/phút. Pha động A bao gồm axit formic 0,2% trong nước và pha động B bao gồm axit formic 0,2% trong axetonitril. Việc rửa giải gradien được bắt đầu với B từ 0% đến 95% B trong thời gian từ 0,5 đến 1,5 phút, giữ ở 95% trong thời gian từ 1,5 đến 1,85 phút, tiếp theo là gradien của B từ 95% đến 0% trong thời gian từ 1,85 đến 1,86 phút và được dừng lại ở 2,6 phút. Khoảng thử nghiệm hợp chất 1 nằm trong khoảng từ 0,0025 đến 25 µg/mL.

Lượng nước tiểu trung bình được bài tiết trong khoảng thời gian thu gom 24 giờ và % xấp xỉ của liều dùng được bài tiết trong nước tiểu được báo cáo trong bảng dưới đây.

Loài	Lượng dùng IV (mg/kg)	Lượng hợp chất 1 được bài tiết trong nước tiểu trong khoảng thời gian thu (từ 0 đến 24 giờ) (µg) Trung bình ^a	Sự bài tiết qua đường tiết niệu (% xấp xỉ của liều dùng được bài tiết trong nước tiểu) Trung bình ^a
Chuột thường	0,5	0,0462	0,03%
Chó	0,1 và 1,26	15,8 và 103	0,92 và 1,67%
Khỉ	1	157	3,14%

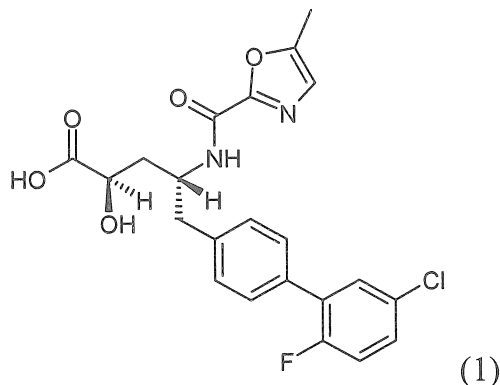
^a trị số trung bình của ba lần xác định

Mức bài tiết qua thận của hợp chất 1 ở chuột thường là xấp xỉ 0,03% liều

được dùng, ở chó là xấp xỉ từ 1 đến 1,5% liều được dùng và ở khỉ là xấp xỉ 3% liều được dùng. Dữ liệu này cho thấy rằng hợp chất 1 có sự bài tiết qua thận thấp ở ba loài được thử nghiệm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức cấu tạo:



hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là axit (2R,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyl-oxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là axit (2R,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyl-oxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic ở dạng tinh thể.

4. Hợp chất theo điểm 3, trong đó dạng tinh thể này được đặc trưng bởi mẫu nhiễu xạ bột tia X bao gồm các đỉnh nhiễu xạ tại trị số 2θ bằng $8,48 \pm 0,20$, $14,19 \pm 0,20$, $17,03 \pm 0,20$, $21,15 \pm 0,20$ và $25,41 \pm 0,20$.

5. Hợp chất theo điểm 3, trong đó dạng tinh thể này được đặc trưng bởi mẫu nhiễu xạ bột tia X bao gồm các đỉnh nhiễu xạ tại trị số 2θ bằng $7,51 \pm 0,20$, $8,48 \pm 0,20$, $14,19 \pm 0,20$, $17,03 \pm 0,20$, $17,62 \pm 0,20$, $17,87 \pm 0,20$, $20,59 \pm 0,20$, $21,15 \pm 0,20$, $21,88 \pm 0,20$, $24,45 \pm 0,20$, $24,78 \pm 0,20$, $25,41 \pm 0,20$, $25,67 \pm 0,20$, $27,67 \pm 0,20$ và $28,22 \pm 0,20$.

6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó dạng tinh thể này còn được đặc trưng bởi việc có một hoặc nhiều đỉnh nhiễu xạ bổ sung tại trị số 2θ được chọn từ $16,09 \pm 0,20$, $18,70 \pm 0,20$, $19,21 \pm 0,20$, $19,40 \pm 0,20$, $21,64 \pm 0,20$, $22,25 \pm 0,20$, $26,43 \pm 0,20$, $28,55 \pm 0,20$, $30,73 \pm 0,20$, $31,10 \pm 0,20$, $32,64 \pm 0,20$, $33,14 \pm 0,20$ và $34,46 \pm 0,20$.

7. Hợp chất theo điểm 3, trong đó dạng tinh thể này được đặc trưng bởi mẫu nhiễu

xạ bột tia X, trong đó các vị trí đỉnh về cơ bản phù hợp với các vị trí đỉnh của mẫu được thể hiện trên Fig. 1.

8. Hợp chất theo điểm 3, trong đó dạng tinh thể này được đặc trưng bởi vết phân tích nhiệt lượng quét vi sai được ghi lại ở tốc độ gia nhiệt là 10°C mỗi phút mà thể hiện trị số cực đại trong dòng nhiệt thu nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 165°C đến 169°C .

9. Hợp chất theo điểm 3, trong đó dạng tinh thể này được đặc trưng bởi vết phân tích nhiệt lượng quét vi sai về cơ bản phù hợp với dạng tinh thể được thể hiện trên Fig. 2.

10. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 và một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó chất mang dược dụng nêu trên là magie stearat.

12. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 và chất đối kháng thụ thể AT_1 , chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin, chất ức chế phosphodiesteraza (PDE), chất ức chế renin, thuốc lợi tiểu, hoặc hỗn hợp của chúng, và tùy ý một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

13. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 ở dạng liều dùng qua đường miệng, trong đó dược phẩm dạng liều này là dạng viên nang, viên nén, dạng lỏng hoặc hỗn dịch.

14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó sự giải phóng hợp chất ở đối tượng là sự giải phóng tức thì, giải phóng được kiểm soát hoặc giải phóng trì hoãn.

15. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó vật liệu nang là gelatin, polysacarit, chitosan hoặc polyme tổng hợp.

16. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó viên nang cứng bao gồm gelatin, polysacarit, hoặc polyme tổng hợp.

17. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó viên nang bao gồm hydroxypropyl methylxenluloza.

18. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 ở dạng liều dùng trong tĩnh mạch, trong đó dược phẩm dạng liều lượng này là dạng dung dịch đậm.

19. Quy trình điều chế hợp chất theo điểm 1, trong đó quy trình này bao gồm bước kết hợp ethyl este của axit (2*R*,4*R*)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxypentanoic với axit 5-metyloxazol-2-carboxylic để tạo ra hợp chất theo điểm 1.

20. Quy trình điều chế hợp chất theo điểm 1, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(a) kết hợp axit 5-metyloxazol-2-carboxylic và *N,N,N',N'*-tetrametyl-O-(7-azabenzotriazol-1-yl)uroni hexaflophosphat (HATU) trong *N,N*-dimetylformamit (DMF) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng;

(b) bổ sung ethyl este của axit (2*R*,4*R*)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxypentanoic và *N,N*-diisopropyletylamin và khuấy ở nhiệt độ trong phòng;

(c) tách và sau đó hòa tan chất rắn tạo thành trong etanol khô và tetrahydrofuran khô;

(d) bổ sung dung dịch chứa lithi hydroxit trong nước; và

(e) tách chất rắn tạo thành để tạo ra hợp chất theo điểm 1.

21. Quy trình theo điểm 20, trong đó chất rắn tạo thành trong các bước (c) và (e) được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký.

22. Quy trình điều chế hợp chất theo điểm 3, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(a) hòa tan axit (2*R*,4*R*)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic trong ethyl axetat và hexan để hòa tan hoàn toàn; và

(b) tách chất rắn tạo thành để tạo ra dạng tinh thể.

23. Quy trình điều chế hợp chất theo điểm 3, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- (a) kết hợp etyl este của axit $(2R,4R)$ -4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxypentanoic với natri 5-metyloxazol-2-carboxylat để tạo ra axit $(2R,4R)$ -5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic;
- (b) xử lý axit $(2R,4R)$ -5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-[(5-metyloxazol-2-cacbonyl)amino]pentanoic bằng etyl axetat và hexan để hòa tan hoàn toàn; và
- (c) tách chất rắn tạo thành để tạo ra dạng tinh thể.

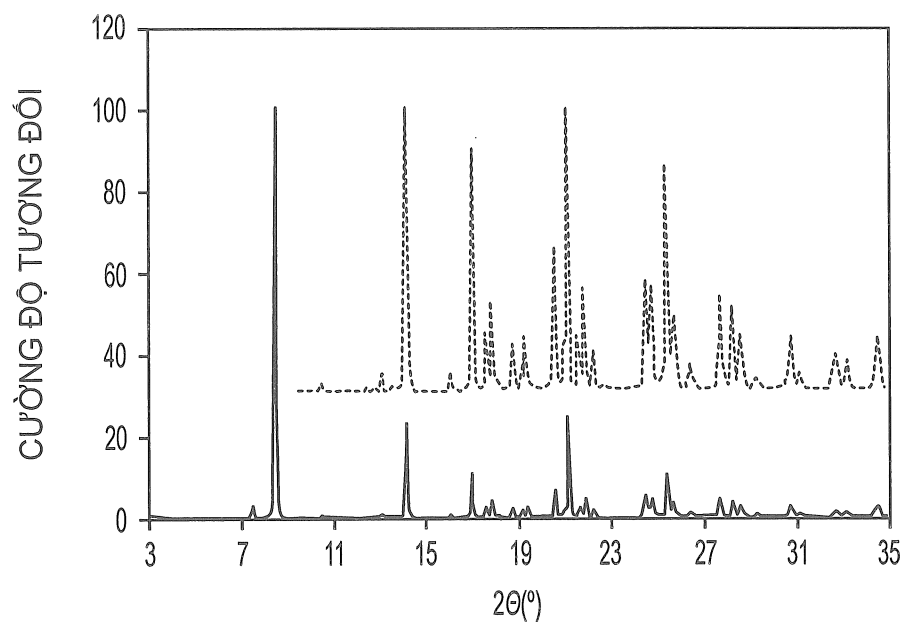


FIG. 1

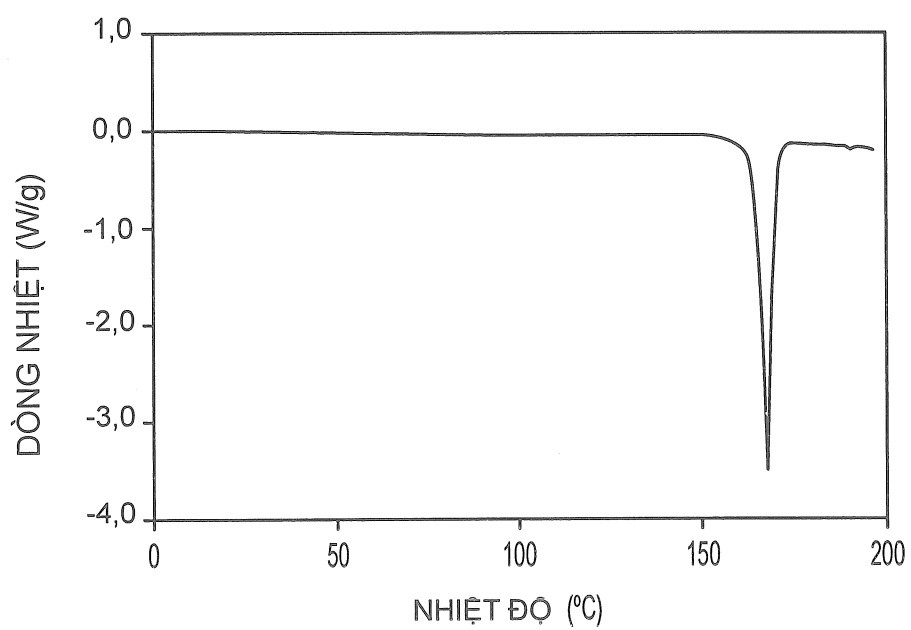


FIG. 2

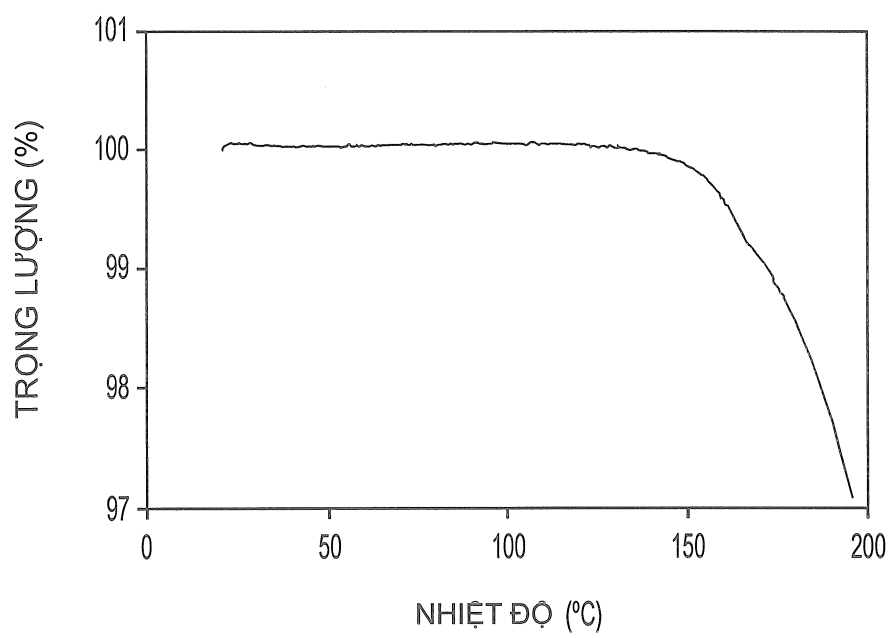


FIG. 3

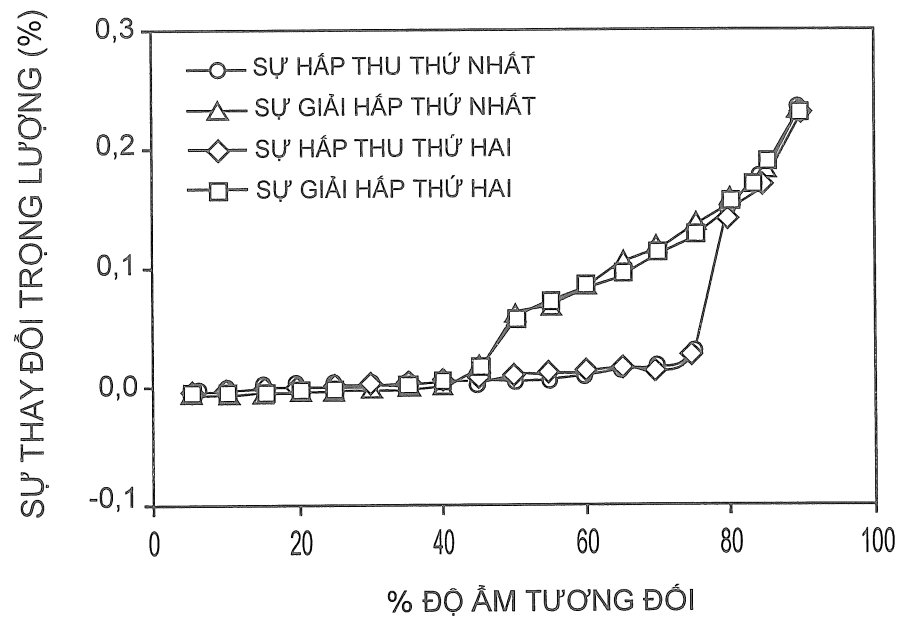


FIG. 4

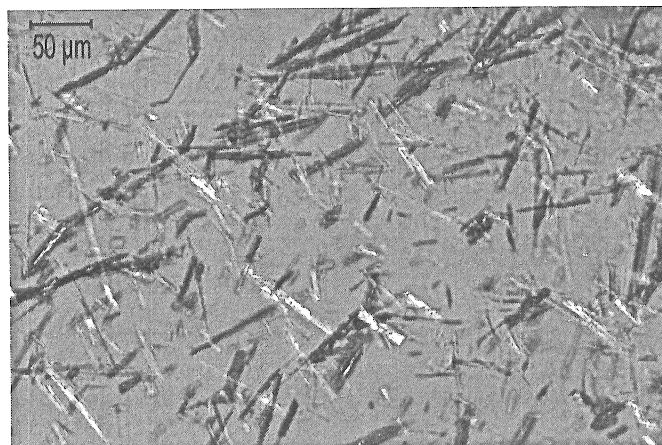


FIG. 5