



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

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

(11)



1-0030247

(51)⁷ C07C 233/56; A61K 45/06; A61P 9/00; (13) B
A61P 9/12; A61K 31/192; A61P 13/12

(21) 1-2017-03379

(22) 10/02/2016

(86) PCT/US2016/017315 10/02/2016

(87) WO 2016/130650 18/08/2016

(30) 62/114,705 11/02/2015 US

(45) 25/12/2021 405

(43) 26/02/2018 359A

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

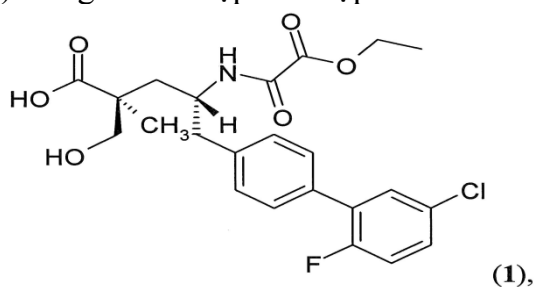
901 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, United States of America

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

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

(54) AXIT (2S, 4R)-5-(5'-CLO-2'-FLOBIPHENYL-4-YL)-4-ETOXYOXALYLAMINO)-
2-HYDROXYMETYL-2-METYL PENTANOIC LÀM CHẤT ỨC CHẾ
NEPRILYSIN, 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 (1) sau đây:



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

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

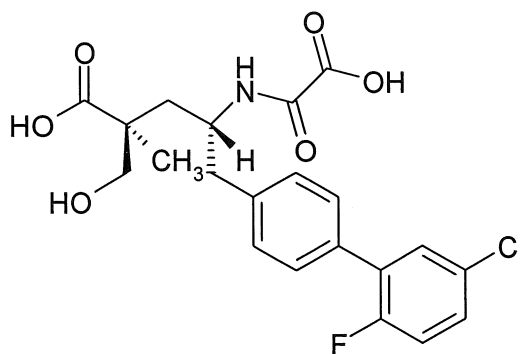
Sáng chế đề cập đến hợp chất và dạng tinh thể của nó được chuyển hóa in vivo để tạo ra hợp chất có thể sử dụng làm chất ức chế neprilysin. Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa hợp chất này và quy trình điều chế hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Neprilysin (endopeptidaza trung tính, EC 3.4.24.11) (NEP), là metallopeptidaza Zn^{2+} liên kết màng nội mô được tìm thấy trong nhiều cơ quan và mô, bao gồm não, thận, phổi, đường tiêu hóa, tim, và mạch máu ngoại biên. NEP phân hủy và bất hoạt nhiều peptit nội sinh, như enkephalin, bradykinin tuần hoàn, peptit angiotensin, và peptit natri lợi niệu, trong đó peptit natri lợi niệu có một vài tác dụng bao gồm, ví dụ, làm giãn mạch máu và tăng bài tiết natri trong nước tiểu/tăng bài niệu, cũng như ức chế sự phì đại tim và xơ hóa tâm thất. Vì thế, NEP đóng vai trò quan trọng trong cân bằng nội môi huyết áp và sức khỏe tim mạch.

Chất ức chế NEP, như thiorphan, candoxatril, và candoxatrilat, được nghiên cứu làm được chất tiềm năng. Các hợp chất ức chế cả NEP và enzym chuyển dạng angiotensin-I (ACE) cũng đã biết, và bao gồm omapatrilat, gempatrilat, và sampatrilat. Nhóm hợp chất nêu sau cùng được gọi là các chất ức chế vasopeptidaza được mô tả trong Robl et al. (1999) Exp. Opin. Ther. Patents 9(12): 1665-1677.

Nhiều chất ức chế NEP được mô tả trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 2013/0109639 của Hughes, et al. Một hợp chất như vậy là axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metyl-4-(oxalylamino)pentanoic, có cấu trúc:



Hợp chất này có hoạt tính ức chế NEP tiềm năng ($pK_i \geq 9$). Tuy nhiên, hợp chất này cũng được phát hiện là có sinh khả dụng qua đường miệng rất thấp ở các dạng tiền lâm sàng, làm cho nó không thích hợp hoặc không mong muốn để dùng qua đường miệng.

Một phương pháp làm tăng sinh khả dụng qua đường miệng của hợp chất là tạo ra tiền dược chất của hợp chất. Khi được dùng qua đường miệng, tiền dược chất nên có khả năng hấp thụ qua đường miệng chấp nhận được và được phân cắt *in vivo* để tạo ra hoạt chất. Đối với chất ức chế NEP, ưu tiên là tiền dược chất này được phân cắt nhanh (ví dụ, trong giờ đầu tiên sau khi dùng qua đường miệng) và hoàn toàn sao cho liều tiềm tĩnh mạch nhanh ban đầu của hoạt chất là khả dụng để khởi động đáp ứng guanosin monophosphat vòng (cGMP). Cũng mong muốn là chính tiền dược chất có hoạt tính ức chế NEP nhờ đó tiền dược chất này có thể đóng góp hoạt tính dược lý trước khi nó bị phân cắt. Ngoài ra, tiền dược chất bất kỳ như vậy nên có độ ổn định hóa học khi được bảo quản trong khoảng thời gian dài.

Vì thế, vẫn có nhu cầu về tiền dược chất của axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metyl-4-(oxalylamino)pentanoic có khả năng hấp thụ qua đường miệng chấp nhận được mà được phân cắt nhanh *in vivo* để tạo ra hoạt chất. Tiền dược chất này cũng có thể có tác dụng ức chế NEP ở mức độ nhất định. Sáng chế hướng tới nhu cầu này.

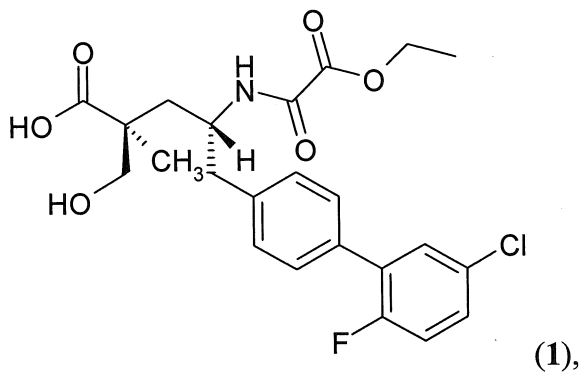
Ngoài ra, để sử dụng hiệu quả hợp chất ức chế NEP làm dược chất, mong muốn có dạng ở trạng thái rắn mà có thể được sản xuất dễ dàng và có độ ổn định hóa học và vật lý chấp nhận được. Ví dụ, mong muốn hợp có dạng vật lý bền nhiệt ở nhiệt độ cao hợp lý, nhờ đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc xử lý và bảo quản nguyên liệu. Tính thể rắn thường được ưu tiên so với dạng vô định hình, để tăng cường độ tinh khiết và độ

ổn định của sản phẩm được sản xuất. Tuy nhiên, sự tạo thành dạng tinh thể của hợp chất hữu cơ rất khó dự đoán. Vẫn chưa có phương pháp tin cậy để xác định dạng nào của hợp chất hữu cơ sẽ là dạng tinh thể, nếu có. Ngoài ra, chưa có phương pháp để dự đoán dạng tinh thể nào, nếu có, sẽ có các đặc tính vật lý mong muốn để sử dụng làm dược chất. Do đó, vẫn cần có dạng tinh thể ổn định có điểm nóng chảy cao hợp lý.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất (1) được chuyển hóa in vivo để tạo ra hợp chất có hoạt tính ức chế enzyme neprilysin (NEP). Do đó, hợp chất này được mong đợi là hữu ích và thuận lợi làm dược chất để điều trị các tình trạng bệnh như chứng tăng huyết áp và suy tim.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxymetyl-2-methylpentanoic (1):



hoặc muối dược dụng của chúng. Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến dạng tinh thể của hợp chất 1. Theo một phương án, dạng tinh thể (1') là muối hemi-canxi của hợp chất 1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa một hoặc nhiều chất mang dược dụng và hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó. Dược phẩm này có thể tùy ý chứa các dược chất khác, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, chất đối kháng thụ thể AT₁, chất ức chế enzyme chuyển dạng angiotensin, chất ức chế phosphodiesteraza (PDE), chất ức chế renin, chất lợi niệu, hoặc kết hợp của chúng.

Hợp chất 1 có hoạt tính ức chế enzyme NEP, và vì thế được mong đợi là hữu ích làm dược chất để điều trị cho các bệnh nhân bị mắc bệnh hoặc rối loạn được điều trị bằng cách ức chế enzyme NEP hoặc bằng cách làm tăng mức nồng độ cơ chất peptit của nó.

Do hợp chất 1 có hoạt tính ức chế NEP, nên hợp chất này cũng là hữu ích để làm công cụ nghiên cứu. Do đó, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp sử dụng hợp chất 1 làm công cụ nghiên cứu, phương pháp này bao gồm việc thực hiện thử nghiệm sinh học bằng cách sử dụng hợp chất 1. hợp chất 1 cũng có thể được sử dụng để đánh giá các hợp chất hóa học mới. Vì thế, một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp đánh giá hợp chất thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học, bao gồm các bước: (a) thực hiện thử nghiệm sinh học với hợp chất thử nghiệm để thu được giá trị thử nghiệm thứ nhất; (b) thực hiện thử nghiệm sinh học với hợp chất theo sáng chế để thu được giá trị thử nghiệm thứ hai; trong đó bước (a) được thực hiện trước, sau hoặc đồng thời với bước (b); và (c) so sánh giá trị thử nghiệm thứ nhất từ bước (a) với giá trị thử nghiệm thứ hai từ bước (b). Thử nghiệm sinh học được lấy làm ví dụ bao gồm thử nghiệm ức chế enzym NEP. Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp nghiên cứu hệ thống hoặc mẫu sinh học chứa enzym NEP, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho hệ thống hoặc mẫu sinh học tiếp xúc với hợp chất theo sáng chế; và (b) xác định hiệu quả tạo ra bởi hợp chất này trên hệ thống hoặc mẫu sinh học.

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

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các khía cạnh khác nhau của sáng chế được minh họa bằng cách tham khảo phần hình vẽ kèm theo.

Fig.1 thể hiện mô hình nhiễu xạ bột tia X (PXRD) của dạng tinh thể của canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1').

Fig.2 thể hiện biểu đồ nhiệt phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) của dạng tinh thể của canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1').

Fig.3 thể hiện đồ thị phân tích nhiệt trọng (TGA) của dạng tinh thể của canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1').

Fig.4 thể hiện đường đẳng nhiệt hấp thụ hơi ẩm động lực (DMS) của dạng tinh

thể của canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1').

Fig.5 là hình ảnh hiển vi ánh sáng phân cực (PLM) của dạng tinh thể của canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1').

Fig.6 thể hiện mô hình nhiễu xạ bột tia X (PXRD) của dạng tinh thể của arginin (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1'').

Fig.7 thể hiện biểu đồ nhiệt phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) của dạng tinh thể của arginin (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1'').

Fig.8 thể hiện đồ thị phân tích nhiệt trọng (TGA) của dạng tinh thể của arginin (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1'').

Fig.9 là hình ảnh hiển vi ánh sáng phân cực (PLM) của dạng tinh thể của arginin (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1'').

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic (1), hoặc muối được dụng của chúng.

Hợp chất 1 theo sáng chế chứa hai tâm bất đối và vì thế, hợp chất này có thể được điều chế và sử dụng ở các dạng đồng phân lập thể khác nhau. Cụ thể, nguyên tử cacbon có cấu hình (R,R), (S,S), (S,R), hoặc (R,S) cụ thể hoặc được làm giàu một dạng đồng phân lập thể có cấu hình này. hợp chất 1, như được thể hiện và gọi tên, có cấu hình (S,R). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng lượng nhỏ các chất đồng phân lập thể khác có thể có mặt trong dược phẩm theo sáng chế trừ khi được quy định khác, với điều kiện là tính hữu dụng của dược phẩm ở dạng tổng thể không bị mất đi bởi sự có mặt của các chất đồng phân khác này. Chất đồng phân lập thể cụ thể có thể thu được bằng nhiều phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này, bao gồm

sắc ký bất đối xứng sử dụng pha tĩnh hoặc giá đỡ bất đối xứng thích hợp, hoặc bằng cách chuyển hóa chúng bằng phương pháp hóa học thành chất đồng phân không đối quang, tách các chất đồng phân không đối quang này bằng phương pháp thông thường như sắc ký hoặc tái kết tinh, sau đó tạo ra chất đồng phân lập thể ban đầu.

Hợp chất 1 là tiền dược chất etyl este, trong đó gốc etyl có tác dụng cải thiện tính ưa lipid của hợp chất này, và vì thế cải thiện tính thấm qua màng thụ động của hoạt chất này bằng cách che giấu axit carboxylic. Khi ở trong cơ thể, tin rằng liên kết este này được thủy phân bằng esteraza được tìm thấy trong máu, gan và các cơ quan và mô khác.

hợp chất 1 theo sáng chế được phát hiện là ức chế enzym neprilysin (NEP). Ngoài ra, hợp chất này có hiệu lực lớn hơn để ức chế NEP khi nó được chuyển hóa in vivo. Vì thế, khi mô tả hoạt tính của hợp chất theo sáng chế, được hiểu là hợp chất này có thể thể hiện mức hoạt tính nhất định trong thử nghiệm và mức hoạt tính cải thiện khi được chuyển hóa thành dạng hoạt động của nó. Một đại lượng đo khả năng của hợp chất trong việc ức chế hoạt tính NEP là hằng số ức chế (pK_i). Giá trị pK_i là logarit âm cơ số 10 của hằng số phân ly (K_i), mà thường được báo cáo theo đơn vị mol. hợp chất 1, khi được chuyển hóa, tạo ra axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metyl-4-(oxalylamino)pentanoic ("hoạt chất hoặc chất chuyển hóa hoạt động"), được báo cáo trong Công bố đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ số 2013/0109639 là có pK_i ở NEP ≥ 9 . Các tính chất và ứng dụng khác của hợp chất 1 có thể được chứng minh bằng cách sử dụng thử nghiệm in vitro và in vivo mà đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm, không kể các thử nghiệm khác, các thử nghiệm được mô tả trong Công bố đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ số 2013/0109639.

Hợp chất 1, cũng như các hợp chất được sử dụng trong quá trình tổng hợp của nó, cũng có thể bao gồm hợp chất được đánh dấu đồng vị, tức là, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử đã được làm giàu với các nguyên tử có nguyên tử khối khác với nguyên tử khối được tìm thấy chủ yếu trong tự nhiên. Các ví dụ về chất đồng vị mà có thể được kết hợp vào trong hợp chất có công thức I, ví dụ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{36}Cl , và ^{18}F . Đặc biệt quan tâm 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 ở 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 , có thể được sử dụng, ví dụ, trong các nghiên cứu chụp cắt lớp phát xạ positron (PET).

Các cấu trúc hóa học được gọi tên trong bản mô tả này theo quy tắc IUPAC như được thực hiện trong phần mềm ChemDraw (Perkin Elmer, Inc., Cambridge, MA).

Các định nghĩa

Khi mô tả hợp chất, được phẩm, phương pháp và quy trình theo sáng chế, các thuật ngữ sau đây có nghĩa như sau trừ khi được quy định khác. Ngoài ra, như được sử dụng ở đây, dạng số ít "một" ("a", "an" và "the") bao gồm dạng số nhiều tương ứng trừ khi ngữ cảnh sử dụng quy định khác một cách rõ ràng. Các thuật ngữ "chứa", "bao gồm," và "có" được dự định bao gồm và có nghĩa là có thể có các thành phần bổ sung khác với các thành phần được liệt kê. Tất cả các ký tự số thể hiện lượng các thành phần, tính chất như khối lượng phân tử, điều kiện phản ứng, và v.v. được sử dụng ở đây được hiểu là được thay đổi trong tất cả các trường hợp bởi thuật ngữ "khoảng," trừ khi được quy định khác. Do đó, các giá trị số nêu ở đây là xấp xỉ mà có thể thay đổi phụ thuộc vào các đặc tính mong muốn cố gắng thu được bởi sáng chế. Ít nhất, và không phải là nỗ lực để làm giới hạn đơn bao gồm các phương án tương đương vào phạm vi yêu cầu bảo hộ, mỗi giá trị số ít nhất nên được hiểu nhờ các số có ý nghĩa được báo cáo và bằng cách áp dụng các kỹ thuật làm tròn thông thường.

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

Thuật ngữ "giải phóng có kiểm soát" khi được sử dụng trong bản mô tả này đồng nghĩa với giải phóng duy trì và giải phóng kéo dài và đề cập đến lượng dược chất được phân phối trong khoảng thời gian kéo dài ở đối tượng. Thông thường, viên nén và viên nang giải phóng có kiểm soát giải phóng hoạt chất bên trong cơ thể đối tượng trong khoảng thời gian khoảng 8, 12, 16, và 24 giờ. Nói cách khác, thuật ngữ "giải

phóng ngay” được dùng để chỉ hoạt chất được giải phóng ở đối tượng trong khoảng thời gian ngắn, thông thường ít hơn khoảng 30 phút. Thuật ngữ “giải phóng chậm” đề cập đến viên nén và viên nang giải phóng liều được phẩm sau một khoảng thời gian xác định. Các dạng liều này thường được bao tan trong ruột để ngăn chặn việc giải phóng trong dạ dày nhưng cho phép giải phóng trong đường ruột.

Như được sử dụng ở đây, cụm từ "của công thức" hoặc "có công thức" hoặc "có cấu trúc" không được dự định làm giới hạn và được sử dụng theo cách giống như thuật ngữ "chứa" thường được sử dụng. Ví dụ, nếu một cấu trúc được thể hiện, được hiểu rằng tất cả các chất đồng phân lập thể và dạng đồng phân được bao gồm, trừ khi được có quy định khác.

Nói chung, khi mô tả được chất rắn, thuật ngữ "canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-methylpentanoat" chỉ lượng theo hệ số tỷ lệ lượng xấp xỉ 2:1 giữa anion carboxylat của hợp chất 1 đối với ion trái dấu canxi. Thuật ngữ muối hemi-canxi của hợp chất 1 tương đương với muối canxi của hợp chất 1. Theo một phương án của sáng chế, dạng tinh thể của hợp chất 1' là chất rắn không hút ẩm.

Thuật ngữ “điểm nóng chảy” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là nhiệt độ mà tại đó quan sát được tốc độ biến thiên nhiệt lượng thu vào tối đa bằng kỹ thuật phân tích nhiệt quét vi sai, để chuyển tiếp nhiệt tương ứng với sự đổi pha rắn sang lỏng.

Thuật ngữ "dược dụng" được dùng để chỉ nguyên liệu được chấp nhận về mặt sinh học hoặc theo cách khác khi được sử dụng theo sáng chế. Ví dụ, thuật ngữ "chất mang dược dụng" được dùng để chỉ nguyên liệu mà có thể được kết hợp vào trong dược phẩm và được dùng cho bệnh nhân mà không gây ra tác dụng sinh học không chấp nhận được hoặc tương tác theo cách không chấp nhận được với các thành phần khác của dược phẩm. Nguyên liệu dược dụng này thường đáp ứng các tiêu chuẩn được yêu cầu về kiểm định độc tính và sản xuất, và bao gồm các nguyên liệu được xác định là các thành phần không hoạt động thích hợp bởi Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ.

Thuật ngữ "muối dược dụng" có nghĩa là muối được điều chế từ bazơ hoặc axit được chấp nhận để dùng cho bệnh nhân, như động vật có vú (ví dụ, muối có độ an toàn

cho động vật có vú chấp nhận được đối với phác đồ liều đã cho). Tuy nhiên, được hiểu rằng các muối nằm trong phạm vi của sáng chế không cần phải là muối được dụng, như các muối của hợp chất trung gian không được dự định để dùng cho bệnh nhân. Muối được dụng có thể thu được từ bazơ vô cơ hoặc hữu cơ được dụng và từ axit vô cơ hoặc hữu cơ được dụng. Ngoài ra, khi hợp chất chứa cả gốc bazơ, như amin, pyridin hoặc imidazol, và gốc axit như axit carboxylic hoặc tetrazol, các ion lưỡng tính có thể được tạo ra và được bao gồm trong thuật ngữ "muối" như được sử dụng trong bản mô tả này. Các muối thu được từ bazơ vô cơ được dụng bao gồm muối amoni, canxi, đồng, sắt (III), sắt (II), lithi, magie, mangan, mangan (II), kali, natri, và kẽm, và muối tương tự. Các muối thu được từ bazơ hữu cơ được dụng bao gồm muối của amin bậc một, bậc hai và bậc ba, bao gồm amin được thế, amin vòng, amin có trong tự nhiên và muối tương tự, như arginin, betain, cafein, cholin, N,N'-dibenzyletylendiamin, dietylamín, 2-dietylaminóetanol, 2-dimetylaminóetanol, etanolamin, etylendiamin, N-etylmorpholin, N-etylpiperidin, glucamin, glucosamin, histidin, hydrabamin, isopropylamin, lysin, metylglucamin, morpholin, piperazin, piperadin, nhựa polyamin, procain, purin, theobromin, trietylamin, trimetylamin, tripropylamin, trometamin và muối tương tự. Các muối thu được từ axit vô cơ được dụng bao gồm muối của axit boric, cacbonic, hydrohalic (bromhydric, clohydric, flohydric hoặc iothydric), nitric, phosphoric, sulfamic và sulfuric. Các muối thu được từ axit hữu cơ được dụng bao gồm các muối của axit hydroxyl béo (ví dụ, axit xitric, gluconic, glycolic, lactic, lactobionic, malic, và tarttric), axit monocarboxylic béo (ví dụ, axit axetic, butyric, formic, propionic và trifloaxetic), axit amin (ví dụ, axit aspartic và glutamic), axit carboxylic thơm (ví dụ, axit benzoic, p-clobenzoic, diphenylaxetic, gentisic, hippuric, và 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, maleic, oxalic và suxinic), axit glucoronic, mandelic, mucic, nicotinic, orotic, pamoic, pantothenic, sulfonic (ví dụ, axit benzensulfonic, camphosulfonic, edisylic, etansulfonic, isethionic, metansulfonic, naphtalensulfonic, naphtalen-1,5-disulfonic, naphtalen-2,6-disulfonic và p-toluensulfonic), axit xinafoic, và axit tương tự.

Thuật ngữ "lượng có tác dụng điều trị" có nghĩa là lượng đủ để có tác dụng điều trị khi được dùng cho bệnh nhân cần điều trị, tức là, lượng được chất cần để thu được

tác dụng điều trị mong muốn. Ví dụ, lượng có tác dụng điều trị để điều trị chứng tăng huyết áp là lượng hợp chất cần để, ví dụ, làm giảm, ức chế, loại bỏ, hoặc ngăn ngừa triệu chứng của chứng tăng huyết áp, hoặc điều trị nguyên nhân thực sự gây ra chứng tăng huyết áp. Theo một phương án, lượng có tác dụng điều trị là lượng được chất cần để hạ huyết áp hoặc lượng được chất cần để duy trì huyết áp bình thường. Nói cách khác, thuật ngữ "lượng có tác dụng" có nghĩa là lượng đủ để thu được kết quả mong muốn, có thể không nhất thiết phải là kết quả điều trị bệnh. Ví dụ, khi nghiên cứu hệ chứa enzym NEP, "lượng có tác dụng" có thể là lượng cần để ức chế enzym.

Thuật ngữ "điều trị" hoặc "việc điều trị" khi được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là điều trị hoặc việc điều trị bệnh hoặc tình trạng y tế (như chứng tăng huyết áp) ở bệnh nhân, như động vật có vú (đặc biệt là người) mà bao gồm một hoặc nhiều tác dụng sau đây: (a) ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng y tế xuất hiện, tức là, ngăn ngừa sự tái phát của bệnh hoặc tình trạng y tế hoặc điều trị dự phòng cho bệnh nhân mà có khả năng mắc bệnh hoặc tình trạng y tế này; (b) cải thiện bệnh hoặc tình trạng y tế, tức là, loại bỏ hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc tình trạng y tế ở bệnh nhân; (c) ức chế bệnh hoặc tình trạng y tế, tức là, làm chậm hoặc dừng sự phát triển của bệnh hoặc tình trạng y tế ở bệnh nhân; hoặc (d) làm thuyên giảm triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng y tế ở bệnh nhân. Ví dụ, thuật ngữ "điều trị chứng tăng huyết áp" bao gồm việc ngăn ngừa chứng tăng huyết áp xuất hiện, cải thiện chứng tăng huyết áp, ức chế chứng tăng huyết áp, và làm thuyên giảm triệu chứng của chứng tăng huyết áp (ví dụ, hạ huyết áp). Thuật ngữ "đối tượng" hoặc "bệnh nhân" được dự định bao gồm các động vật có vú, như người, có nhu cầu điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc đang được điều trị để ngăn ngừa bệnh hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng y tế cụ thể, cũng như đối tượng thử nghiệm trong đó hợp chất ở dạng tinh thể được đánh giá hoặc 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 được dự định là có ý nghĩa thông thường của chúng như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà chúng nói đến.

Quy trình tổng hợp chung

Hợp chất 1 và dạng muối canxi tinh thể của nó có thể được tổng hợp từ các nguyên liệu khởi đầu đã có sẵn như được mô tả dưới đây và trong các Ví dụ. Sẽ được

hiều là khi các điều kiện xử lý thông thường hoặc được ưu tiên (tức là, nhiệt độ phản ứng, thời gian, tỷ lệ mol giữa các chất phản ứng, dung môi, áp suất, v.v.) được đưa ra, các điều kiện xử lý khác cũng có thể được sử dụng trừ khi có quy định khác. Sẽ hiểu được rằng, mặc dù các điều kiện xử lý cụ thể (tức là, nhiệt độ kết tinh, thời gian, tỷ lệ mol giữa các chất phản ứng, dung môi, áp suất, v.v.) được đưa ra, các điều kiện xử lý khác cũng có thể được sử dụng trừ khi có quy định khác. Trong một số trường hợp, phản ứng hoặc quá trình kết tinh được thực hiện ở nhiệt độ phòng và việc đo nhiệt độ thực tế không được thực hiện. Được hiểu là nhiệt độ phòng có thể được chọn là nhiệt độ nằm trong khoảng thường liên quan đến nhiệt độ môi trường trong môi trường phòng thí nghiệm, và sẽ thường nằm trong khoảng từ khoảng 15°C đến khoảng 30°C, như khoảng 20°C đến khoảng 25°C. Trong ví dụ khác, phản ứng hoặc quy trình kết tinh được thực hiện ở nhiệt độ phòng và nhiệt độ này thường được đo và được ghi lại.

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

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic (1), hoặc muối được dùng của nó.

Theo một phương án khác, hợp chất 1 có thể được điều chế bằng cách trộn etanol và oxalyl clorua để tạo ra dung dịch, cho benzyl este của axit (2S,4R)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic phản ứng với dung dịch này, và kết hợp hỗn hợp tạo thành với paladi trên cacbon trong môi trường hydro.

Theo một phương án khác nữa, hợp chất 1 có thể được điều chế bằng cách (a) hòa tan etanol trong diclometan; (b) bổ sung oxalyl clorua để tạo ra dung dịch và khuấy ở nhiệt độ phòng; (c) làm bay hơi dung môi khỏi dung dịch; (d) bổ sung dung dịch còn lại vào benzyl este của axit (2S,4R)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic mà trước tiên được hòa tan trong diclometan; (e) bổ sung N,N-diisopropyletylamin và khuấy ở nhiệt độ phòng; (f) làm bay hơi dung môi để tạo ra chất rắn; (g) kết hợp chất rắn với paladi 10% khối lượng trên cacbon trong

dung môi để tạo ra hỗn hợp; (h) đặt hỗn hợp trong hydro trong khi khuấy; và (i) lọc sạch paladi trên cacbon và làm khô trong chân không để tạo ra hợp chất 1 ở dạng rắn. Chất rắn tạo thành trong các bước (f) và (i) cũng có thể được tinh chế bằng sắc ký.

Quy trình điều chế muối hemi-canxi tinh thể của hợp chất 1 thường được tiến hành trong chất pha loãng trơ thích hợp, các ví dụ về chất pha loãng này bao 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 hợp chất tương tự, và hỗn hợp của chúng, tùy ý chứa nước. Hỗn hợp của các chất pha loãng trơ (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 có số nguyên tử cacbon thấp (C_{1-6} alkyl-OH) với nước, ví dụ, metanol và nước và isopropanol và nước. Hệ dung môi đặc biệt thích hợp bao gồm etanol, etanol:nước và etyl axetat:etanol chứa canxi propionat hoặc các muối canxi khác. Khi kết thúc quá trình kết tinh, hợp chất ở dạng tinh thể có thể được tách ra khỏi hỗn hợp phản ứng bằng phương pháp thông thường bất kỳ như kết tủa, lọc, cô đặc, ly tâm, làm khô trong chân không, và tương tự.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất ở dạng tinh thể của axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic. Theo một phương án khác, hợp chất ở dạng tinh thể là canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1').

Theo một phương án khác, hợp chất ở dạng tinh thể 1' có thể được điều chế bằng cách (a) hòa tan axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic trong etanol và N,N-diisopropyletylamin để tạo ra dung dịch A; (b) hòa tan canxi triflometan sulfonat trong etanol để tạo ra dung dịch B; (c) bổ sung từng giọt dung dịch B vào dung dịch A để tạo ra huyền phù đặc; (d) khuấy ở nhiệt độ phòng; và (e) tách các chất rắn tạo thành để thu được hợp chất 1'. Một phương án khác bao gồm bước kết tinh thứ hai. Ở đây, quy trình tái kết tinh thứ hai còn bao gồm các bước (f) làm lạnh hợp chất 1' đến nhiệt độ khoảng 5°C và bổ sung hỗn hợp etanol:nước lạnh trong điều kiện khuấy mạnh; và (g) lọc và làm khô ở nhiệt độ phòng để thu được hợp chất 1'.

Các tính chất kết tinh

Như đã được biết rõ trong lĩnh vực phân tích nhiễu xạ bột tia X (PXRD), các chiều cao đỉnh tương đối của mẫu PXRD phụ thuộc vào nhiều yếu tố liên quan đến việc điều chế mẫu và hình dáng thiết bị, mặc dù các vị trí đỉnh là tương đối không nhạy với các chi tiết thử nghiệm. PXRD, phân tích nhiệt quét vi sai (DSC), phân tích nhiệt trọng (TGA), và đánh giá độ hấp thụ hơi ẩm động lực (DMS) (còn được biết đến là phân tích độ hấp thụ-giải hấp hơi ẩm) được thực hiện như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic ở dạng tinh thể. Theo một khía cạnh khác, hợp chất ở dạng tinh thể là canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1'). Hợp chất ở dạng tinh thể 1' này được đặc trưng bởi mẫu PXRD trong đó vị trí đỉnh về cơ bản là theo các vị trí đỉnh được thể hiện trên Fig.1. Các đỉnh có cường độ tương đối lớn hơn 0,1% về diện tích được liệt kê trong bảng dưới đây. Mô hình này thể hiện các đỉnh nhiễu xạ nhọn trong khoảng 3-25° ở góc 2 θ .

2 θ^*	d (Å)	Diện tích	% diện tích
3,47	25,45	1577,40	16,30
3,98	22,20	2084,20	21,50
5,00	17,67	2012,20	20,70
7,18	12,31	7729,90	79,70
7,38	11,97	9698,10	100,00
7,97	11,08	4616,90	47,60
8,57	10,32	318,10	3,30
8,87	9,96	1860,30	19,20
9,42	9,38	708,30	7,30
9,99	8,85	876,80	9,00
10,60	8,34	333,50	3,40
10,91	8,11	2013,70	20,80
11,58	7,63	22,40	0,20
11,95	7,40	194,00	2,00
12,19	7,25	269,10	2,80
14,86	5,96	297,90	3,10
15,74	5,63	1294,90	13,40

2 θ *	d (Å)	Diện tích	% diện tích
15,98	5,54	1659,40	17,10
16,31	5,43	235,70	2,40
17,29	5,13	264,50	2,70
18,98	4,67	394,80	4,10
19,75	4,49	295,50	3,00
20,83	4,26	255,70	2,60
22,69	3,92	276,20	2,80
23,58	3,77	279,20	2,90

*giá trị góc 2 θ được báo cáo là giá trị $\pm 0,20$.

Vì thế, theo một phương án, hợp chất ở dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi mẫu PXRD bao gồm các đỉnh nhiễu xạ ở các giá trị góc 2 θ là $7,18 \pm 0,2$, $7,38 \pm 0,2$ và $7,97 \pm 0,2$.

Theo một phương án khác, hợp chất ở dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi mẫu PXRD bao gồm các đỉnh nhiễu xạ ở các giá trị góc 2 θ là $3,98 \pm 0,2$, $5,00 \pm 0,2$, $7,18 \pm 0,2$, $7,38 \pm 0,2$, $7,97 \pm 0,2$, $8,87 \pm 0,2$, và $10,91 \pm 0,2$.

Theo một phương án khác, hợp chất ở dạng tinh thể 1' còn được đặc trưng bởi có thêm một hoặc nhiều đỉnh nhiễu xạ ở các giá trị góc 2 θ được chọn từ $3,47 \pm 0,2$, $9,99 \pm 0,2$, $15,74 \pm 0,2$, $15,98 \pm 0,2$, và $18,98 \pm 0,2$; và theo một phương án khác nữa, hợp chất ở dạng tinh thể 1' còn được đặc trưng bởi có thêm ba hoặc nhiều đỉnh nhiễu xạ như vậy.

Theo một phương án, hợp chất ở dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi biểu đồ nhiệt DSC về cơ bản là theo biểu đồ được thể hiện trên Fig.2. Hợp chất ở dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi vạch DSC được ghi lại ở tốc độ gia nhiệt là 10°C trong mỗi phút mà thể hiện tốc độ biến thiên nhiệt lượng thu vào tối đa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 237°C đến khoảng 241°C . Biểu đồ nhiệt DSC minh họa quá trình thu nhiệt nóng chảy với đỉnh ở xấp xỉ 239°C , bắt đầu ở 233°C , và có entanpi bằng $\sim 67\text{J/g}$. Quá trình thu nhiệt thứ hai thể hiện sự phân hủy và các sự kiện nhiệt chưa biết khác.

Theo một phương án, hợp chất ở dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi đồ thị TGA trên Fig.3. Đồ thị TGA thể hiện sự bắt đầu quá trình phân hủy ở nhiệt độ bằng

khoảng 225°C. hợp chất ở dạng tinh thể phân hủy sau khi nóng chảy, như được thấy bởi sự hao hụt khối lượng đáng kể sau ~250°C, mà cũng tương ứng với quá trình thu nhiệt thứ hai ở vạch DSC.

Theo một phương án, hợp chất ở dạng tinh thể 1' được đặc trưng bởi đường đẳng nhiệt DMS trên Fig.4. Dạng này là chất rắn không hút ẩm. Tổng hàm ẩm đạt được được quan sát thấy là ít hơn 1% khối lượng khi tiếp xúc với độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 5% đến 90%. Không phát hiện ra hiện tượng trễ có ý nghĩa giữa các chu kỳ hấp thụ-giải hấp liên tục. Chất rắn thu được sau các chu kỳ hấp thụ-giải hấp cho thấy mẫu PXRD giống như nguyên liệu khởi đầu, chỉ ra là không có thay đổi về dạng sau thử nghiệm này.

Hợp chất ở dạng tinh thể 1' có thể được đặc trưng bởi hình ảnh PLM trên Fig.5, thể hiện dạng này là tinh thể khúc xạ kép mỏng.

Tinh thể của L-arginin (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1'') cũng được điều chế. Tuy nhiên, việc các tinh thể này tiếp xúc với điều kiện môi trường dẫn đến sự tan chảy chậm. hợp chất ở dạng tinh thể 1'' được đặc trưng bởi PXRD và vạch DSC lần lượt trên Fig.6 và Fig.7. Vạch DSC được ghi ở tốc độ gia nhiệt là 10°C trong mỗi phút và thể hiện tốc độ biến thiên nhiệt lượng thu vào tối đa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 113°C đến khoảng 117°C. Biểu đồ nhiệt DSC minh họa quá trình thu nhiệt nóng chảy với đỉnh ở xấp xỉ 116,9°C, bắt đầu ở 106,8°C, và có entanpi bằng ~70,3 J/g. Hợp chất ở dạng tinh thể 1'' cũng được đặc trưng bởi đồ thị TGA trên Fig.8, trong đó quan sát thấy sự hao hụt khối lượng ~ 6,5% cho đến 140°C và tiếp tục quan sát thấy sự hao hụt khối lượng sau 140°C. hợp chất ở dạng tinh thể 1'' có thể được đặc trưng bởi hình ảnh PLM trên Fig.9, thể hiện dạng này là tinh thể khúc xạ kép mỏng.

Sử dụng

Phép ngoại suy đặc điểm của dược chất in vitro sang in vivo ở đối tượng tiếp tục cải thiện (xem, ví dụ, Chiba et al., AAPS J., 2009 June; 11(2): 262-276). Theo sáng chế, hoạt tính ức chế neprilysin người in vitro được đánh giá (Thử nghiệm 1) để xác định hoạt tính ức chế neprilysin của hợp chất 1. Ngưỡng $pK_i \geq 9,0$ đạt được với hợp chất này. Tuy nhiên, các thử nghiệm in vivo bổ sung được thực hiện tiếp để dự đoán chính xác hơn đặc điểm của hợp chất 1 ở đối tượng.

Tham số quan trọng để đánh giá độ thích hợp của tiền dược chất là xác định tiền dược chất này được chuyển hóa thành hoạt chất hoặc chất chuyển hóa có hoạt tính nhanh như thế nào. Theo sáng chế, hợp chất 1, là tiền dược chất este, được chuyển hóa thành hoạt chất hoặc chất chuyển hóa hoạt động, hợp chất so sánh C2, bằng phản ứng enzym, ví dụ, thủy phân bằng esteraza, có thể phụ thuộc ở mức độ cao vào từng loài. Do đó, tốt hơn là đánh giá tốc độ chuyển hóa ở nhiều loài khi ngoại suy cho đối tượng người. Ngoài ra, có một vài đặc điểm hữu ích trong việc đánh giá lượng dược chất thích hợp có được phân phối vào huyết tương để đạt được lợi ích điều trị bệnh cần thiết hay không, ví dụ, sinh khả dụng qua đường miệng cao và độ thanh thải qua thận thấp đối với các đối tượng có chức năng thận bị tổn thương.

Đối với sáng chế, các nghiên cứu dược động học qua đường miệng và trong tĩnh mạch được thực hiện ở loài chuột cống, chó, và khi để xác định sinh khả dụng qua đường miệng của hợp chất 1 so với chất chuyển hóa có hoạt tính hợp chất so sánh C2 (Thử nghiệm 2). Ngoài ra, các nghiên cứu dược động học qua đường miệng và trong tĩnh mạch được thực hiện ở loài chuột cống và chó để so sánh hợp chất 1 với các tiền dược chất hoặc hợp chất este tương tự về mặt hóa học khác (Thử nghiệm 3).

Hợp chất 1 ức chế enzym NEP, và vì thế được mong đợi là hữu ích để điều trị và/hoặc ngăn ngừa tình trạng y tế đáp ứng với sự ức chế NEP. Vì thế, được mong đợi là bệnh nhân bị mắc bệnh hoặc rối loạn được điều trị bằng cách ức chế enzym NEP hoặc bằng cách làm tăng nồng độ cơ chất peptit của nó, có thể được điều trị bằng cách sử dụng lượng có tác dụng điều trị của hợp chất 1. Ví dụ, bằng cách ức chế NEP, hợp chất 1 được mong đợi là tăng cường tác dụng sinh học của peptit nội sinh được chuyển hóa bởi NEP, như peptit natri lợi niệu, bombesin, bradykinin, calcitonin, endothelin, enkephalin, neurotensin, chất P và peptit ruột vận mạch. Vì thế, hợp chất này được mong đợi là có các tác dụng sinh lý khác, ví dụ, trên thận, hệ thần kinh trung ương, hệ sinh dục và hệ tiêu hóa.

Dược chất được loại bỏ khỏi cơ thể đối tượng bằng các quá trình thải trừ khác nhau mà thường được phân loại là bài tiết và chuyển hóa sinh học. Bài tiết đề cập đến việc loại bỏ dược chất nguyên vẹn không dễ bay hơi chủ yếu bằng thận đến bàng quang vào nước tiểu trong khi con đường bài tiết khác bao gồm mật (gan), mồ hôi, nước bọt, sữa (thông qua việc cho con bú) hoặc các dịch cơ thể khác. Dược chất dễ bay hơi như rượu và chất gây mê dạng khí được bài tiết thông qua phổi vào không khí

thở ra. Mặt khác, sự chuyển hóa sinh học, hoặc chuyển hóa dược chất, đề cập đến dược chất được chuyển hóa hóa học trong cơ thể thành chất chuyển hóa và thường là quá trình enzym. Ngoại lệ là khi dược chất được biến đổi hóa học không nhờ enzym, ví dụ, thủy phân este. Enzym tham gia vào quá trình chuyển hóa sinh học của dược chất chủ yếu nằm trong gan. Các mô khác như thận, phổi, ruột non và da cũng chứa enzym chuyển hóa.

Nghiên cứu dược động học cũng được sử dụng để nghiên cứu con đường thải trừ ở đối tượng, ví dụ, độ thanh thải qua thận qua việc bài tiết dược chất đã sử dụng trong nước tiểu theo thời gian. Sự bài tiết qua thận của hợp chất 1 ở mô hình chó được tiến hành để đánh giá sự bài tiết qua thận là con đường thải trừ (Thử nghiệm 4). Con đường thải trừ này là quan trọng với đối tượng có chức năng thận bị tổn thương và cần các liệu pháp dược thải trừ tối thiểu bằng cách bài tiết qua thận. Theo một phương án, sự bài tiết qua thận của hợp chất 1 hoặc hợp chất ở 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 dùng trong 24 giờ.

Như được mô tả trong phần thử nghiệm dưới đây, được bao gồm cùng với hợp chất 1 trong thử nghiệm enzym NEP in vitro, và trong quy trình xác định trên in vivo sinh khả dụng qua đường miệng và sự bài tiết qua thận ở nhiều loài động vật, là các hợp chất so sánh có cấu trúc hóa học tương tự nhau. Bất ngờ là, sự khác biệt có ý nghĩa ở các kết quả được quan sát thấy. Mặc dù từng hợp chất so sánh riêng thể hiện các tính chất, tương tự với các tính chất của hợp chất 1 trong một hoặc nhiều thử nghiệm, chỉ có hợp chất 1 thể hiện, đồng thời, hoạt tính ức chế mạnh neprilysin người, sinh khả dụng qua đường miệng cao, và sự bài tiết qua thận thấp được mong đợi là dẫn đến tính hữu dụng đặc biệt trong điều trị bệnh.

Ngoài ra, để sử dụng hiệu quả hợp chất 1 làm dược chất, mong muốn là có dạng ở trạng thái rắn của hợp chất này mà có thể được sản xuất dễ dàng và có độ ổn định hóa học và vật lý chấp nhận được, bao gồm điểm nóng chảy cao. Tinh thể của axit tự do của hợp chất 1 là không thể thu được. Tinh thể arginin và canxi của hợp chất 1 cuối cùng được tạo ra nhưng tinh thể arginin tan chảy ở điều kiện môi trường và khó nghiên cứu thêm. Mặt khác, tinh thể canxi ổn định và nóng chảy ở nhiệt độ khoảng 239°C và có thể được sử dụng để nghiên cứu thêm để làm dược chất.

Bệnh tim mạch

Bằng cách tăng cường tác dụng của peptit vận mạch tương tự peptit natri lợi niệu và bradykinin, hợp chất 1 được mong đợi là hữu ích để điều trị và/hoặc ngăn ngừa tình trạng y tế như bệnh tim mạch. Xem, ví dụ, Roques et al. (1993) *Pharmacol. Rev.* 45:87-146 và Dempsey et al. (2009) *Amer. J. of Pathology* 174(3):782-796. Bệnh tim mạch được đặc biệt quan tâm bao gồm chứng tăng huyết áp và suy tim. Chứng tăng huyết áp bao gồm, bằng cách minh họa và không giới hạn: chứng tăng huyết áp nguyên phát, còn được gọi là chứng tăng huyết áp vô căn hoặc chứng tăng huyết áp tự phát; chứng tăng huyết áp thứ phát; chứng tăng huyết áp kèm theo bệnh thận; chứng tăng huyết áp nghiêm trọng có hoặc không kèm theo bệnh thận; chứng tăng huyết áp phổi, bao gồm chứng tăng huyết áp động mạch phổi; và chứng tăng huyết áp kháng trị. Suy tim bao gồm, bằng cách minh họa và không giới hạn: suy tim sung huyết; suy tim cấp tính; suy tim mạn tính, ví dụ có phân suất tống máu thất trái giảm (còn được gọi là suy tim tâm thu) hoặc có phân suất tống máu thất trái bảo toàn (còn được gọi là suy tim tâm trương); và suy tim mất bù cấp tính và mạn tính. Vì thế, một phương án của sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị chứng tăng huyết áp, cụ thể là chứng tăng huyết áp nguyên phát hoặc chứng tăng huyết áp động mạch phổi, bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân lượng có tác dụng điều trị của hợp chất 1.

Để điều trị chứng tăng huyết áp nguyên phát, lượng có tác dụng điều trị thường là lượng đủ để hạ huyết áp của bệnh nhân. Việc điều trị này bao gồm cả chứng tăng huyết áp từ nhẹ đến trung bình và chứng tăng huyết áp nghiêm trọng. Khi được sử dụng để điều trị chứng tăng huyết áp, hợp chất 1 có thể được sử dụng kết hợp với được chất khác như chất đối kháng aldosteron, chất ức chế aldosteron synthaza, chất ức chế enzym chuyển dạng angiotensin và chất ức chế enzym chuyển dạng angiotensin/neprilysin tác động kép, chất hoạt hóa và chất kích thích enzym chuyển dạng angiotensin 2 (ACE2), vacxin angiotensin-II, chất chống đái tháo đường, chất kháng lipid, chất chống huyết khối, chất đối kháng thụ thể AT_1 và chất ức chế chất đối kháng thụ thể AT_1 /neprilysin tác động kép, chất đối kháng thụ thể β_1 -adrenergic, chất đối kháng thụ thể α_1 /chất đối kháng thụ thể β -adrenergic tác động kép, chất phong bế kênh canxi, chất lợi niệu, 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 nó, chất đối kháng thụ thể thanh thải peptit natri lợi niệu, chất cho nitric oxit, chất chống

viêm không steroid, chất ức chế phosphodiesteraza (cụ thể là, chất ức chế PDE-V), chất chủ vận thụ thể prostaglandin, chất ức chế renin, chất kích thích và hoạt hóa guanylat cyclaza hòa tan, và sự kết 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, chất lợi niệu, hoặc sự kết hợp của chúng, và được sử dụng để điều trị chứng tăng 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 chứng tăng huyết áp kèm theo bệnh thận. Khi được sử dụng để điều trị chứng tăng huyết áp kháng trị, hợp chất này có thể được sử dụng kết hợp với dược chất khác như chất ức chế aldosteron synthaza.

Để điều trị chứng tăng áp động mạch phổi, lượng có tác dụng điều trị thường là lượng đủ để làm giảm sức cản mạch phổi. Các mục đích điều trị khác là để cải thiện khả năng tập luyện của bệnh nhân. Ví dụ, tại cơ sở y tế, lượng có tác dụng điều trị có thể là lượng cải thiện khả năng đi lại thoải mái của bệnh nhân trong thời gian 6 phút (bao gồm quãng đường xấp xỉ 20-40 mét). Khi được sử dụng để điều trị chứng tăng áp động mạch phổi, hợp chất này có thể được sử dụng kết hợp với dược chất khác như chất đối kháng thụ thể α adrenergic, chất đối kháng thụ thể β_1 adrenergic, chất chủ vận thụ thể β_2 adrenergic, chất ức chế enzym chuyển dạng angiotensin, chất chống đông máu, chất phong bế kênh canxi, chất lợi niệu, chất đối kháng thụ thể endothelin, chất ức chế PDE-V, chất tương tự prostaglandin, chất ức chế tái hấp thu serotonin chọn lọc, và sự kết hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể theo sáng chế, hợp chất 1 được kết hợp với chất ức chế PDE-V hoặc chất ức chế tái hấp thu serotonin chọn lọc và được sử dụng để điều trị chứng tăng áp động mạch phổi.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị suy tim, đặc biệt là suy tim sung huyết (bao gồm cả suy tim sung huyết tâm thu và tâm trương), bao gồm việc cho bệnh nhân sử dụng lượng có tác dụng điều trị của hợp chất 1. Thông thường, lượng có tác dụng điều trị là lượng đủ để làm hạ huyết áp và/hoặc cải thiện chức năng thận. Tại cơ sở y tế, lượng có tác dụng điều trị có thể là lượng đủ để cải thiện huyết động lực trong tim, như ví dụ làm giảm áp lực bít, áp suất tâm nhĩ phải, áp suất làm đầy, và sức cản mạch máu. Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng dưới dạng liều trong tĩnh mạch. Khi được sử dụng để điều trị suy tim, hợp chất này có thể được sử dụng kết hợp với các dược chất khác như chất đối kháng thụ thể adenosin,

chất phá vỡ sản phẩm glycat hóa bền vững, chất đối kháng aldosteron, chất đối kháng thụ thể AT_1 , chất đối kháng thụ thể β_1 adrenergic, chất đối kháng thụ thể β -adrenergic/chất đối kháng thụ thể α_1 tác động kép, chất ức chế chymaza, digoxin, chất lợi niệu, chất ức chế enzym chuyển dạng 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 nitric oxit, chất tương tự prostaglandin, chất ức chế PDE-V, chất hoạt hóa và kích thích guanylat cyclaza hòa tan, và chất đối kháng thụ thể vasopressin. Theo một phương án cụ thể theo sáng chế, hợp chất 1 được kết hợp với chất đối kháng aldosteron, chất đối kháng thụ thể β_1 adrenergic, chất đối kháng thụ thể AT_1 , hoặc chất lợi niệu, và được sử dụng để điều trị suy tim sung huyết.

Tiêu chảy

Để làm chất ức chế NEP, hợp chất 1 được mong đợi là ức chế sự phân hủy enkephalin nội sinh và vì thế hợp chất này cũng có thể được dùng để điều trị chứng tiêu chảy, bao gồm chứng tiêu chảy lây nhiễm và tiêu chảy xuất tiết/toàn nước. Xem, ví dụ, 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 chứng tiêu chảy, hợp chất 1 có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất chống tiêu chảy bổ sung.

Bệnh thận

Bằng cách tăng cường các tác dụng của peptit vận mạch tương tự peptit natri lợi niệu và bradykinin, hợp chất 1 được mong đợi là tăng cường chức năng thận (xem 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 để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh thận ở bệnh nhân suy thận. Các bệnh thận được đặc biệt quan tâm bao gồm bệnh thận do đái tháo đường, bệnh thận mạn tính, protein niệu, và đặc biệt là tổn thương thận cấp (do, ví dụ, phẫu thuật tim mạch, hóa trị, hoặc sử dụng các thuốc cản quang trong chụp chiếu y khoa gây ra) hoặc suy thận cấp (xem Sharkovska et al. (2011) Clin. Lab. 57:507-515 và Newaz et al. (2010) Renal Failure 32:384-390).

Bệnh nhân suy thận có bệnh thận mạn tính (CKD) có thể được phân loại theo Hướng dẫn của Hội đồng Thận học Quốc gia Mỹ về đánh giá hiệu quả điều trị bệnh thận (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative - NKF

KDOQI). Khi bệnh thận mạn tính được hình thành, tức là, sự phá hủy thận hoặc độ lọc cầu thận (GFR) $<60\text{mL/phút}/1,73\text{m}^2$ trong thời gian ≥ 3 tháng, giai đoạn bệnh có thể được quy định theo phân loại KDOQI CKD. Các giai đoạn này bao gồm giai đoạn 1 (phá hủy thận với GFR bình thường hoặc tăng): $\text{GFR} \geq 90$; giai đoạn 2 (phá hủy thận với GFR giảm nhẹ): $\text{GFR } 60\text{-}89$; giai đoạn 3 (GFR giảm trung bình): $\text{GFR } 30\text{-}59$; giai đoạn 4 (GFR giảm nghiêm trọng): $\text{GFR } 15\text{-}29$; và giai đoạn 5 (suy thận): $\text{GFR} < 15$ (hoặc lọc máu). GFR được xác định theo đơn vị là $\text{mL/phút}/1,73\text{m}^2$.

Một phương án bao gồm phương pháp điều trị cho bệnh nhân suy thận bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng điều trị 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 bệnh nhân suy thận có chứng tăng huyết áp hoặc 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 dược chất khác như chất ức chế enzym chuyển dạng angiotensin, chất đối kháng thụ thể AT_1 , và chất lợi niệu.

Một phương án khác bao gồm phương pháp điều trị cho bệnh nhân suy thận có bệnh thận mạn tính có độ lọc cầu thận ước tính (eGFR) nằm trong khoảng từ $60\text{mL/phút}/1,73\text{m}^2$ đến $15\text{mL/phút}/1,73\text{m}^2$ bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân lượng có tác dụng điều trị 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 bệnh nhân suy thận mắc bệnh thận mạn tính có độ lọc cầu thận ước tính (eGFR) $\geq 90\text{mL/phút}/1,73\text{m}^2$ (giai đoạn 1) hoặc $\text{eGFR} < 15\text{mL/phút}/1,73\text{m}^2$ (giai đoạn 5) bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân lượng có tác dụng điều trị 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 là $\text{eGFR} < 30\text{mL/phút}/1,73\text{m}^2$. Theo một phương án khác, phương pháp điều trị cho bệnh nhân 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 bao hàm một hoặc nhiều giai đoạn này với hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể của nó, cụ thể là dạng tinh thể 1' được bao gồm.

Liệu pháp ngăn ngừa

Bằng cách tăng cường các tác dụng của peptit natri lợi niệu, hợp chất 1 còn được mong đợi là hữu dụng trong liệu pháp ngăn ngừa, do tác dụng chống phì đại và

chống xơ hóa của peptit natri lợi niệu (xem Potter et al. (2009) Handbook of Experimental Pharmacology 191:341-366), ví dụ, để ngăn ngừa sự tiến triển của chứng suy tim sau nhồi máu cơ tim, ngăn ngừa tái hẹp động mạch sau phẫu thuật tạo hình mạch, ngăn ngừa sự làm dày thành mạch máu sau phẫu thuật mạch, ngăn ngừa chứng xơ vữa động mạch, và ngăn ngừa bệnh mạch máu do đái tháo đường.

Bệnh tăng nhãn áp

Bằng cách tăng cường các tác dụng của peptit natri lợi niệu, hợp chất 1 được mong đợi là hữu dụng để điều trị bệnh tăng nhãn áp. Xem, ví dụ, 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 bệnh tăng nhãn áp bổ sung.

Giảm đau

Để làm chất ức chế NEP, hợp chất 1 được mong đợi là ức chế sự phân hủy enkephalin nội sinh và vì thế hợp chất này cũng có thể hữu dụng để làm thuốc giảm đau. Xem, ví dụ, 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 chứng đau, hợp chất 1 có thể được kết hợp với một hoặc nhiều thuốc chống cảm thụ đau bổ sung như chất ức chế aminopeptidaza N hoặc dipeptidyl peptidaza III, chất chống viêm không steroid, chất ức chế tái hấp thu monoamin, chất giãn cơ, chất đối kháng thụ thể NMDA, chất chủ vận thụ thể opioit, chất chủ vận thụ thể 5-HT_{1D} serotonin, và chất chống trầm cảm ba vòng.

Cách sử dụng khác

Do tính chất ức chế NEP của nó, hợp chất 1 còn được mong đợi là hữu ích làm chất chống ho, cũng như hữu ích để điều trị chứng tắc huyết áp kịch phát do xơ gan (xem Sansoe et al. (2005) J. Hepatol. 43:791-798), ung thư (xem Vesely (2005) J. Investigative Med. 53:360-365), trầm cảm (xem Noble et al. (2007) Exp. Opin. Ther. Targets 11:145-159), rối loạn kinh nguyệt, sinh non, tiền sản giật, lạc nội mạc tử cung, rối loạn sinh sản (ví dụ, vô sinh nam và nữ, hội chứng buồng trứng đa nang, thất bại làm tổ), và rối loạn tình dục nam và nữ, bao gồm rối loạn cương dương ở nam giới và rối loạn ham muốn tình dục ở nữ giới. Cụ thể hơn, hợp chất 1 được mong đợi là hữu ích để điều trị rối loạn tình dục nữ (xem Pryde et al. (2006) J. Med. Chem. 49:4409-

4424), thường được xác định là khó khăn hoặc bất lực ở bệnh nhân nữ trong việc có được sự thỏa mãn khi thể hiện tình dục. Rối loạn này bao gồm nhiều rối loạn tình dục nữ khác nhau bao gồm, bằng cách minh họa và không giới hạn, rối loạn giảm ham muốn tình dục, rối loạn ham muốn tình dục, rối loạn cực khoái và rối loạn đau khi quan hệ. Khi được sử dụng để điều trị các rối loạn này, đặc biệt là rối loạn tình dục nữ, hợp chất theo sáng chế có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất thứ hai sau đây: chất ức chế PDE-V, chất chủ vận dopamin, chất chủ vận và/hoặc chất đối kháng của thụ thể estrogen, androgen, và estrogen. Do đặc tính ức chế NEP của nó, hợp chất 1 còn được mong đợi là có đặc tính chống viêm, và được mong đợi là hữu ích như vậy, cụ thể là khi được sử dụng kết hợp với statin.

Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng NEP có vai trò trong việc điều hòa chức năng thần kinh ở bệnh đái tháo đường thiếu hụt insulin và bệnh béo phì do chế độ ăn. Coppey et al. (2011) *Neuropharmacology* 60:259-266. Vì thế, do tính chất ức chế NEP của nó, hợp chất 1 cũng được mong đợi là hữu dụng để tạo ra sự bảo vệ khỏi sự suy yếu thần kinh do bệnh đái tháo đường hoặc bệnh béo phì do chế độ ăn gây ra.

Lượng hợp chất 1 được sử dụng trong mỗi liều hoặc tổng lượng được sử dụng mỗi ngày có thể được xác định trước hoặc nó có thể được xác định dựa trên từng bệnh nhân bằng cách tính đến các yếu tố cần cân nhắc, bao gồm bản chất và mức độ nghiêm trọng của tình trạng của bệnh nhân, tình trạng bệnh được điều trị, độ tuổi, cân nặng, và sức khỏe chung của bệnh nhân, sự dung nạp của bệnh nhân với hoạt chất hoặc chất chuyển hóa hoạt động, đường sử dụng, các cân nhắc về dược lý như hoạt tính, hiệu lực, đặc tính dược động học và độc tính của hợp chất và chất thứ hai bất kỳ được sử dụng, và yếu tố tương tự. Việc điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh hoặc tình trạng y tế (như chứng tăng huyết áp) có thể bắt đầu bằng liều được xác định trước hoặc liều được xác định bởi bác sĩ điều trị, và sẽ tiếp tục trong khoảng thời gian cần thiết để ngăn ngừa, cải thiện, ức chế, hoặc làm thuyên giảm triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng y tế. Bệnh nhân trải qua quá trình điều trị như vậy thường được theo dõi trên cơ sở hàng ngày để xác định hiệu quả của liệu pháp. Ví dụ, khi điều trị chứng tăng huyết áp, các số đo huyết áp có thể được sử dụng để xác định hiệu quả của quá trình điều trị. Các chỉ định tương tự đối với các bệnh và tình trạng khác được mô tả ở đây, là đã được biết rõ và sẵn có đối với bác sĩ điều trị. Việc theo dõi liên tục bởi bác sĩ sẽ đảm bảo rằng lượng tối ưu của hợp chất 1 được sử dụng ở thời điểm cho trước bất kỳ, cũng như tạo

điều kiện cho việc xác định khoảng thời gian điều trị. Cần quan tâm đặc biệt khi chất thứ hai cũng được sử dụng, vì việc lựa chọn chúng, liều, và khoảng thời gian điều trị cũng có thể cần được điều chỉnh. Theo cách này, phác đồ điều trị và lịch sử dụng liều có thể được điều chỉnh trong thời gian điều trị nhờ đó lượng thấp nhất của hoạt chất hoặc chất chuyển hóa hoạt động thể hiện hiệu quả mong muốn được sử dụng và, ngoài ra, việc sử dụng đó chỉ được tiếp tục đủ lâu ở mức cần thiết để điều trị hiệu quả bệnh hoặc tình trạng 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 có hoạt tính ức chế enzym NEP, hợp chất này cũng hữu dụng làm công cụ nghiên cứu để khảo sát hoặc nghiên cứu hệ thống hoặc mẫu sinh học có enzym NEP, ví dụ, để nghiên cứu bệnh trong đó enzym NEP hoặc cơ chất peptit của nó có vai trò. Hệ thống hoặc mẫu sinh học thích hợp bất kỳ có enzym NEP có thể được sử dụng trong các nghiên cứu mà có thể được tiến hành *in vitro* hoặc *in vivo*. Các hệ thống hoặc mẫu sinh học điển hình thích hợp cho các nghiên cứu này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, tế bào, dịch chiết tế bào, màng huyết tương, mẫu mô, cơ quan được phân lập, động vật có vú (như chuột nhắt, chuột cống, chuột lang nhà, thỏ, chó, lợn, người, và v.v.), và đối tượng tương tự, với động vật có vú được đặc biệt quan tâm. Theo một phương án cụ thể theo sáng chế, hoạt tính enzym NEP ở động vật có vú được ức chế bằng cách sử dụng lượng ức chế NEP của hợp chất 1.

Khi được sử dụng làm công cụ nghiên cứu, hệ thống hoặc mẫu sinh học chứa enzym NEP thường được tiếp xúc với lượng ức chế enzym NEP của hợp chất 1. Sau khi hệ thống hoặc mẫu sinh học được cho tiếp xúc với hợp chất, các tác dụng ức chế enzym NEP được xác định bằng cách sử dụng các quy trình và thiết bị thông thường, như bằng cách xác định mức gắn kết thụ thể trong thử nghiệm gắn kết hoặc xác định các thay đổi gây ra bởi phối tử trong thử nghiệm chức năng. Việc tiếp xúc bao gồm bước cho tế bào hoặc mô tiếp xúc với hợp chất, sử dụng hợp chất này cho động vật có vú, 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 việc đo đáp ứng (phân tích định lượng) hoặc có thể bao gồm thiết lập quy trình quan sát (phân tích định tính). Việc xác định đáp ứng bao gồm, ví dụ, xác định

tác dụng của hợp chất đối với hệ thống hoặc mẫu sinh học bằng cách sử dụng các quy trình và thiết bị thông thường, như thử nghiệm hoạt tính enzym và xác định các thay đổi do sản phẩm hoặc cơ chất enzym trong thử nghiệm chức năng. Các kết quả thử nghiệm 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 bao gồm việc xác định 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 vì thế cũng hữu ích trong các thử nghiệm sàng lọc để phát hiện, ví dụ, hợp chất mới có hoạt tính ức chế NEP. Theo cách này, hợp chất 1 được sử dụng làm chất chuẩn trong thử nghiệm để cho phép so sánh các kết quả thu được với hợp chất thử nghiệm và với hợp chất 1 để nhận biết các hợp chất thử nghiệm có hoạt tính tương đương hoặc mạnh hơn, nếu có. Ví dụ, số liệu pK_i của hợp chất thử nghiệm hoặc nhóm các hợp chất thử nghiệm được so sánh với số liệu pK_i của 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 giá trị pK_i bằng hoặc lớn hơn so với hợp chất theo sáng chế. Khía cạnh này của sáng chế bao gồm, dưới dạng các phương án riêng biệt, cả việc tạo ra dữ liệu so sánh (sử dụng các thử nghiệm thích hợp) và phân tích dữ liệu thử nghiệm để nhận biết các hợp chất thử nghiệm cần quan tâm. Vì thế, hợp chất thử nghiệm có thể được đánh giá trong thử nghiệm sinh học, bằng phương pháp bao gồm các bước: (a) thực hiện thử nghiệm sinh học với hợp chất thử nghiệm để thu được giá trị thử nghiệm thứ nhất; (b) thực hiện thử nghiệm sinh học với hợp chất 1 để thu được giá trị thử nghiệm thứ hai; trong đó bước (a) được thực hiện trước, sau hoặc đồng thời với bước (b); và (c) so sánh giá trị thử nghiệm thứ nhất thu được từ bước (a) với giá trị thử nghiệm thứ hai thu được từ bước (b). Thử nghiệm sinh học ví dụ bao gồm thử nghiệm ức chế enzym NEP.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp nghiên cứu hệ thống hoặc mẫu sinh học bao gồm enzym NEP, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho hệ thống hoặc mẫu sinh học tiếp xúc với hợp chất 1; và (b) xác định hiệu quả gây ra bởi hợp chất này trên hệ thống hoặc mẫu sinh học.

Dược phẩm và chế phẩm

Hợp chất 1 thường được sử dụng cho bệnh nhân ở dạng dược phẩm hoặc chế phẩm. Dược phẩm này có thể được sử dụng cho bệnh nhân bằng đường sử dụng chấp nhận được bất kỳ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sử dụng qua đường miệng, trực tràng, âm đạo, mũi, xông hít, tại chỗ (bao gồm qua da), mắt, và ngoài đường tiêu hóa. Ngoài ra, hợp chất 1 có thể được sử dụng, ví dụ qua đường miệng, với nhiều liều mỗi ngày (ví dụ, hai, ba, hoặc bốn lần hàng ngày), với liều duy nhất hàng ngày hoặc liều duy nhất mỗi tuần. Sẽ được hiểu là dạng bất kỳ của hợp chất 1, (tức là, bazơ tự do, axit tự do, muối được dụng, solvat, v.v.) mà thích hợp cho đường sử dụng cụ thể có thể được sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế.

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

Dược phẩm theo sáng chế thường chứa lượng có tác dụng điều trị của hợp chất 1. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng dược phẩm có thể chứa nhiều hơn lượng có tác dụng điều trị, như trong chế phẩm gộp, hoặc ít hơn lượng có tác dụng điều trị, tức là, các liều đơn vị riêng được thiết kế để sử dụng nhiều lần để đạt được lượng có tác dụng điều trị. Thông thường, dược phẩm này chứa hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 95% khối lượng, bao gồm, nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, như nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10% khối lượng, với lượng thực tế phụ thuộc vào chính dược phẩm đó, đường sử dụng, tần suất sử dụng liều, và v.v.. Theo một phương án, dược phẩm thích hợp cho dạng liều dùng qua đường miệng, ví dụ, có thể chứa hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 70% khối lượng, hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 60% khối 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, phụ thuộc vào đường sử dụng được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân cụ thể hoặc loại tình trạng y tế hoặc trạng thái bệnh. Về khía cạnh này, việc bào chế dược phẩm thích hợp cho đường sử dụng cụ thể cũng nằm trong phạm vi kiến thức của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dược phẩm. Ngoài ra, chất

mang hoặc tá dược được sử dụng trong dược phẩm này có thể mua được trên thị trường. Để làm rõ hơn, các kỹ thuật bào chế thông thường được mô tả trong 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 điển hình về nguyên liệu có thể làm chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các nguyên liệu sau: 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; bột tragacanth; mạch nha; gelatin; bột talc; tá dược, như bơ ca cao và sáp thuốc đạn; dầu, như dầu lạc, dầu hạt bông, dầu rum, dầu vừng, dầu oliu, dầu ngô và dầu đậu tương; glycol, như propylen glycol; polyol, 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 có chất gây sốt; nước muối đẳng trương; dung dịch Ringer; rượu etylic; dung dịch đệm phosphat; khí đẩy dạng nén, như cloflocacbon và hydroflocacbon; và các chất tương thích không độc khác được sử dụng trong dược phẩm.

Theo một phương án theo sáng chế, chất mang dược dụng là magie stearat. Ví dụ, dược phẩm này có thể chứa hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' và magie stearat ở tỷ lệ của hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' so với magie stearat là khoảng 3:1 đến khoảng 10:1. Các tỷ lệ khác của hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' so với magie stearat bao 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 nhào kỹ và đồng nhất hoạt chất với chất mang dược dụng và một hoặc nhiều thành phần tùy ý. Sau đó hỗn hợp đã được trộn đều thu được có thể được tạo hình hoặc được nạp vào viên nén, viên nang, viên tròn, bình khí dung, bình chứa, thiết bị phân phối và dạng tương tự bằng cách sử dụng các quy trình và thiết bị thông thường.

Theo một phương án, dược phẩm này thích hợp để sử dụng qua đường miệng. Dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường miệng có thể ở dạng viên nang, viên nén, viên tròn, viên ngậm, viên nhện, viên bao đường, bột, cốm; dung dịch hoặc hỗn dịch

trong chất lỏng chứa nước hoặc không chứa nước; nhũ tương lỏng dầu trong nước hoặc nước trong dầu; cốm ngọt hoặc siro; và dạng tương tự; mỗi dạng chứa lượng được xác định trước của hoạt chất.

Khi được dự định để sử dụng qua đường miệng ở dạng liều rắn (viên nang, viên nén, viên tròn và dạng tương tự), dược phẩm này thường chứa hoạt chất và một hoặc nhiều chất mang được dụng, như natri xitrat, dicanxi phosphat, hoặc magie stearat. Dạng liều rắn cũng có thể bao gồm chất độn hoặc chất bổ sung, 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 acacia; chất tạo ẩm, như glyxerol; chất phân rã, như thạch rau câu agar-agar, 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 tăng cường 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 làm 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 này của sáng chế, thuật ngữ “chất mang được dụng” bao gồm tất cả các các thuật ngữ như chất mang, chất độn hoặc chất bổ sung, chất kết dính, chất tạo ẩm, chất làm chậm hòa tan, chất thấm ướt, chất hấp thụ, chất làm trơn, chất tạo màu và chất đệm được mô tả trên đây.

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

Dược phẩm cũng có thể được bào chế để tạo ra sự giải phóng chậm hoặc có kiểm soát của hoạt chất bằng cách sử dụng, ví dụ, hydroxypropyl methyl xeluloza với các tỷ lệ thay đổi hoặc nền polyme khác, liposom và/hoặc vi cầu. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa chất làm mờ và có thể được bào chế sao cho chúng chỉ giải phóng hoạt chất, hoặc tốt hơn là, trong phần nhất định của đường tiêu hóa, tùy ý, theo cách được làm chậm. Các ví dụ về các chế phẩm bao mà có thể được sử dụng bao gồm chất polyme và sáp. Hoạt chất cũng có thể ở dạng được bao trong vi nang, tùy ý với một hoặc nhiều tá dược được mô tả trên đây.

Một phương án của sáng chế bao gồm dạng liều dùng qua đường miệng chứa hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' trong viên nang, viên nén, chất lỏng hoặc hỗn dịch. Một phương án khác của sáng chế đề cập đến dạng liều dùng qua đường miệng trong đó sự giải phóng hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' ở đối tượng là giải phóng ngay, giải phóng được kiểm soát hoặc giải phóng chậm. Nếu viên nang được sử dụng làm dạng liều dùng qua đường miệng, một phương án khác bao gồm viên nang chứa gelatin, polysaccharit hoặc polyme tổng hợp. Theo một phương án cụ thể, viên nang chứa hydroxypropyl methylxeluloza.

Nguyên liệu cho viên nang thích hợp theo sáng chế được chọn từ gelatin, dẫn xuất xeluloza, tinh bột, dẫn xuất tinh bột, chitosan và nhựa dẻo tổng hợp. Nếu gelatin được sử dụng làm nguyên liệu cho viên nang, nó có thể được sử dụng trong hỗn hợp với các chất phụ gia khác được chọn từ polyetylen glycol (PEG), glyxerol, sorbitol, polypropylen glycol, copolyme khối PEO-PPO và các rượu đa chức khác và polyete. Khi dẫn xuất xeluloza được sử dụng làm nguyên liệu cho viên nang, hydroxypropylmethylxeluloza, hydroxypropylxeluloza, methylxeluloza, hydroxymethylxeluloza và hydroxyetylxeluloza là các polyme được ưu tiên. Nếu nhựa tổng hợp được sử dụng làm nguyên liệu cho viên nang, polyetylen, polycacbonat, polyeste, polypropylen và polyetylen terephthalat là các nguyên liệu được ưu tiên. Được đặc biệt ưu tiên là polyetylen, polycacbonat hoặc polyetylen terephthalat.

Dạng liều lỏng thích hợp để sử dụng qua đường miệng bao gồm, bằng cách minh họa, nhũ tương được dụng, vi nhũ tương, dung dịch, hỗn dịch, siro và cồn ngọt. Dạng liều 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, hạt mọc dưới đất, ngô, rau mầm, oliu, thầu dầu và vùng), glyxerol, rượu tetrahydrofurylic, polyetylen glycol và este của axit béo của sorbitan, và hỗn hợp của chúng. Hỗn dịch có thể chứa chất tạo hỗn dịch như, ví dụ, rượu isostearyllic được etoxyl hóa, polyoxyetylen sorbitol và sorbitan este, xenluloza vi tinh thể, nhôm metahydroxit, bentonit, thạch trắng agar-agar và tragacanth, và hỗn hợp của chúng.

Khi được dự định để sử dụng qua đường miệng, dược phẩm theo sáng chế có thể được đóng gói ở dạng liều đơn vị. Thuật ngữ "dạng liều đơn vị" được dùng để chỉ đơn vị rời rạc về mặt vật lý thích hợp để sử dụng liều cho bệnh nhân, tức là, mỗi đơn vị chứa lượng được xác định trước của hoạt chất được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị bệnh mong muốn một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều đơn vị bổ sung. Ví dụ, dạng liều đơn vị này 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 để sử dụng bằng cách xông hít, và thường ở dạng khí dung hoặc bột. Dược phẩm này thường được dùng bằng cách sử dụng các thiết bị phân phối đã được biết rõ, như máy xông, bột khô, hoặc bình xịt định liều. Thiết bị máy xông tạo ra dòng không khí có vận tốc cao khiến cho dược phẩm phun dưới dạng sương mà được đưa vào đường hô hấp của bệnh nhân. Chế phẩm sử dụng cho máy xông lấy làm ví dụ chứa hoạt chất được hòa tan trong chất mang để tạo ra dung dịch, hoặc được micron hóa và kết hợp với chất mang để tạo ra hỗn dịch của các hạt được micron hóa có kích thước hít vào được. Bình xịt bột khô sử dụng hoạt chất dưới dạng bột chảy tự do được phân tán trong dòng không khí hít vào của bệnh nhân. Chế phẩm bột khô lấy làm ví dụ chứa hoạt chất được trộn khô với tá dược như lactoza, tinh bột, manitol, dextroza, axit polylactic, polylactit-co-glycolit, và hỗn hợp của chúng. Bình xịt định liều xả một lượng xác định của hoạt chất bằng cách sử dụng khí đẩy đã nén. Chế phẩm định liều lấy làm ví dụ bao gồm dung dịch hoặc hỗn dịch của hoạt chất trong chất đẩy đã hóa lỏng, như cloflocacbon hoặc hydrofloalkan. Các thành phần tùy ý của 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 này thường được bào chế bằng cách bổ sung hydrofloalkan lạnh hoặc cao áp vào vật chứa thích hợp chứa hoạt chất, etanol (nếu có) và chất hoạt động bề mặt (nếu có). Để bào chế hỗn dịch, hoạt chất được micron hóa và sau đó kết hợp với chất đẩy. Theo một 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 hạt được micron hóa của hoạt chất. Chế phẩm này sau đó được nạp vào bình khí dung, tạo ra một phần của bình xịt.

Hợp chất 1 và chế phẩm của nó cũng có thể được sử dụng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, bằng cách tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, hoặc trong màng bụng. Để sử dụng như vậy, hoạt chất được cung cấp trong dung dịch, hỗn dịch, hoặc nhũ tương vô khuẩn. Các dung môi lấy làm ví dụ để điều chế các chế phẩm như vậy bao gồm nước, nước muối, chất điện phân, rượu phân tử lượng thấp như propylen glycol và polyetylen glycol, dầu, axit amin, gelatin, đường, este của axit béo như etyl oleat, và dung môi 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 thẩm ướt, chất nhũ hóa, và chất phân tán. Chất hoạt động bề mặt, chất ổn định bổ sung hoặc chất điều chỉnh độ pH (axit, bazơ hoặc chất đệm) và chất chống oxy hóa đặc biệt hữu ích để tạo ra độ ổn định cho chế phẩm, ví dụ, làm giảm thiểu hoặc tránh sự thủy phân este và liên kết amit có mặt trong hợp chất. Các chế phẩm này có thể được vô khuẩn bằng cách sử dụng môi trường tiệt khuẩn, chất vô khuẩn, lọc, chiếu xạ, hoặc nhiệt.

Chất mang chứa nước được chấp nhận về mặt sinh lý tiêu biểu bao gồm, bằng cách ví dụ, nước vô khuẩn 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, dextroza thay đổi từ 2,5 đến 10% và natri clorua thay đổi từ 0,12 (19mEq 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, USP (ví dụ, 147 mEq natri, 4 mEq kali, 4,5 mEq canxi và 156 mEq clorua trong mỗi lít); dung dịch tiêm Ringer được lactat hóa, USP (ví dụ, 2,7 mEq canxi, 4 mEq kali, 130 mEq natri, và 28 mEq lactat trong mỗi lít); dung dịch tiêm natri clorua, USP (ví dụ, natri clorua 0,9%) và dạng tương tự.

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

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa chứa dung dịch nước xyclodextrin làm chất mang được dùng. Các xyclodextrin thích hợp bao

gồm phân tử vòng chứa sáu hoặc nhiều đơn vị α -D-glucopyranoza liên kết ở vị trí 1,4 bằng liên kết như trong amylaza, β -xyclodextrin hoặc xycloheptaamyloza. Các xyclodextrin lấy làm ví dụ bao gồm dẫn xuất xyclodextrin như hydroxypropyl và sulfobutyl ete xyclodextrin như hydroxypropyl- β -xyclodextrin và sulfobutyl ete β -xyclodextrin. Các chất đệm lấy làm ví dụ dùng cho chế phẩm này bao gồm chất đệm gốc axit carboxylic như dung dịch đệm xitrat, lactat và maleat. Trong một phương án theo sáng chế, dạng liều dùng trong tĩnh mạch chứa hợp chất 1 hoặc dạng tinh thể 1' trong dung dịch được đệm.

Theo một phương án, hợp chất 1 hoặc dược phẩm của nó là bột được làm đông khô. Thông thường, bột được làm đông khô là bột vô khuẩn và được đóng gói trong lọ bịt kín hoặc ống thủy tinh 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 đã biết và tá dược. Ví dụ, hợp chất 1 có thể được trộn với chất tăng cường tính thấm, như propylen glycol, polyetylen glycol monolaurat, azaxycloalkan-2-on và chất tương tự, và được kết hợp vào miếng dán hoặc hệ phân phối tương tự. Các tá dược bổ sung bao gồm chất tạo gel, chất nhũ hóa và dung dịch đệm, có thể được sử dụng trong chế phẩm qua da này nếu muốn.

Chất thứ hai

Hợp chất 1 có thể là hữu ích dưới dạng chất điều trị bệnh duy nhất hoặc có thể được kết hợp với một hoặc nhiều dược chất bổ sung để thu được tác dụng điều trị bệnh mong muốn. Vì thế, trong một phương án, dược phẩm theo sáng chế chứa các dược chất khác mà được sử dụng đồng thời với hợp chất 1. Ví dụ, dược phẩm này còn có thể chứa một hoặc nhiều dược chất (còn được gọi là (các) “chất thứ hai”). Các dược chất như vậy là đã được biết rõ trong lĩnh vực này, và bao gồm chất đối kháng thụ thể adenosin, chất đối kháng thụ thể α adrenergic, chất đối kháng thụ thể β_1 adrenergic, chất chủ vận thụ thể β_2 adrenergic, chất đối kháng thụ thể β adrenergic/chất đối kháng thụ thể α_1 tác động kép, chất phá vỡ sản phẩm glycat hóa bền vững, chất đối kháng aldosteron, chất ức chế aldosteron synthaza, chất ức chế aminopeptidaza N, androgen, chất ức chế enzym chuyển dạng angiotensin và chất ức chế enzym chuyển dạng angiotensin/neprilysin tác động kép, chất hoạt hóa và chất kích thích enzym chuyển hóa angiotensin 2, vacxin angiotensin-II, chất chống đông, chất chống đái tháo đường,

chất chống tiêu chảy, chất chống bệnh 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 chặn thụ thể angiotensin đa chức năng, chất đối kháng thụ thể bradykinin, chất phong bế kênh canxi, chất ức chế chymaza, digoxin, chất lợi niệu, chất chủ vận dopamin, chất ức chế enzyme chuyển hóa endothelin, chất đối kháng thụ thể endothelin, chất ức chế HMG-CoA reductaza, estrogen, chất chủ vận và/hoặc chất đối kháng của thụ thể estrogen, chất ức chế tái hấp thu monoamin, chất giãn cơ, peptit natri lợi niệu và các chất tương tự của chúng, chất đối kháng thụ thể thải trừ peptit natri lợi niệu, chất ức chế neprilysin, chất cho nitric oxit, chất chống 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 tái hấp thu chọn lọc serotonin, chất phong bế kênh canxi, chất kích thích và hoạt hóa guanylat cyclaza hòa tan, chất chống trầm cảm ba vòng, chất đối kháng thụ thể vasopressin, và kết hợp của chúng. Các ví dụ cụ thể về các chất này được nêu chi tiết ở đây.

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 enzyme chuyển dạng angiotensin, chất ức chế phosphodiesteraza (PDE), chất ức chế renin, chất lợi niệu, hoặc kết 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 được chứa trong dược phẩm. Trong liệu pháp kết hợp, lượng hợp chất 1 được sử dụng, cũng như lượng chất thứ hai, có thể thấp hơn lượng thường được sử dụng trong liệu pháp đơn.

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 chế phẩm riêng rẽ và tách biệt được sử dụng cho bệnh nhân đồng thời hoặc ở các thời điểm riêng biệt. Ví dụ, hợp chất 1 có thể được kết hợp với hoạt chất thứ hai bằng cách sử dụng các quy trình và thiết bị thông thường để tạo ra hỗn hợp của các hoạt chất bao gồm hợp chất 1 và hoạt chất thứ hai. Ngoài ra, các 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 pha

trộn để tạo ra hỗn hợp vật lý. Sau đó hỗn hợp vật lý này được sử dụng với lượng có tác dụng điều trị bằng cách sử dụng đường bất kỳ được mô tả ở đây.

Theo một cách khác, các hoạt chất này có thể vẫn riêng rẽ và tách biệt trước khi sử dụng cho bệnh nhân. Theo phương án này, các chất này không được trộn bằng phương pháp vật lý với nhau trước khi sử dụng nhưng được sử dụng đồng thời hoặc ở các thời điểm riêng biệt dưới dạng chế phẩm riêng biệt. Các chế phẩm này có thể được đóng gói riêng hoặc có thể được đóng gói cùng nhau trong bộ kit. Khi được sử dụng ở các thời điểm riêng biệt, chất thứ hai thường được sử dụng trong khoảng thời gian ngắn hơn 24 giờ sau khi sử dụng hợp chất 1, nằm trong khoảng bất kỳ từ sử dụng đồng thời với hợp chất theo sáng chế đến khoảng 24 giờ sau khi dùng liều. Phương pháp này còn được gọi là sử dụng lần lượt. Vì thế, hợp chất 1 có thể được sử dụng qua đường miệng đồng thời hoặc lần lượt với một hoạt chất khác bằng cách sử dụng hai viên nén, với một viên nén cho mỗi hoạt chất, trong đó lần lượt có thể có nghĩa là được sử dụng ngay sau khi sử dụng hợp chất 1 hoặc ở một số thời điểm được xác định trước sau đó (ví dụ, một giờ sau đó hoặc ba giờ sau đó). Cũng được dự định là chất thứ hai có thể được dùng trong khoảng thời gian ngắn hơn 24 giờ sau khi sử dụng hợp chất 1. Theo một cách khác, sự kết hợp này có thể được sử dụng bằng các đường sử dụng khác nhau, tức là một chất có thể được sử dụng qua đường miệng và chất còn lại được sử dụng bằng cách xông hít.

Theo một phương án, bộ kit chứa dạng liều thứ nhất bao gồm hợp chất 1 và ít nhất một dạng liều bổ sung bao gồm một hoặc nhiều chất thứ hai nêu ở đây, với các lượng đủ để thực hiện các phương pháp theo sáng chế. Dạng liều thứ nhất và dạng liều thứ hai (hoặc thứ ba, v.v.) cùng nhau chứa lượng có tác dụng điều trị của các hoạt chất để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng y tế ở bệnh nhân.

(Các) chất thứ hai, khi được bao gồm, có mặt với lượng có tác dụng điều trị sao cho chúng thường được sử dụng với lượng tạo ra tác dụng có lợi cho việc điều trị khi được dùng đồng thời với hợp chất 1 theo sáng chế. Chất thứ hai có thể ở dạng muối được dùng, solvat, chất đồng phân lập thể tinh khiết quang học, và v.v.. Chất thứ hai cũng có thể ở dạng tiền dược chất, ví dụ, hợp chất có nhóm axit carboxylic đã được este hóa. Vì thế, chất thứ hai được liệt kê ở đây được dự định là bao gồm tất cả các dạng như vậy, và có thể mua được 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 naxifylline, rolofylline, SLV-320, theophylline, và tonapofylline.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể α adrenergic, 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 β_1 adrenergic ("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 suxinat và metoprolol tartrat, moprolol, nadolol, nadoxolol, nebivalol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, perbutolol, pindolol, practolol, pronethalol, propranolol, sotalol, sufinalol, talindol, tertatolol, tilisolol, timolol, toliprolol, xibenolol, và kết hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, chất đối kháng β_1 được chọn từ atenolol, bisoprolol, metoprolol, propranolol, sotalol, và sự kết hợp của chúng. Thông thường, chất phong bế β_1 sẽ được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 2 đến 900mg cho mỗi liều.

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

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất phá vỡ sản phẩm glycat hóa bền vững (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 kết hợp của chúng. Thông thường, chất đối kháng aldosteron được sử dụng với lượng đủ để cung cấp

cấp khoảng từ 5 đến 300mg 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 enzyme chuyển dạng angiotensin (ACE), các ví dụ về chúng bao gồm accupril, alacepril, 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 kết hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, chất ức chế ACE được chọn từ: benazepril, captopril, enalapril, lisinopril, ramipril, và kết hợp của chúng. Thông thường, chất ức chế ACE sẽ được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 1 đến 150mg mỗi ngày.

Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất ức chế enzyme chuyển dạng angiotensin/neprilysin (ACE/NEP) tác động kép, các ví dụ về chúng bao gồm: AVE-0848 (axit (4S,7S,12bR)-7-[3-metyl-2(S)-sulfonylbutyramido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahydropyrido[2,1-a][2]-benzazepin-4-carboxylic); AVE-7688 (ilepatril) và hợp chất gốc của nó; BMS-182657 (axit 2-[2-oxo-3(S)-[3-phenyl-2(S)-sulfonylpropionamido]-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepin-1-yl]axetic); CGS-35601 (N-[1-[4-metyl-2(S)-sulfonylpentanamido]xyclopentyl-cacbonyl]-L-tryptophan); fasidotril; fasidotrilat; enalaprilat; ER-32935 (axit (3R,6S,9aR)-6-[3(S)-metyl-2(S)-sulfonylpentanamido]-5-oxoperhydrothiazolo[3,2-a]azepin-3-carboxylic); gempatrilat; MDL-101264 (axit (4S,7S,12bR)-7-[2(S)-(2-morpholinoaxetylthio)-3-phenylpropionamido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahydropyrido[2,1-a][2]benzazepin-4-carboxylic); MDL-101287 (axit [4S-[4 α ,7 α (R*),12b β]]-7-[2-(carboxymetyl)-3-phenylpropionamido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahydropyrido[2,1-a][2]benzazepin-4-carboxylic); omapatrilat; RB-105 (N-[2(S)-(mercaptometyl)-3(R)-phenylbutyl]-L-alanin); sampatrilat; SA-898 ((2R,4R)-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 sự kết 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 dạng angiotensin 2 (ACE2).

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

Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với các phương pháp điều trị chống tiêu chảy. Các lựa chọn điều trị điển hình bao gồm dung dịch cấp nước qua đường miệng (ORS), loperamit, diphenoxylat, và bismuth subsalixylat.

Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chống bệnh tăng nhãn áp, các ví dụ về chúng bao gồm: chất chủ vận α adrenergic như brimonidin; chất đối kháng thụ thể β_1 adrenergic; chất phong bế β_1 khu trú như betaxolol, levobunolol, và timolol; chất ức chế cacbonic anhydrazaza như acetazolamit, brinzolamit, hoặc dorzolamit; chất chủ vận cholinergic như cevimeline và DMXB-anabaseine; hợp chất epinephrine; chất gây co đồng tử như pilocarpine; và chất tương tự prostaglandin.

Theo một phương án khác, 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 anacetrapib, dalcetrapib, và torcetrapib; statin như atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin và simvastatin; và kết 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 ticlopidine; heparin, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng thụ thể AT₁, cũng được biết đến là chất phong bế thụ thể angiotensin II typ 1 (ARB). Các ARB điển hình bao gồm abitesartan, azilsartan (ví dụ, azilsartan medoxomil), benzylosartan, candesartan, candesartan cilexetil, elisartan, embusartan, enoltasartan, eprosartan, EXP3174, fonsartan, forasartan, glycylosartan, irbesartan, isoteoline, losartan, medoxomil, milfasartan, olmesartan (ví dụ, olmesartan medoxomil), opomisartan, prazosartan, ripisartan, saprisartan, saralasin, sarmesin, TAK-591, tasosartan, telmisartan, valsartan, zolasartan, và kết 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 kết 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 được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 4 đến 600mg cho mỗi liều, với liều hàng ngày lấy làm ví dụ nằm trong khoảng từ 20 đến 320mg 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, cả hai patent đều của Allegretti et al., như hợp chất, axit 4'-{2-etoxy-4-etyl-5-[(S)-2-mercapto-4-metylpentanoylamino)-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 năng như được mô tả trong 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). Được mong đợi là liệu pháp kết hợp này

có thể mang lại lợi ích ngăn ngừa phù mạch hoặc các hậu quả không mong muốn khác khi nồng độ bradykinin tăng.

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, bencyclan, benidipin, bepridil, clentiazem, cilnidipin, cinnarizin, diltiazem, efonidipin, elgodipin, etafenon, felodipin, fendiline, flunarizine, gallopamil, isradipin, lacidipin, lercanidipin, lidoflazin, lomerizin, manidipin, mibefradil, nicardipin, nifedipin, niguldipin, niludipin, nilvadipin, nimodipin, nisoldipin, nitrendipin, nivaldipin, perhexilin, prenylamin, ryosidin, semotiadil, terodilin, tiapamil, verapamil, và kết 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 kết hợp của chúng. Thông thường, chất phong bế kênh canxi được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 2 đến 500mg 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-đioxo-1-phenyl-7-(2-pyridyloxy)}-2-heptyl]axetamit (NK3201).

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất lợi niệu, các ví dụ về chúng bao gồm: chất ức chế cacbonic anhydrase như axetazolamit và diclophenamit; chất lợi niệu quai, bao gồm các dẫn xuất sulfonamit như acetazolamit, ambusit, azosemit, bumetanit, butazolamit, chloraminophenamit, clofenamit, clopamit, clorexolone, disulfamit, ethoxzolamit, furosemit, mefrusit, methazolamit, piretanit, torsemit, tripamit, và xipamit, cũng như chất lợi niệu không phải sulfonamit như axit etacrynic và các hợp chất axit phenoxyaxetic khác như axit tienilic, indacrinon và quincabat; chất lợi niệu thẩm thấu như manitol; chất lợi niệu giữ kali, bao gồm chất đối kháng aldosteron như spironolacton, và chất ức chế kênh Na^+ như amilorit và triamteren; thiazit và chất lợi niệu giống thiazit như althiazit, bendroflumethiazit, benzyhydrochlorothiazit, benzthiazit, buthiazit, clothalidon, clothiazit, xyclopenthiazit, xyclothiazit, epithiazit, ethiazit, fenquizon, flumethiazit, hydrochlorothiazit, hydroflumethiazit, indapamit, metylclothiazit, meticran, metolazon, paraflutizit, polythiazit, quinethazon, teclothiazit, và triclomethiazit; và kết hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, chất lợi niệu được chọn từ amilorit, bumetanit, clothiazit,

clothalidon, diclophenamit, axit etacrylic, furosemit, hydroclothiazit, hydroflumethiazit, indapamit, metylclothiazit, metolazon, torsemit, triamteren, và kết hợp của chúng. Chất lợi niệu này được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 5 đến 50mg mỗi ngày, thông thường hơn là 6 đến 25mg mỗi ngày, với liều phổ biến là 6,25mg, 12,5mg hoặc 25mg 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 kết 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 tác động đến thụ thể endothelin A, như avosentan, ambrisentan, atrasentan, BQ-123, clazosentan, darusentan, sitaxentan, và zibotentan; và chất đối kháng thụ thể endothelin kép tác động đến cả thụ thể endothelin A và B, như bosentan, macitentan, và tezosentan.

Theo một phương án khác, 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 điển hình 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 tái hấp thu monoamin, các ví dụ về chúng bao gồm chất ức chế tái hấp thu norepinephrin như atomoxetin, bupropion và chất chuyển hóa bupropion như hydroxybupropion, maprotilin, reboxetin, và viloxazin; chất ức chế tái hấp thu serotonin chọn lọc (SSRI) như citalopram và chất chuyển hóa citalopram như desmetylcitalopram, dapoxetine, escitalopram (ví dụ, escitalopram oxalat), fluoxetine và chất chuyển hóa fluoxetine desmetyl như norfluoxetine, fluvoxamin (ví dụ, fluvoxamin maleat), paroxetine, sertraline và chất chuyển hóa sertraline như demetylsertraline; chất ức chế tái hấp thu serotonin-norepinephrin kép (SNRI) như bicipradin, duloxetine, milnacipran, nefazodon, và venlafaxin; và kết 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, methocarbamol, và kết 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, cenderitit, và các hợp chất được mô tả trong Ogawa et al (2004) J.Biol.Chem. 279:28625-31. Các hợp chất này còn được gọi là chất chủ vận của thụ thể peptit natri lợi niệu A (NPR-A). Theo một phương án khác, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất đối kháng của thụ thể thải trừ 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 tác dụng 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-(phosphonometylamino)propionamido]propionic); CGS-24592 (axit (S)-3-[3-(biphenyl-4-yl)-2-(phosphonometylamino)propionamido]propionic); CGS-25155 (N-[9(R)-(axetylthiometyl)-10-oxo-1-azaxyclodecan-2(S)-ylcacbonyl]-4(R)-hydroxy-L-prolin benzyl este); các dẫn xuất của axit 3-(1-carbamoylxyclohexyl)propionic được mô tả trong 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-morpholiny)-3-phenyl-2-(sulfanylmetyl)propionamit); SCH-32615 ((S)-N-[N-(1-carboxy-2-phenyletyl)-L-phenylalanyl]-β-alanin) và tiền dược chất của nó SCH-34826 ((S)-N-[N-[1-[(2,2-dimetyl-1,3-dioxolan-4-yl)metoxy]cacbonyl]-2-phenyletyl]-L-phenylalanyl]-β-alanin); sialorphin; SCH-42495 (N-[2(S)-(axetylsulfanylmetyl)-3-(2-metylphenyl)propionyl]-L-methionin etyl este); spinorphin; SQ-28132 (N-[2-(mercaptometyl)-1-oxo-3-phenylpropyl]leuxin); SQ-28603 (N-[2-(mercaptometyl)-1-oxo-3-phenylpropyl]-β-alanin); SQ-29072 (axit 7-[[2-(mercaptometyl)-1-oxo-3-phenylpropyl]amino]heptanoic); thiorphan và tiền dược chất của nó racecadotril; UK-69578 (axit cis-4-[[[1-[2-carboxy-3-(2-metoxymetoxi)propyl]xyclopentyl]cacbonyl]amino] xyclohexancarboxylic); UK-

447,841 (axit 2-{1-[3-(4-clophenyl)propylcarbamoyl]-xyclopentylmetyl}-4-metoxybutyric); UK-505,749 (axit (R)-2-metyl-3-{1-[3-(2-metylbenzothiazol-6-yl)propylcarbamoyl]xyclopentyl}propionic); axit 5-biphenyl-4-yl-4-(3-carboxypropionylamino)-2-metylpentanoic và etyl este của axit 5-biphenyl-4-yl-4-(3-carboxypropionylamino)-2-metylpentanoic (WO 2007/056546); daglutril axit [(3S,2'R)-3-{1-[2'-(etoxycacbonyl)-4'-phenylbutyl]-xyclopentan-1-cacbonylamino}-2,3,4,5-tetrahydro-2-oxo-1H-1-benzazepin-1-axetic] được mô tả trong WO 2007/106708 của Khder et al. (Novartis AG); và kết 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 kết 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)etyl]amino]metylphosphonic), có hoạt tính làm chất ức chế của cả enzym chuyển hóa endothelin (ECE) và của NEP. Các hợp chất ECE/NEP tác động kép cũng có thể được sử dụng. Chất ức chế NEP được sử dụng với lượng đủ để cung cấp khoảng từ 20 đến 800mg mỗi ngày, với liều hàng ngày điển hình nằm trong khoảng từ 50 đến 700mg mỗi ngày, phổ biến hơn là từ 100 đến 600 hoặc 100 đến 300mg mỗi ngày.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất cho nitric 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, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chống viêm phi steroid (NSAID), các ví dụ về chúng bao gồm: acemetacin, axit axetyl salixylic, alclofenac, alminoprofen, amfenac, amipriloza, aloxiprin, aniolac, 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, indometacin, indoprofen, isoxepac, isoxicam, ketoprofen, ketorolac, lofemizol, lornoxicam, meclofenamat, axit meclofenamic, axit mefenamic, meloxicam, mesalamin, miroprofen, 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, zidometacin, zomepirac, và kết hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể, NSAID được chọn từ etodolac, flurbiprofen, ibuprofen, indometacin, ketoprofen, ketorolac, meloxicam, naproxen, oxaprozin, piroxicam, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được dùng kết hợp với chất đối kháng thụ thể N-metyl d-aspartat (NMDA), các ví dụ về chúng bao gồm amantadin, dextrometorphan, dextropropoxyphen, ketamin, ketobemidon, memantin, metadon, 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 thuốc giảm đau opioit). Các chất chủ vận thụ thể opioit điển hình bao gồm: buprenorphin, butorphanol, codein, dihydrocodein, fentanyl, hydrocodon, hydromorphon, levallorphan, levorphanol, meperidin, methadon, morphin, nalbuphin, nalmeferin, nalorphin, naloxon, naltrexon, nalorphin, oxycodon, oxymorphon, pentazocine, propoxyphen, tramadol, và kết hợp của chúng. Theo một số phương án, chất chủ vận thụ thể opioit được chọn từ codein, dihydrocodein, hydrocodon, hydromorphon, morphin, oxycodon, oxymorphon, tramadol, và kết 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 điển hình 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 chất tương tự prostaglandin (còn được gọi là prostanoit hoặc chất tương tự prostacyclin). Các chất tương tự prostaglandin điển hình bao gồm beraprost natri, bimatoprost, epoprostenol, iloprost, latanoprost, tafluprost, travoprost, và treprostinil, với bimatoprost, latanoprost, và tafluprost được đặc biệt quan tâm.

Theo một phương án khác, 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 kết hợp của chúng.

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

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

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 carbamazepin, fosphenytoin, lamotrigine, lidocaine, mexiletin, oxcarbazepin, phenytoin, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất kích thích hoặc chất hoạt hóa guanylat xyclaza hòa tan, các ví dụ về chúng bao gồm ataciguat, riociguat, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án, hợp chất 1 được sử dụng kết hợp với chất chống trầm cảm ba vòng (TCA), các ví dụ về chúng bao gồm amitriptylin, amitriptylinoxit, butriptylin, clomipramine, demexiptilin, desipramine, dibenzepin, dimetacrin, dosulepin, doxepin, imipramine, imipraminoxit, lofepramine, melitracen, metapramine, nitroxazepin, nortriptylin, noxiptilin, pipofezin, propizepin, protriptylin, quinupramine, và kết hợp của chúng.

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

Dược chất thứ hai được kết hợp cũng có thể hữu dụng 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 chất lợi niệu và ARB, hoặc chất phong bế kênh canxi và ARB, hoặc chất lợi niệu và chất ức chế ACE, hoặc chất phong bế kênh canxi và statin. Các ví dụ cụ thể bao gồm, sự kết hợp của chất ức chế ACE enalapril (ở dạng muối maleat) và hydrochlorothiazit lợi niệu, được bán với nhãn hiệu Vaseretic[®], hoặc kết hợp của chất phong bế kênh canxi amlodipin (ở dạng muối besylat) và ARB olmesartan (ở dạng tiền dược chất medoxamil), hoặc kết hợp của chất phong bế kênh canxi và statin, tất cả các

chất này cũng có thể được sử dụng với hợp chất 1. Các dược chất khác như chất chủ vận thụ thể α_2 adrenergic và chất đối kháng thụ thể vasopressin cũng có thể hữu dụng trong liệu pháp kết hợp. Các chất chủ vận thụ thể α_2 adrenergic lấy làm ví dụ bao gồm clonidin, dexmedetomidin, và guanfacin.

Các chế phẩm sau minh họa được phẩm điển hình theo sáng chế.

Viên nang gelatin cứng lấy làm ví dụ để sử dụng bằng đường miệng

Hợp chất theo sáng chế (50g), 440g lactoza đã sấy phun và 10g magie stearat được trộn kỹ. Sau đó, chế phẩm thu được được nạp vào viên nang gelatin cứng (500mg chế phẩm trong mỗi viên nang). Theo một cách khác, hợp chất 1 (20mg) được trộn kỹ với tinh bột (89mg), xenluloza vi tinh thể (89mg) và magie stearat (2mg). Sau đó hỗn hợp này được cho đi qua rây U.S mắt lưới số 45 và được nạp vào viên nang gelatin cứng (200mg chế phẩm trong mỗi viên nang).

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

Chế phẩm viên nang gelatin lấy làm ví dụ để sử dụng bằng đường miệng

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

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

Viên nang hydroxypropyl metylxenluloza (HPMC) lấy làm ví dụ để sử dụng qua đường miệng

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

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

Hợp chất 1 (10mg), tinh bột (45mg) và xenluloza vi tinh thể (35mg) được cho đi qua rây U.S mắt lưới số 20 và được trộn kỹ. Cốm được tạo ra như vậy được làm khô ở nhiệt độ từ 50 đến 60°C và được cho đi qua rây U.S mắt lưới số 16. Dung dịch chứa polyvinylpyrrolidon (4mg dưới dạng dung dịch 10% trong nước vô khuẩn) được trộn với tinh bột natri carboxymetyl (4,5mg), magie stearat (0,5mg), và bột talc (1mg), và hỗn hợp này sau đó được cho đi qua rây U.S mắt lưới số 16. Tinh bột natri carboxymetyl, magie stearat và bột talc sau đó được bổ sung vào cốm. Sau khi trộn, hỗn hợp được nén trên máy dập viên để thu được viên nén có khối lượng 100mg.

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

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

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

Chế phẩm hỗn dịch lấy làm ví dụ để sử dụng qua đường miệng

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

Thành phần	Lượng
Hợp chất 1	1,0g
Axit fumaric	0,5g
Natri clorua	2,0g
Metyl paraben	0,15g

Thành phần	Lượng
Propyl paraben	0,05g
Đường được tạo hạt	25,5g
Sorbitol (dung dịch 70%)	12,85g
Veegum [®] K (magie nhôm silicat)	1,0g
Chất tạo hương vị	0,035mL
Chất tạo màu	0,5mg
Nước cất	Vừa đủ đến 100mL

Chế phẩm lỏng lấy làm ví dụ để sử dụng qua đường miệng

Chế phẩm lỏng thích hợp là chế phẩm có chất đệm gốc axit carboxylic như dung dịch đệm xitrat, lactat và maleat. Ví dụ, hợp chất 1 (có thể được trộn trước với DMSO) được trộn với chất đệm amoni xitrat 100mM và độ pH được điều chỉnh đến độ pH = 5, hoặc được trộn với dung dịch axit xitric 100mM và độ pH được điều chỉnh đến độ pH = 2. Dung dịch này cũng có thể bao gồm tá dược hòa tan như xyclodextrin, ví dụ, dung dịch này có thể chứa hydroxypropyl- β -cyclodextrin 10% khối lượng.

Các chế phẩm thích hợp khác bao gồm dung dịch NaHCO₃ 5%, có hoặc không có xyclodextrin.

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

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

Các chế phẩm sau minh họa được phẩm điển hình theo sáng chế.

Chế phẩm Ví dụ A

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

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

Quy trình điển hình: các tá dược, nếu có, được hòa tan trong khoảng 80% nước dùng để tiêm và hoạt chất 1 hoặc 1' được bổ sung và hòa tan. Độ pH được điều chỉnh bằng natri hydroxit 1M đến độ pH bằng từ 3 đến 4,5 và sau đó thể tích được điều chỉnh đến 95% thể tích cuối cùng bằng 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 bằng nước dùng để tiêm. Sau đó chế phẩm được lọc vô khuẩn qua thiết bị lọc 0,22 micron và được đặt vào lọ vô khuẩn trong điều kiện vô trùng. Lọ này được đậy nắp, dán nhãn và bảo quản đông lạnh.

Chế phẩm Ví dụ B

Bột đã đông khô hoặc chất rắn kết tinh thích hợp để bào chế dung dịch tiêm được điều chế như sau:

Thành phần	Lượng
Hoạt chất 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 điển hình: các tá dược và/hoặc chất đệm, nếu có, được hòa tan trong khoảng 60% nước dùng để tiêm. Hoạt chất 1 hoặc 1' được bổ sung và hòa tan và độ pH được điều chỉnh bằng natri hydroxit 1M đến độ pH bằng từ 3 đến 4,5 và thể tích được

điều chỉnh đến 95% thể tích cuối cùng bằng 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 bằng nước dùng để tiêm. Sau đó chế phẩm được lọc vô khuẩn qua thiết bị lọc 0,22 micron và được đặt vào lọ vô khuẩn trong điều kiện vô trùng. Sau đó chế phẩm được làm đông khô bằng cách sử dụng chu kỳ làm đông khô thích hợp. Lọ này được đậy nắp (tùy ý trong môi trường chân không một phần hoặc nitơ khô), dán nhãn và bảo quản trong tủ lạnh.

Chế phẩm Ví dụ C

Dung dịch tiêm để sử dụng trong tĩnh mạch cho bệnh nhân được điều chế từ Chế phẩm Ví dụ B trên đây như sau:

Quy trình điển hình: bột đã đông khô của Chế phẩm Ví dụ B (ví dụ, chứa hoạt chất 1 hoặc 1' với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1000mg) được hoàn nguyên bằng 20mL nước vô khuẩn và dung dịch thu được được pha loãng thêm với 80mL nước muối vô khuẩn trong túi truyền dịch 100mL. Sau đó dung dịch đã pha loãng này được sử dụng cho bệnh nhân trong tĩnh mạch trong thời gian từ 30 đến 120 phút.

Chế phẩm lấy làm ví dụ để sử dụng bằng cách xông hít

Hợp chất 1 (0,2mg) được micron hóa và sau đó được trộn với lactoza (25mg). Sau đó, hỗn hợp đã trộn này được nạp vào bình xông hít gelatin. Các thành phần của bình chứa này được sử dụng bằng cách sử dụng, ví dụ, thiết bị xông hít bột khô.

Theo cách khác, hợp chất 1 đã được micron hóa (10g) được phân tán trong dung dịch được điều chế bằng cách hòa tan lexithin (0,2g) trong nước đã khử khoáng (200mL). Hỗn dịch thu được 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 1,5µm. Sau đó, chế phẩm đã micron hóa được nạp vào bình chứa của bình xông hít định liều chứa 1,1,1,2-tetrafloetan được nén với lượng đủ để cung cấp khoảng 10µg đến khoảng 500µg hợp chất theo sáng chế trong mỗi liều khi được sử dụng bằng bình xông hít.

Theo cách khác, hợp chất 1 (25mg) được hòa tan trong nước muối đẳng trương (125mL) được đệm xitrat (độ pH = 5). Hỗn hợp này được khuấy và nghiền 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 nước NaOH 1N.

Dung dịch này được sử dụng bằng cách sử dụng thiết bị khí dung cung cấp khoảng từ 10µg đến khoảng 500µg hợp chất 1 trong mỗi liều.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các quy trình điều chế và các ví dụ sau được nêu để minh họa các phương án cụ thể theo sáng chế. Tuy nhiên, các phương án cụ thể này không được dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ trừ khi được chỉ ra một cách cụ thể.

Các chữ viết tắt sau đây có nghĩa như sau trừ khi được quy định khác và chữ viết tắt khác bất kỳ được sử dụng ở đây và không được định nghĩa có nghĩa chuẩn và được chấp nhận thông thường của chúng:

AcOH	axit axetic
BOC	t-butoxycarbonyl (-C(O)OC(CH ₃) ₃)
(BOC) ₂ O	di-t-butyl dicacbonat
Bn	benzyl
CPME	cyclopentyl methyl ete
DCC	1,3-diisyclohexylcarbodiimide
DCM	diclometan hoặc metylen clorua
DIPE	diisopropyl ete
DIPEA	N,N-diisopropyletylamin
DMAP	4-dimetylamino pyridin
DMF	N,N-dimetylformamit
Et ₃ N	trietylamin
EtOH	etanol
Et ₂ O	dietyl ete
EtOAc	etyl axetat
MeCN	axetonitril
NaHMDS	natri bis(trimetylsilyl)amit
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0)

PE	ete dầu hỏa
SilicaCat [®] DPP-Pd	chất xúc tác diphenylphosphin paladi (II) gốc silic dioxit
TFA	axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran

Trừ khi được quy định theo cách khác, tất cả các nguyên liệu, như chất phản ứng, nguyên liệu ban đầu và dung môi, đều được mua từ các nhà cung cấp thương mại (như Sigma-Aldrich, Fluka Riedel-de Haën, và nhà cung cấp tương tự) và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Các phản ứng được tiến hành trong môi trường nitơ, trừ khi được quy định theo cách khác. Quy trình phản ứng được theo dõi bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký lỏng phân tích hiệu năng cao (anal. HPLC), và phương pháp đo phổ khối, các kỹ thuật này được nêu chi tiết trong các ví dụ cụ thể. Thông thường, các dung môi được sử dụng trong HPLC phân tích là như sau: dung môi A là 98% H₂O/2% MeCN/1,0mL/L TFA; dung môi B là 90% MeCN/10% H₂O/1,0mL/L TFA.

Các phản ứng diễn ra như được mô tả cụ thể trong mỗi quy trình điều chế; nhìn chung, các hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách chiết và các phương pháp tinh chế khác như kết tinh phụ thuộc vào nhiệt độ, và dung môi, và kết tủa. Ngoài ra, các hỗn hợp phản ứng thường được tinh chế bằng HPLC điều chế, thường sử dụng gói cột Microsorb C18 và Microsorb BDS và các chất rửa giải thông thường. Diễn biến phản ứng thường được xác định bằng kỹ thuật đo phổ khối-sắc ký lỏng (LCMS). Việc phân tích các chất đồng phân được thực hiện bằng phổ hiệu ứng Overhauser hạt nhân (NOE). Việc phân tích các sản phẩm phản ứng thường được tiến hành bằng cách đo phổ khối và phổ ¹H-NMR. Để đo NMR, các mẫu được hòa tan trong dung môi được đơteri hóa (CD₃OD, CDCl₃, hoặc DMSO-d₆), và thu được phổ ¹H-NMR bằng thiết bị Varian Gemini 2000 (400 MHz) trong các điều kiện quan sát tiêu chuẩn. Việc phát hiện bằng đo phổ khối các hợp chất thường được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp ion hóa tia điện (ESMS) với thiết bị Applied Biosystems mẫu API 150 EX (Foster City, CA) hoặc thiết bị mẫu 1200 LC/MSD (Palo Alto, CA).

Kỹ thuật đo

Nhiều xạ bột tia X

Phân tích nhiễu xạ bột tia X được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễu xạ kế tia X Bruker D8-Advance. Nguồn tia X là bức xạ Cu-K α với điện áp ra bằng 40kV và dòng điện 40mA. Thiết bị này được vận hành trong hệ thống hình học Bragg-Brentano và sử dụng gương Goebel để thu được chùm tia X song song. Sự phân kỳ bất kỳ trong chùm này được giới hạn bởi khe phân kỳ dọc 0,2° ở nguồn và các khe Soller (2,5°) ở nguồn và thiết bị dò. Để đo, một lượng bột nhỏ (5-25mg) được ép nhẹ lên trên thiết bị giữ mẫu silicon nền bằng không để tạo ra bề mặt trơn nhẵn và được cho tiếp xúc với tia X. Các mẫu được quét theo kiểu θ -2 θ kết hợp từ 2° đến 35° ở góc 2 θ với kích thước bước bằng 0,02° và tốc độ quét bằng 0,3 giây trong mỗi bước. Số liệu thu được được kiểm soát bằng phần mềm Bruker DiffracSuite và được phân tích bằng phần mềm Jade (phiên bản 7.5.1). Thiết bị nêu trên được hiệu chuẩn bằng chuẩn corundum, trong khoảng $\pm 0,02^\circ$ góc 2 θ .

Nên nhớ rằng, hình học Bragg-Brentano được sử dụng trong khi thu thập số liệu thiên về hướng được ưu tiên. Trong các điều kiện này có thể là các cường độ tương đối của các đỉnh nhiễu xạ có thể không thể hiện cường độ tương đối đúng mà thu được từ quá trình phân bố lý tưởng của các hạt hình cầu hoặc từ mẫu nhiễu xạ được mô phỏng từ số liệu tinh thể đơn lẻ. Cũng có thể là một số đỉnh không được nhìn thấy trong một số mẫu nhiễu xạ do hướng được ưu tiên rộng.

Phân tích nhiệt quét vi sai

Phép đo DSC được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị TA mô đun mẫu Q-100 với thiết bị kiểm soát phân tích nhiệt. Dữ liệu được thu thập và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích chung trong thiết bị TA. Mẫu được cân chính xác vào chảo nhôm được phủ. Sau thời gian 5 phút cân bằng đẳng nhiệt ở nhiệt độ 5°C, mẫu này được gia nhiệt bằng cách sử dụng dốc gia nhiệt tuyến tính 10°C/phút từ 0°C lên đến 275°C.

Phân tích nhiệt trọng

Phép đo TGA được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị TA mô đun mẫu Q-500 được trang bị với khả năng phân giải cao. Dữ liệu được thu thập bằng cách sử dụng thiết bị kiểm soát phân tích nhiệt của thiết bị TA và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích chung trong thiết bị TA. Mẫu đã cân được đặt lên trên chảo

platin và được quét với tốc độ gia nhiệt 10°C từ nhiệt độ môi trường đến 200°C. Buồng cân bằng và buồng đốt được thổi dòng khí nitơ trong khi sử dụng.

Hiện vi ánh sáng phân cực

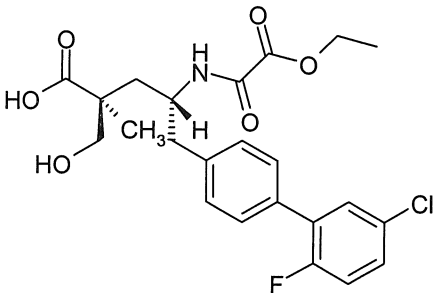
Đối với các nghiên cứu hiện vi ánh sáng phân cực (PLM), các mẫu được kiểm tra dưới kính hiển vi quang học (Olympus BX51) có thiết bị lọc ánh sáng phân cực ngang. Các ảnh chụp được thu thập bằng camera PaxCam được điều khiển bằng phần mềm chụp ảnh PaxIt (phiên bản 6.4). Mẫu được chuẩn bị trên các phiến kính có dầu khoáng nhẹ làm môi trường nhúng. Phụ thuộc vào kích cỡ hạt, vật kính 4x, 10x hoặc 20x được sử dụng để phóng đại.

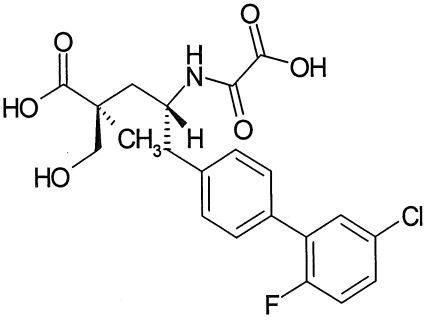
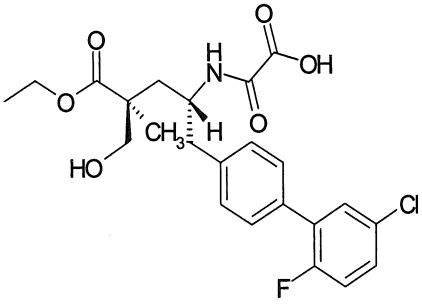
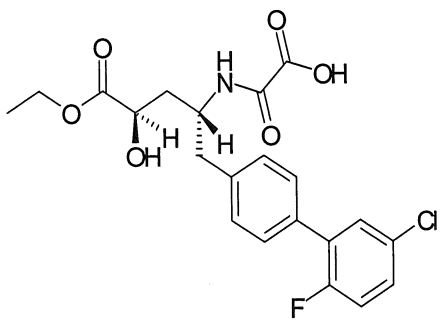
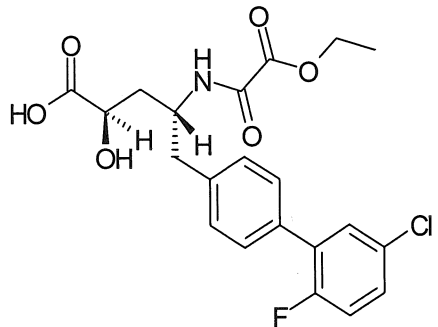
Đánh giá độ hấp thụ hơi ẩm động lực

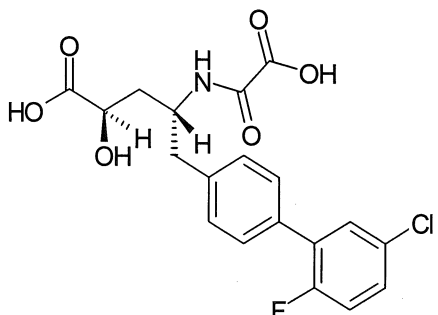
Phép đo DMS được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống SGA-100 vi cân bằng khí quyển VTI (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Mẫu đã cân được sử dụng và độ ẩm là giá trị thấp nhất có thể (độ ẩm tương đối gần như bằng 0%) khi bắt đầu phân tích. Phân tích DMS bao gồm tốc độ quét là độ ẩm tương đối 5%/bước trong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

Quy trình tổng hợp và ví dụ so sánh

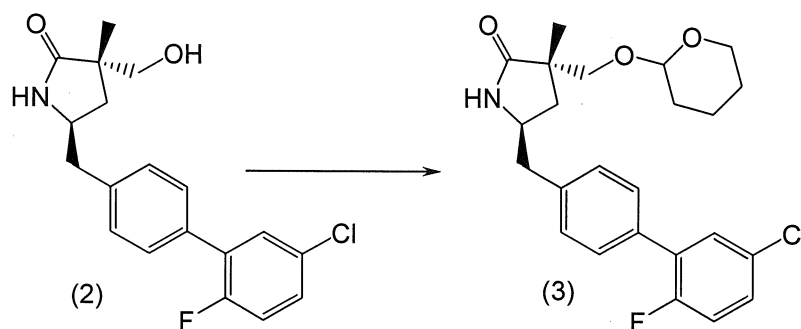
Các hợp chất sau được tổng hợp và đánh giá về hoạt tính ức chế enzym NEP:

Tên hợp chất	Tên gọi chung	Chế phẩm/ Ví dụ	Cấu trúc
Hợp chất 1	Hợp chất	Chế phẩm 1/ Ví dụ 1	

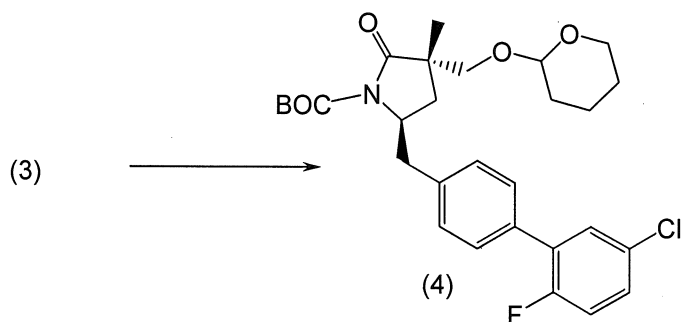
Tên hợp chất	Tên gọi chung	Chế phẩm/ Ví dụ	Cấu trúc
Hợp chất so sánh C2	Chất chuyển hóa có hoạt tính	Chế phẩm 2/ Ví dụ 2	
Hợp chất so sánh C3	Hợp chất hoặc tiền dược chất	Chế phẩm 3 và 4/ Ví dụ 3	
Hợp chất so sánh C4	Hợp chất hoặc tiền dược chất	Chế phẩm 5, 6, 7, và 8/ Ví dụ 4	
Hợp chất so sánh C5	Hợp chất hoặc tiền dược chất	Chế phẩm 9/ Ví dụ 5	

Tên hợp chất	Tên gọi chung	Chế phẩm/ Ví dụ	Cấu trúc
Hợp chất so sánh C6	Chất chuyển hóa có hoạt tính	Ví dụ 6	

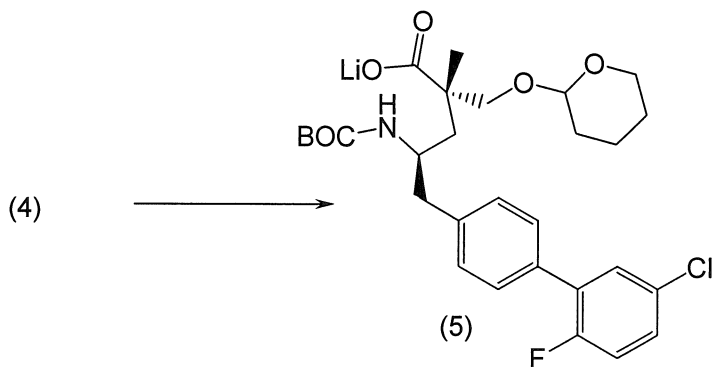
Quy trình điều chế 1: Benzyl este của axit (2S,4R)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-methylpentanoic (Hợp chất 7)



(3S,5R)-5-(5'-clo-2'-flo-biphenyl-4-ylmetyl)-3-hydroxymetyl-3-metyl-pyrrolidin-2-on (2) (201,0g, 578mmol) được kết hợp với DCM (4020mL) để thu được dung dịch trong suốt màu nâu đồng nhất mà sau đó được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C trong khi khuấy. Bổ sung 3,4-dihydro-2H-pyran (118 mL, 1,3mol) và axit 4-metylbenzensulfonic (34,8g, 202mmol) vào và gia nhiệt hỗn hợp đến nhiệt độ 18,5°C trong 2 giờ, sau đó khuấy ở nhiệt độ 18,5°C qua đêm (chuyển hóa >98%). Dừng phản ứng bằng dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa, và để cho tách pha. Làm khô lớp hữu cơ bằng Na₂SO₄, sau đó lọc, sau đó loại bỏ dung môi để thu được sản phẩm thô đặc có màu nâu sẫm (~300g) mà được hòa tan trong DIPE (2L) và khuấy ở nhiệt độ 5°C qua đêm để thu được huyền phù đặc màu trắng. Lọc huyền phù đặc này, và làm khô các chất rắn trong 2 ngày để thu được hợp chất 3 (113,8g). Làm khô dịch lọc để thu được dầu đặc mà được hòa tan trong DIPE (~100mL) và khuấy qua đêm ở nhiệt độ 5°C để tách hợp chất bổ sung 3 (tổng lượng thu được 225g).

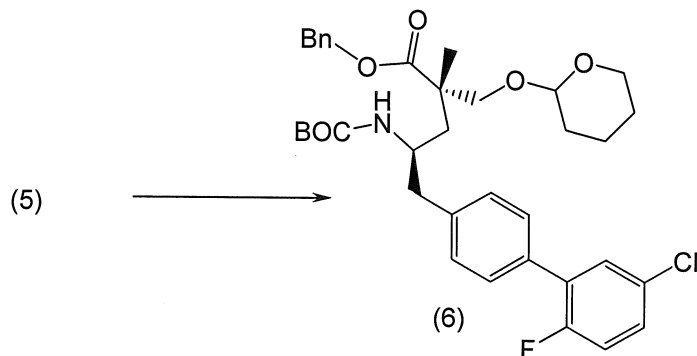


Hòa tan hợp chất 3 (208g, 482mmol) trong THF (1912mL, 23mol) đồng thời khuấy để thu được dung dịch trong đồng nhất. Hỗn hợp được sục bằng nitơ và sau đó làm lạnh đến nhiệt độ -10°C . Bổ sung từng giọt NaHMDS 1M trong THF (539mL, 539mmol) vào và khuấy hỗn hợp trong thời gian 30 phút. Bổ sung từng giọt di-t-butyl dicacbonat (131g, 602mmol) đã hòa tan trong THF (393mL, 4,8mol) vào và khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ phòng qua đêm. Dừng phản ứng bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (5,0L) và bổ sung EtOAc (3,1L) vào. Tách các pha và rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (5,0L). Tách các pha và làm khô lớp hữu cơ trên MgSO_4 . Loại bỏ dung môi để thu được dầu đặc mà khi làm khô thêm nữa trong hai ngày thu được hợp chất 4 (265g) dưới dạng chất rắn có bột trên bề mặt.

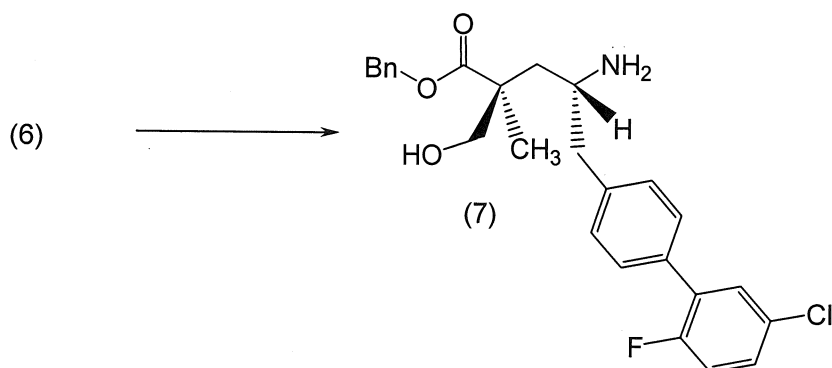


Hòa tan hợp chất 4 (265g, 498mmol) trong THF (1,7L) để thu được dung dịch trong đồng nhất có màu nâu nhạt. Bổ sung LiOH 1,0M trong nước (1,5L, 1,5mol) vào và khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Phản ứng là hoàn toàn sau 6 giờ nhưng vẫn khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 15°C qua đêm. Bổ sung EtOAc (1,7L) vào, và rửa hỗn hợp bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (1,7L) và tách các pha. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước NaCl bão hòa, tách, làm khô trên Na_2SO_4 , sau đó lọc và làm khô để thu được hợp chất 5 (300g) dưới dạng chất rắn màu trắng đục đến màu

vàng có bột trên bề mặt (phần dư là do EtOAc còn lại).

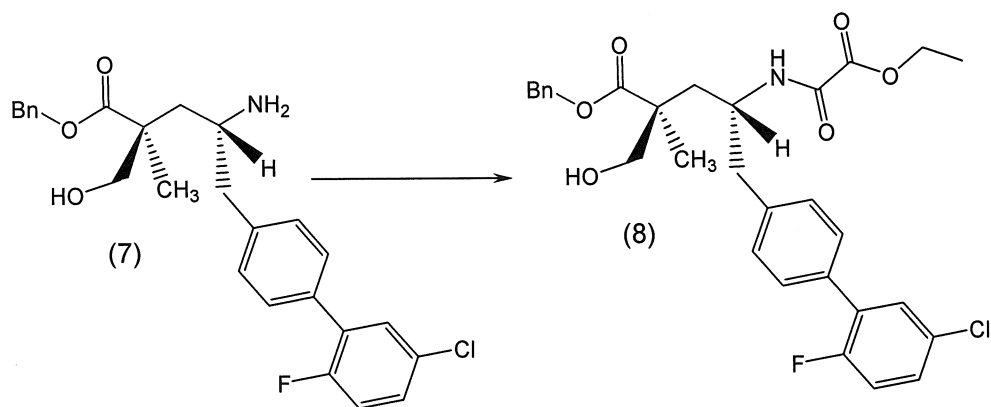


Hòa tan hợp chất 5 (277,0g, 498mmol) trong DMF (970mL) để thu được dung dịch không màu. Bổ sung K_2CO_3 (103g, 747mmol) vào và khuấy hỗn hợp tạo thành trong 15 phút. Bổ sung benzyl bromua (71,1mL, 598mmol) trong một phần vào và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng qua đêm; quá trình chuyển hóa hoàn toàn sau 20 giờ. Bổ sung NH_4Cl (6L) và EtOAc (1L) vào và tách các pha. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (6L), và làm khô trên Na_2SO_4 , sau đó loại bỏ dung môi để thu được hợp chất thô 6 (335g), được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

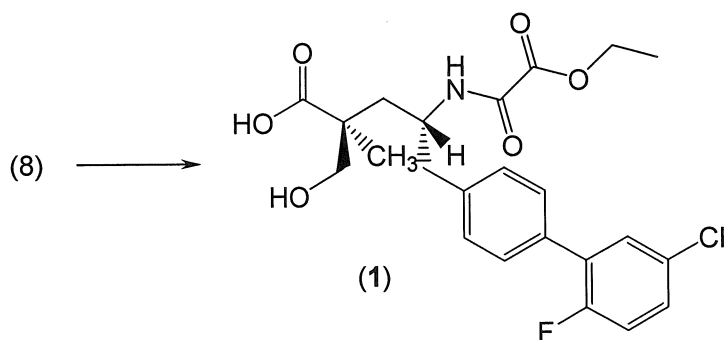


Kết hợp HCl 3M (1,7L, 5,0mol) trong CPME với hợp chất 6 (319,0g, 498mmol), và khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, thu được huyền phù đặc (chuyển hóa >99%). Bổ sung thêm CPME (1,0L) vào và khuấy huyền phù đặc thu được trong 1 giờ. Lọc hỗn hợp và rửa bánh ướt bằng CPME (500mL). Lọc và làm khô Hợp chất 7 thu được (190g) thành bánh màu trắng.

Ví dụ 1: Axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxy methyl-2-metylpentanoic (Hợp chất 1)

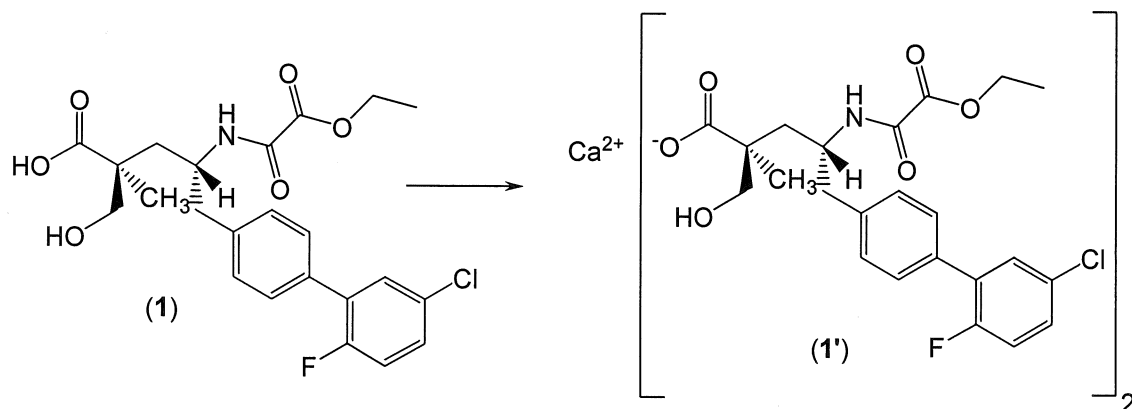


Hòa tan EtOH (576 μ L, 9,9mmol) trong DCM (3mL). Bổ sung oxalyl clorua (1,0mL, 12,1mmol) vào, và khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Làm bay hơi dung môi mà không gia nhiệt, thu được dung dịch mà được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo. Hòa tan benzyl este của axit (2S,4R)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-methylpentanoic (7) (1,0g, 2,2mmol) trong DCM (3mL). Bổ sung dung dịch thu được trước đó vào, sau đó bổ sung DIPEA (958 μ L, 5,5mmol). Khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, tại thời điểm đó LC/MS cho thấy khối lượng của sản phẩm mong muốn. Loại bỏ dung môi trong chân không và tinh chế phân cận thô bằng sắc ký pha thường (20-95% EtOAc/hexan) để thu được hợp chất 8 (1,0g, 1,9mmol) được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.



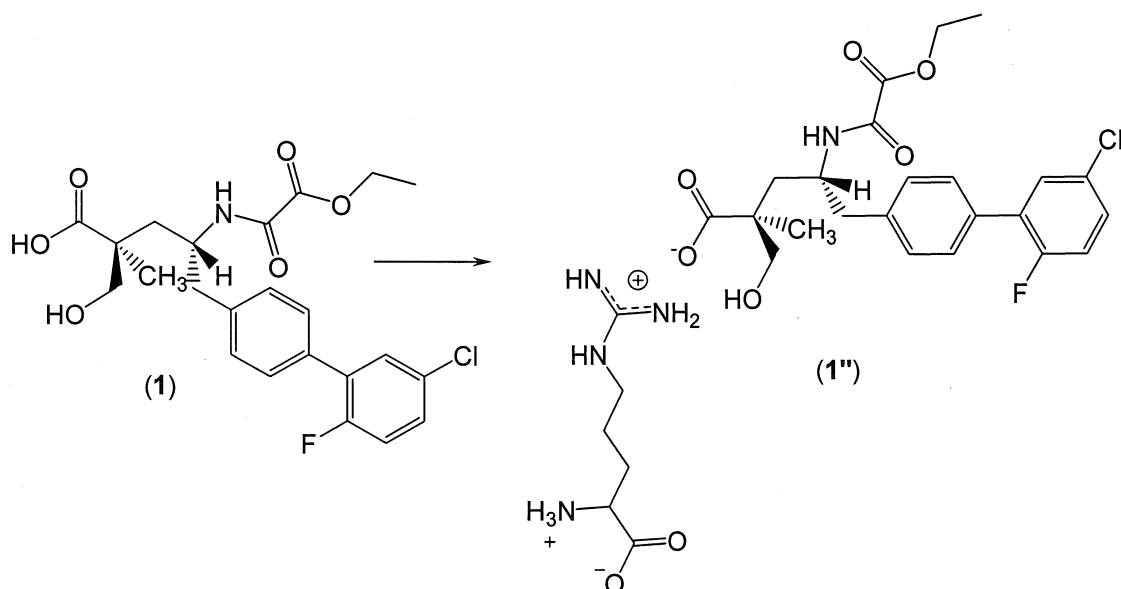
Kết hợp hợp chất 8 (1,0g, 1,9mmol) với paladi 10% khối lượng trên cacbon (350mg, 185 μ mol), AcOH (5mL) và EtOAc (5mL). Đặt hỗn hợp trong môi trường hydro và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, tại thời điểm đó LC/MS cho thấy sự hoàn thành quá trình khử bảo vệ benzyl. Lọc sạch paladi bằng cách sử dụng thiết bị lọc 0,2 μ m PTFE Acrodisc CR và loại bỏ dung môi trong chân không. Tinh chế phân cận thô bằng sắc ký pha đảo để thu được hợp chất 1 (400mg). MS m/z $[M+H]^+$ được tính toán cho $C_{23}H_{25}ClFNO_6$, 466,14; được phát hiện 466.

Hợp chất ở dạng tinh thể canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (Hợp chất 1')



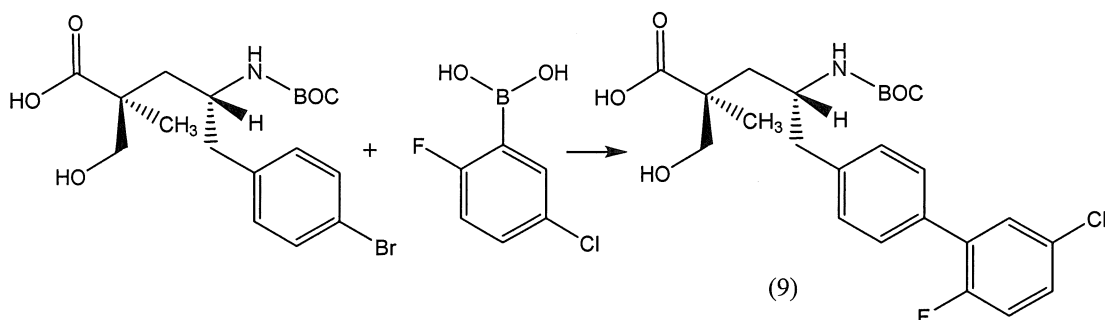
Hòa tan hợp chất 1 (30g, 64,4mmol) trong 200-proof EtOH (100mL) và sau đó bổ sung DIPEA (11,25mL, 64,4mmol) vào hỗn hợp này ở nhiệt độ phòng. Hòa tan canxi triflometan sulfonat (10,89g, 32,2mmol) trong EtOH (20mL) và bổ sung từng giọt vào hỗn hợp chứa hợp chất 1 để tạo ra huyền phù đặc dày trong khoảng thời gian xấp xỉ 1 giờ. Sau đó, khuấy huyền phù đặc dày này ở nhiệt độ phòng trong hai ngày. Lọc từ từ huyền phù đặc thu được này và làm khô trong hai ngày để thu được 33g hợp chất 1' tinh khiết > 99%. Thực hiện quy trình tái tạo huyền phù đặc thứ hai bằng cách trước tiên làm lạnh hợp chất 1' (33g, 19,80mmol) xuống nhiệt độ 5°C. Sau đó, bổ sung hỗn hợp EtOH:nước (7:3) lạnh (300mL) vào và khuấy mạnh huyền phù đặc thu được trong 4 ngày. Sau đó lọc từ từ huyền phù đặc và làm khô trong 24 giờ đồng thời khử vón cục liên tục. Sau đó, làm khô huyền phù đặc trong không khí ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ nữa để thu được 29,5g chất rắn tinh khiết >99% của hợp chất 1'. Sản phẩm này được phân tích bằng PXRD, DSC và TGA, như được mô tả trong bản mô tả này, và dữ liệu tạo ra được trình bày trên Fig.1-3.

Hợp chất ở dạng tinh thể L-arginin (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (Hợp chất 1'')

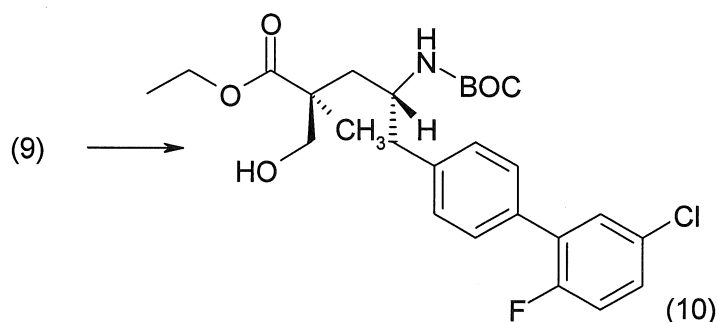


Hòa tan hợp chất 1 (181,6mg) trong 200-proof EtOH (0,5mL) trong lọ thủy tinh để thu được dung dịch trong. Làm lạnh dung dịch ở nhiệt độ -20°C trong khoảng 10 phút. Trong lọ thủy tinh riêng, hòa tan L-arginin (68mg) trong 0,2mL nước và làm lạnh dung dịch ở nhiệt độ 5°C trong khoảng 10 phút. Chuyển từ từ dung dịch trong chứa hợp chất 1 sang dung dịch L-arginin. Bổ sung thêm 0,2mL 200-proof EtOH vào lọ trước đó chứa hợp chất 1 và các thành phần được bổ sung thêm vào lọ chứa dung dịch L-arginin. Bổ sung mầm tinh thể L-arginin thu được từ phản ứng trước đó bằng cách sử dụng quy trình tương tự vừa được mô tả vào dung dịch đã kết hợp và giữ toàn bộ hỗn hợp ở nhiệt độ 5°C có khuấy nhẹ để thu được hỗn dịch kết tinh trong thời gian từ 1 đến 2 ngày. Lọc các tinh thể của hợp chất 1'' và phân tích bằng PXRD, DSC và TGA, như được mô tả trong bản mô tả này, và dữ liệu tạo ra được trình bày trên Fig.6-8.

Quy trình điều chế 2: Ethyl este của axit (2S,4R)-4-t-butoxycarbonylamino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic (Hợp chất 10)

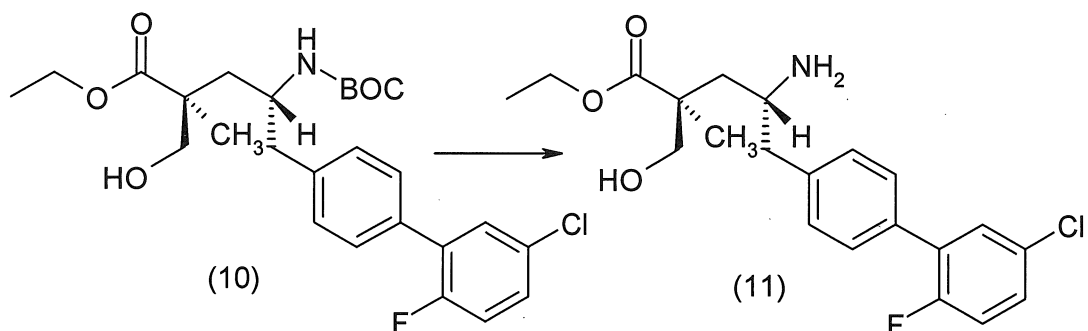


Kết hợp axit (2S,4R)-5-(4-bromophenyl)-4-t-butoxycarbonylamino-2-hydroxymethyl-2-methylpentanoic (1,3g, 3,1mmol) với Na_2CO_3 (993mg, 9,4mmol), nước (0,2mL) và dioxan (1,5mL). Bình phản ứng được đậy nắp, sục, và đặt trong môi trường nitơ. Bổ sung nhanh $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (541mg, 468 μmol) vào và sục bình một lần nữa. Gia nhiệt hỗn hợp trong 45 phút ở nhiệt độ 90°C , tại thời điểm đó LCMS cho thấy phản ứng hoàn toàn. Axit hóa lớp hữu cơ bằng 1N HCl/nước đến độ pH ~ 4 và chiết bằng EtOAc. Tách lớp hữu cơ, rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hòa và làm khô trên Mg_2SO_4 . Loại bỏ dung môi trong chân không và tinh chế phần cặn thô bằng sắc ký pha đảo để thu được hợp chất 9.



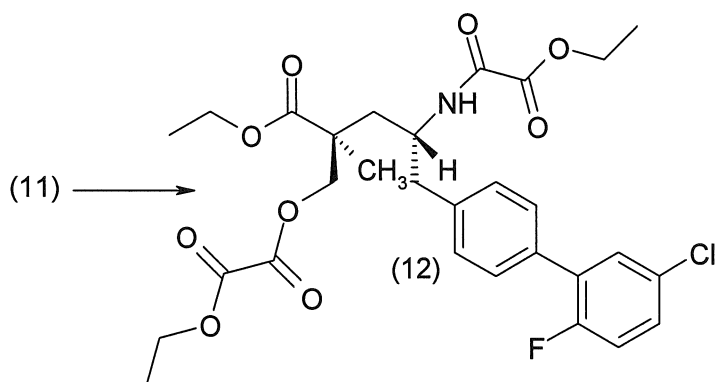
Hòa tan hợp chất 9 (1,0g, 2,1mmol) trong EtOH (4mL) và HCl 4N trong dioxan (4mL) và khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ 60°C . Làm bay hơi các dung môi và hòa tan phần cặn thô trong DCM. Bổ sung $(\text{BOC})_2\text{O}$ (472 μL , 2,031mmol) và Et_3N (566 μL , 4,1mmol) sau đó là DMAP (5mg) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 3 giờ. Cặn được làm bay hơi và nghiền với DCM và được lọc mà không tinh chế thêm để thu được hợp chất 10 (800mg).

Ví dụ 2: Axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymethyl-2-metyl-4-(oxalylamino)pentanoic (Hợp chất so sánh C2)

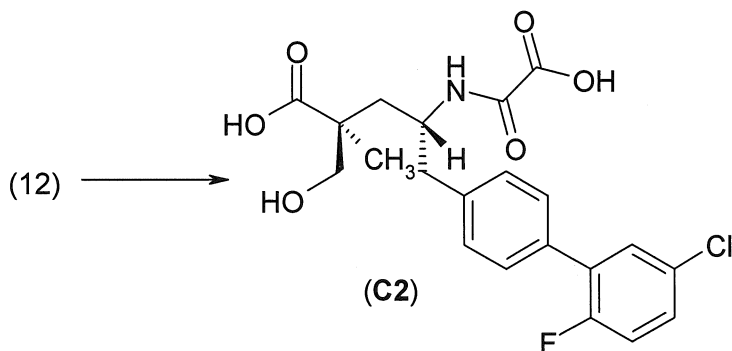


Kết hợp etyl este của axit (2S,4R)-4-t-butoxycarbonylamino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymethyl-2-methylpentanoic (10) (2,6g, 5,3mmol) với MeCN

(5mL) và HCl 4N trong dioxan (4mL) và khuấy trong 15 phút. Loại bỏ dung môi bằng cách bay hơi ly tâm để thu được hợp chất 11, được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.



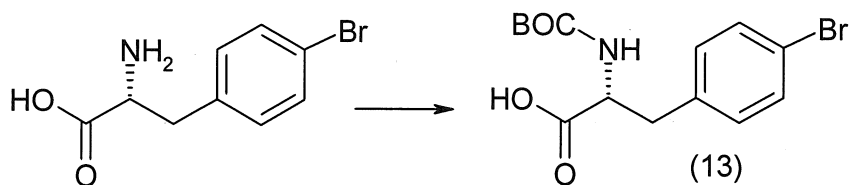
Hợp chất thô 11 (2,1g, 5,3mmol) trong DCM (10mL) được bổ sung ethyl 2-chloro-2-oxoacetat (1,3mL, 11,7mmol), sau đó bổ sung từ từ Et₃N (2,6mL, 18,7mmol) vào. Khuấy hỗn hợp tạo thành trong 15 phút và theo dõi phản ứng đến khi hoàn toàn. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký nhanh (0-100% EtOAc/hexan) để thu được hợp chất 12, được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.



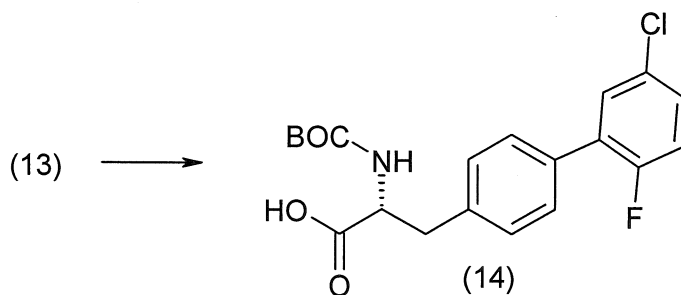
Kết hợp hợp chất 12 (2,2g, 3,7mmol) với THF (5mL) và NaOH (3,7mL, 37,0mmol), sau đó bổ sung nước (10mL) vào. Khuấy hỗn hợp tạo thành qua đêm. Làm bay hơi dung môi, bổ sung AcOH vào và tinh chế sản phẩm bằng sắc ký pha đảo để thu được hợp chất so sánh C2 (540mg). MS m/z [M+H]⁺ được tính toán cho C₂₁H₂₁ClFNO₆, 438,10; được phát hiện 438,2.

Hợp chất so sánh C2 được mô tả trong ví dụ 11-2 của Patent Mỹ số 8,691,868 của Hughes et al.

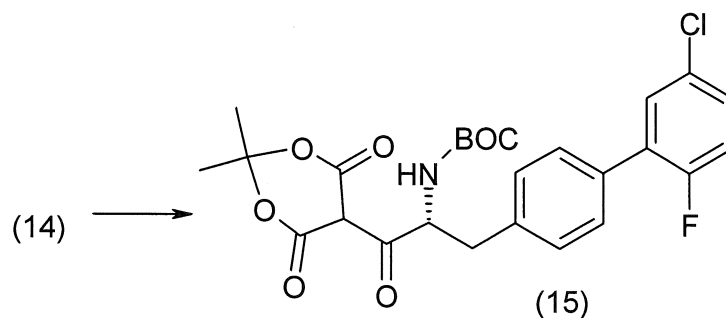
Quy trình điều chế 3: (3S,5R)-5-(5'-chloro-2'-flobiphenyl-4-ylmethyl)-3-hydroxymethyl-3-methylpyrrolidin-2-on (Hợp chất 21)



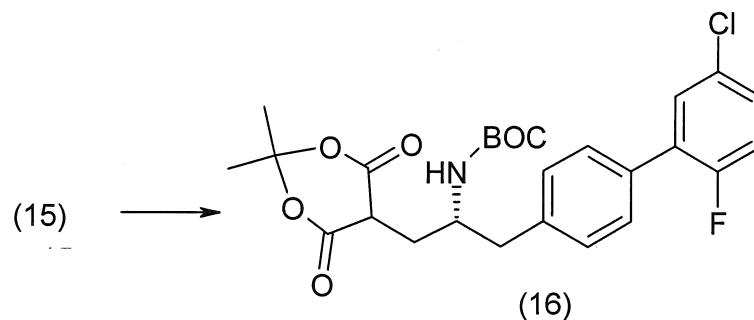
Đặt dung dịch chứa axit (R)-2-amino-3-(4-bromophenyl)propionic (3300g, 13,5mol, 1,0 đương lượng) trong MeCN (46,2L) trong bình phản ứng đã được sục và duy trì với môi trường nitơ trơ. Bổ sung dung dịch chứa NaOH (1081g, 27,0mol, 2,0 đương lượng) trong nước (46,2L) vào một vài mẻ ở nhiệt độ -10°C . Bổ sung dung dịch chứa di-t-butyl dicacbonat (2948g, 13,51mol, 1,0 đương lượng) trong MeCN (6,6L) vào hỗn hợp này. Khuấy dung dịch thu được qua đêm ở nhiệt độ phòng, sau đó cô trong chân không. Pha loãng dung dịch thu được với 45L nước/đá. Điều chỉnh độ pH của dung dịch đến 2 bằng HCl (1mol/L). Chiết dung dịch thu được bằng DCM (50Lx3) và kết hợp các lớp hữu cơ. Rửa hỗn hợp tạo thành bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (50L), sau đó làm khô trên MgSO_4 và cô trong chân không để thu được hợp chất 13 (3720g) dưới dạng chất rắn màu trắng.



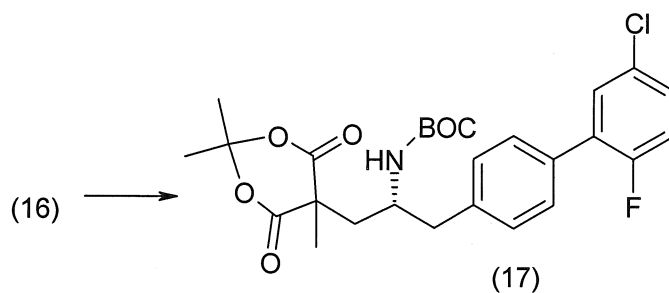
Kết hợp dung dịch chứa hợp chất 13 (530g, 1,54mol, 1,0 đương lượng) trong dioxan (9,54L) với axit (5-clo-2-flophenyl)boronic (348g, 2,0mol, 1,3 đương lượng), dung dịch chứa Na_2CO_3 (228g, 2,2mol, 1,4 đương lượng) trong nước (1,1L), và $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (8,9g, 7,7mmol, 0,01 đương lượng) trong bình phản ứng đã được sục và duy trì với môi trường nitơ trơ. Gia nhiệt dung dịch thu được đến hồi lưu trong 2,5 giờ trong bể dầu, sau đó làm lạnh đến nhiệt độ phòng bằng bể nước/đá. Pha loãng dung dịch thu được với EtOAc (15L), rửa bằng HCl 1N (5L) và dung dịch nước NaCl bão hòa (5Lx4). Sau đó làm khô các chất hữu cơ đã kết hợp trên MgSO_4 và cô trong chân không. Sau đó, rửa phần cặn bằng PE (1Lx2) để thu được hợp chất 14 (510g) dưới dạng dầu màu nâu.



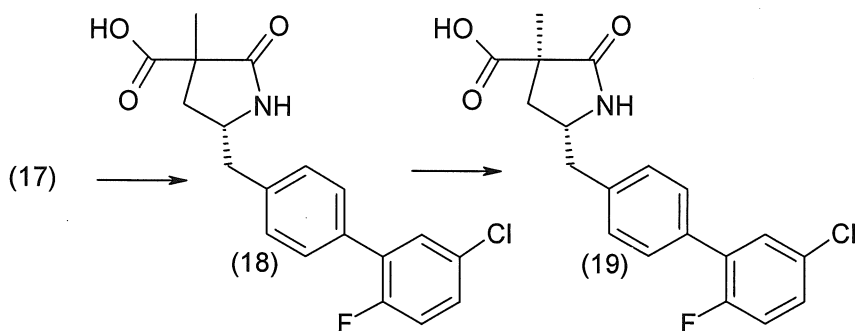
Kết hợp dung dịch chứa hợp chất 14 (510g, 1,3mol, 1,0 đương lượng) trong DCM (5L) với 2,2-dimetyl-1,3-dioxan-4,6-dion (205g, 1,4mol, 1,1 đương lượng) và 4-dimetylaminopyridin (237g, 1,9mol, 1,5 đương lượng) trong bình phản ứng đã được sục và duy trì với môi trường nitơ trơ. Bổ sung từng giọt dung dịch chứa DCC (294g, 1,4mol, 1,1 đương lượng) trong DCM (600mL) đồng thời khuấy ở nhiệt độ -10°C . Khuấy dung dịch thu được qua đêm ở nhiệt độ phòng. Lọc các chất rắn, và rửa dịch lọc bằng HCl 1N (2L) và dung dịch nước NaCl bão hòa (3L). Làm khô các chất hữu cơ đã kết hợp trên MgSO_4 . Lọc các chất rắn, để thu được hợp chất 15 dưới dạng dịch lọc, được sử dụng trong bước tiếp theo trực tiếp mà không tinh chế thêm.



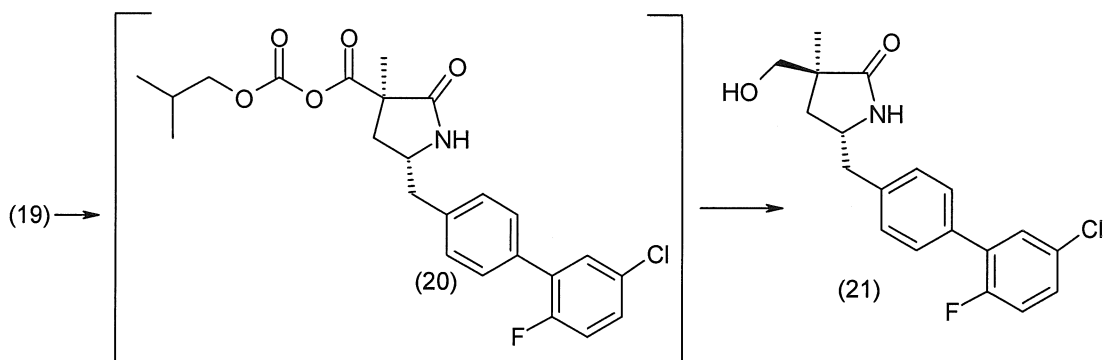
Kết hợp dung dịch chứa hợp chất 15 trong DCM (7L, thô) với AcOH (600mL) trong bình phản ứng đã được sục và duy trì với môi trường nitơ trơ. Bổ sung NaBH_4 (88,8g, 2,4mol, 1,8 đương lượng) trong một vài mẻ ở nhiệt độ -5°C . Khuấy dung dịch thu được trong 3 giờ ở nhiệt độ -5°C . Sau đó dừng phản ứng bằng cách bổ sung từng giọt dung dịch nước NaCl bão hòa (1 L). Pha loãng dung dịch thu được với dung dịch nước NaCl bão hòa (2L) và rửa hỗn hợp tạo thành bằng nước (2 Lx2), dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (1L), và dung dịch nước NaCl bão hòa (2L). Làm khô các chất hữu cơ đã kết hợp trên MgSO_4 và cô trong chân không để thu được hợp chất 16 (520g) dưới dạng dầu màu vàng.



Kết hợp dung dịch chứa hợp chất 16 (520g, 1,0mol, 1,0 đương lượng) trong axeton/DMF(1:1) (5,2L) với Na_2CO_3 (163g, 1,5mol, 1,5 đương lượng) và metyl iodua (219g, 1,5mol, 1,5 đương lượng) trong bình phản ứng đã được sục và duy trì với môi trường nitơ trơ. Khuấy dung dịch thu được qua đêm ở nhiệt độ phòng, sau đó pha loãng với nước (15L). Sau khi khuấy trong 1 giờ thì gom các chất rắn bằng cách lọc. Hòa tan phần cặn trong DCM (5L). Làm khô các chất hữu cơ đã kết hợp trên MgSO_4 và cô trong chân không để thu được hợp chất 17 (520g) dưới dạng chất rắn màu vàng.

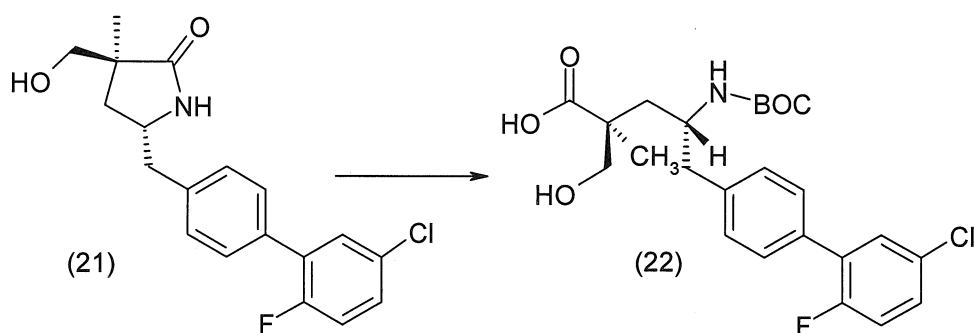


Đặt dung dịch chứa hợp chất 17 (520g, 1,0mol, 1,0 đương lượng) trong CPME (2,6L) trong bình phản ứng đã được sục và duy trì với môi trường nitơ trơ. Bổ sung dung dịch chứa HCl 4N trong CPME (2,6L) vào ở nhiệt độ -5°C . Khuấy dung dịch thu được qua đêm ở nhiệt độ phòng, sau đó cô còn một nửa thể tích trong chân không (thu được hợp chất 18). Gom các chất rắn bằng cách lọc, sau đó rửa bằng hỗn hợp của EtOAc và DIPE với tỷ lệ 1:2 để thu được hợp chất 19 (220g) dưới dạng chất rắn màu trắng đục.



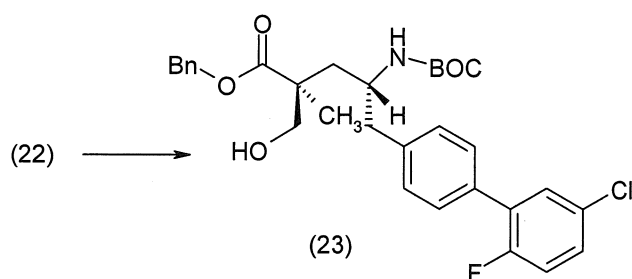
Đặt dung dịch chứa hợp chất 19 (218g, 602,5mmol, 1,0 đương lượng) trong THF (4L) và N-metylmorpholin (170g, 1,7mol, 2,8 đương lượng) trong bình phản ứng đã được sục và duy trì với môi trường nitơ trơ. Bổ sung từng giọt 2-metylpropyl cloformat (164,4g, 1,2mol, 2,0 đương lượng) đồng thời khuấy ở nhiệt độ -5°C . Khuấy dung dịch thu được trong 20 phút ở nhiệt độ -5°C . Sau đó bổ sung từng giọt dung dịch chứa NaBH_4 (91,5g, 2,4mol, 4,0 đương lượng) trong nước (400mL) đồng thời khuấy ở nhiệt độ -5°C . Khuấy dung dịch thu được trong 1 giờ nữa ở nhiệt độ phòng. Sau đó dừng phản ứng bằng cách bổ sung từng giọt HCl 1N (2,6L), và khuấy hỗn hợp tạo thành trong 1 giờ và sau đó cô trong chân không. Sau đó khuấy hỗn hợp còn lại trong 1 giờ nữa, và sau đó gom các chất rắn bằng cách lọc. Rửa các chất rắn bằng nước, hòa tan trong THF, làm khô trên Na_2SO_4 , và cô trong chân không để thu được hợp chất 21 (170g) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Quy trình điều chế 4: Benzyl este của axit (2S,4R)-4-t-butoxycarbonylamino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic (Hợp chất 23)



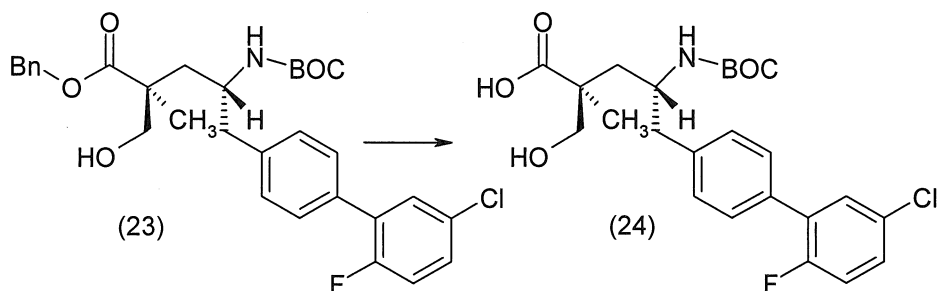
Hòa tan (3S,5R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-ylmetyl)-3-hydroxymetyl-3-metylpyrrolidin-2-on (21) (5,0g, 14,4mmol) trong THF (10mL) và đặt trong môi trường nitơ. Đặt dung dịch này trong bể đá. Bổ sung NaHMDS (31,6mL, 31,6mmol) vào và khuấy hỗn hợp trong 10 phút từ nhiệt độ 0°C đến nhiệt độ phòng. Sau đó bổ sung

(BOC)₂O (7,3mL, 31,6mmol) vào và khuấy hỗn hợp trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, tại thời điểm đó LC/MS cho thấy phản ứng hoàn toàn. Bổ sung dung dịch NaOH 10N (21,6mL, 216mmol) trong nước vào dung dịch thô này để đạt được độ pH~12. Bổ sung thêm THF (~10mL) vào và khuấy dung dịch qua đêm ở nhiệt độ phòng, tại thời điểm đó LC/MS cho thấy phản ứng hoàn toàn. Bổ sung EtOAc sau đó là dung dịch HCl 1N vào cho đến khi đạt độ pH = 5. Chiết lớp hữu cơ, làm khô trên MgSO₄, lọc, và làm bay hơi. Tinh chế phân cận thô bằng sắc ký pha thường (50-100% EtOAc/hexan) để thu được hợp chất 22 (2,5g).



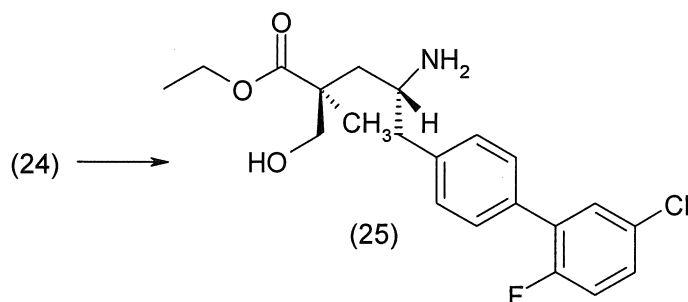
Kết hợp hợp chất 22 (550mg, 1,2mmol), K₂CO₃ (179mg, 1,3mmol) và benzyl bromua (154μL, 1,3mmol) trong DMF (6mL) và khuấy trong 3 đến 4 giờ ở nhiệt độ phòng, tại thời điểm đó LC/MS cho thấy phản ứng hoàn toàn. Loại bỏ dung môi trong chân không và tinh chế phân cận thô bằng sắc ký pha thường để thu được hợp chất 23 (453mg).

Ví dụ 3: Ethyl este của axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metyl-4-(oxalylamino)pentanoic (Hợp chất so sánh C3)

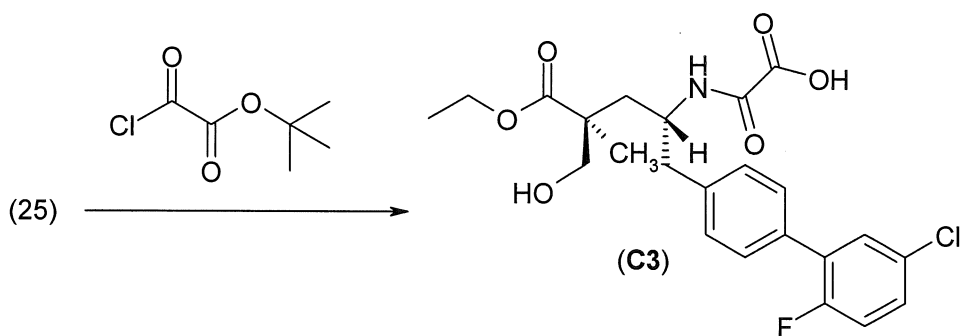


Bổ sung AcOH (376μL, 6,6mmol) vào dung dịch chứa benzyl este của axit (2S,4R)-4-t-butoxycarbonylamino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic (23) (730mg, 1,3mmol) sau đó là paladi (140mg, 131μmol) vào. Khuấy hỗn hợp tạo thành trong môi trường hydro trong 3 giờ, tại thời điểm đó LCMS cho thấy phản ứng hoàn toàn. Lọc hỗn hợp bằng cách sử dụng thiết bị lọc 0,2μm PTFE

Acrodisc CR, và cô để thu được hợp chất 24 (599mg) dưới dạng chất lỏng nhớt không màu trong suốt.



Bổ sung HCl 4N trong dioxan (4,8mL, 19,3mmol) vào dung dịch chứa hợp chất 24 (599mg, 1,3mmol) trong EtOH (5mL). Khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ 80°C trong 3 giờ, sau đó cô trong chân không để thu được chất lỏng trong suốt không màu. Tinh chế chất lỏng thô bằng sắc ký pha đảo (MeCN 20-90% trong nước với TFA 0,05%) để thu được hợp chất 25 (455mg) dưới dạng muối HCl gồm màu trắng.

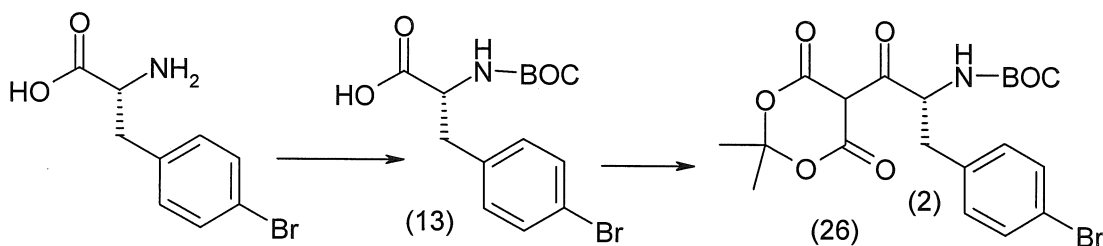


Bổ sung t-butanol (574μL, 6,0mmol) vào dung dịch chứa oxalyl clorua (772μL, 9,0mmol) trong DCM (3mL) ở nhiệt độ 0°C, và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó cô hỗn hợp phản ứng trong chân không để thu được t-butyl 2-clo-2-oxoaxetat (403mg) dưới dạng chất lỏng trong suốt không màu. Hòa tan chất lỏng này trong DCM (2,5mL) để tạo ra dung dịch 1,0M trong DCM.

Bổ sung DIPEA (261μL, 1,5mmol) vào dung dịch chứa hợp chất 25 (236mg, 599μmol) trong DCM (3,0mL) sau đó là t-butyl 2-clo-2-oxoaxetat (dung dịch 1M trong DCM; 659μL, 659μmol), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sau đó bổ sung TFA (3,0mL) vào và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Cô hỗn hợp trong chân không để thu được chất lỏng trong suốt màu vàng nhạt. Tinh chế chất lỏng thô bằng sắc ký pha đảo (MeCN 20-90% trong nước với TFA 0,05%) để thu được hợp chất so sánh C3 (174mg) dưới dạng chất rắn màu trắng. MS m/z $[M+H]^+$

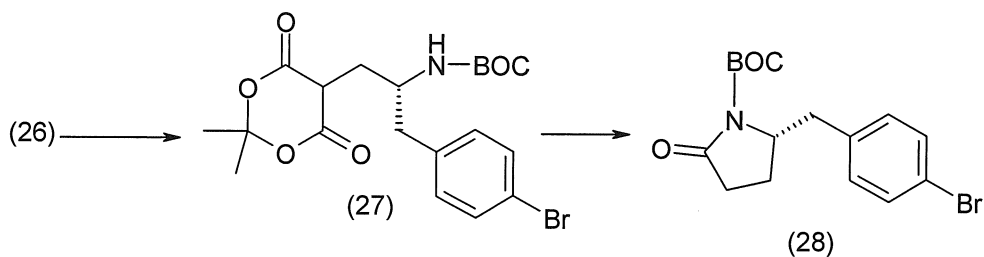
được tính toán cho $C_{23}H_{25}ClFNO_6$, 466,14; được phát hiện 466.

Quy trình điều chế 5: t-Butyl este của axit (S)-2-(4-bromobenzyl)-5-oxopyrrolidin-1-carboxylic (Hợp chất 28)



Bổ sung dung dịch chứa NaOH (16,4g, 0,4mol) trong nước (700mL) vào dung dịch chứa axit (R)-2-amino-3-(4-bromophenyl)propionic (50g, 0,2mol) trong MeCN (700mL) ở nhiệt độ -5°C . Sau khi khuấy trong 10 phút, bổ sung dung dịch chứa $(\text{BOC})_2\text{O}$ (44,7g, 0,2mol) trong MeCN (100mL) vào. Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ phòng và khuấy qua đêm. Sau khi làm bay hơi MeCN, pha loãng phần cặn với DCM (800mL) và axit hóa bằng HCl 1M đến độ pH = 2 ở nhiệt độ -5°C . Chiết nước bằng DCM (3x200mL). Rửa các lớp hữu cơ đã kết hợp bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (500mL), làm khô trên Na_2SO_4 và cô để thu được hợp chất 13 (66,5g) dưới dạng chất rắn màu trắng. LC-MS: 366 $[\text{M}+\text{Na}]$, 709 $[2\text{M}+\text{Na}]$.

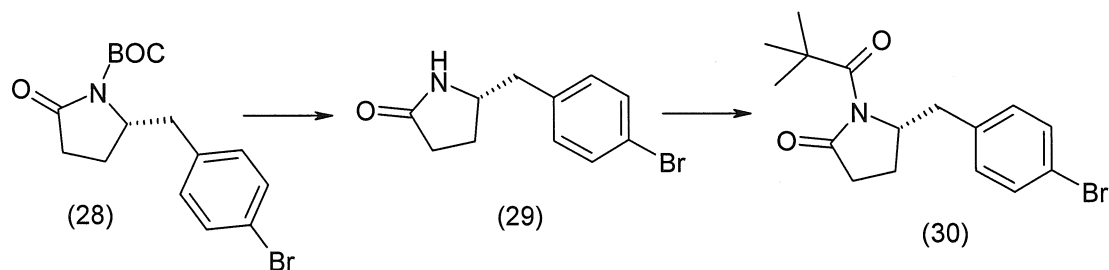
Bổ sung từng giọt dung dịch chứa DCC (47,9g, 232mmol) trong DCM khan (200mL) vào dung dịch chứa hợp chất 13 (66,5g, 193 μmol), axit Meldrum (33,4g, 232mmol) và DMAP (37,7g, 309mmol) trong DCM khan (600mL) trong 1 giờ ở nhiệt độ -5°C trong môi trường nitơ. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ -5°C trong 8 giờ, sau đó làm lạnh qua đêm. Các tinh thể của dicyclohexylure được quan sát. Lọc hỗn hợp, rửa bằng KHSO_4 5% (5x200mL) và dung dịch nước NaCl bão hòa (200mL), sau đó làm khô trên MgSO_4 khan trong tủ lạnh qua đêm. Sau đó làm bay hơi dung dịch để thu được hợp chất thô 26 (91g) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. LC-MS: 492 $[\text{M}+\text{Na}]$, 961 $[2\text{M}+\text{Na}]$.



Bổ sung AcOH (127,5g, 2,1mol) vào dung dịch chứa hợp chất thô 26 (91g, 193mmol) trong DCM khan (1L) ở nhiệt độ -5°C trong môi trường nitơ. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ -5°C trong 30 phút, sau đó bổ sung NaBH_4 (18,3g, 483mmol) được chia làm nhiều phần nhỏ trong 1 giờ. Sau khi khuấy trong 1 giờ nữa ở nhiệt độ -5°C , bổ sung dung dịch nước NaCl bão hòa (500mL) vào. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (2x300mL) và nước (2x300mL), làm khô trên MgSO_4 , lọc, và cô để thu được sản phẩm thô, sản phẩm này được tinh chế thêm bằng cách rửa với Et_2O để thu được hợp chất 27 (68g) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. LC-MS: 478 $[\text{M}+\text{Na}]$, 933 $[2\text{M}+\text{Na}]$.

Hồi lưu dung dịch chứa hợp chất 27 (68g, 149mmol) trong toluen khan (500mL) trong môi trường nitơ trong 3 giờ. Sau khi làm bay hơi dung môi, tinh chế phân cận bằng sắc ký (hexan:EtOAc=10:1) để thu được hợp chất 28 (38g) dưới dạng dầu màu vàng nhạt. LC-MS: 376 $[\text{M}+\text{Na}]$, 729 $[2\text{M}+\text{Na}]$.

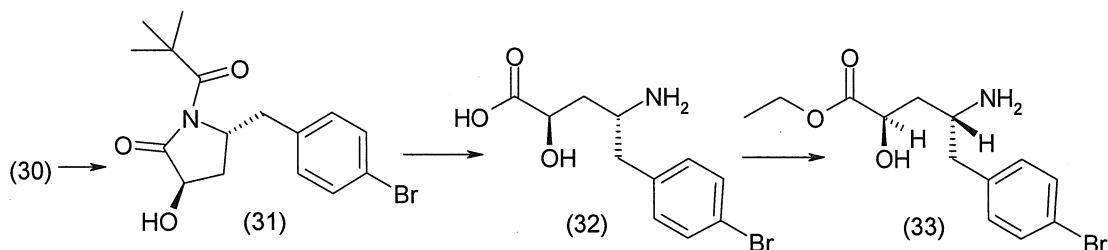
Quy trình điều chế 6: Ethyl este của axit (2R,4R)-4-amino-5-(4-bromphenyl)2-hydroxypentanoic (Hợp chất 33)



Bổ sung TFA (20mL, 0,27mol) vào dung dịch chứa t-butyl este của axit (S)-2-(4-brombenzyl)-5-oxopyrrolidin-1-carboxylic(28) (38g, 107mmol) trong DCM khan (250mL) ở nhiệt độ -5°C trong môi trường nitơ. Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ phòng và khuấy qua đêm. Sau khi làm bay hơi dung môi, pha loãng phần cận với EtOAc (300mL) và rửa bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (3x200mL), nước (200mL), dung dịch nước NaCl bão hòa (250mL), làm khô trên Na_2SO_4 và cô để thu được hợp chất thô 29 (24g) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. LC-MS: 254 $[\text{M}+\text{H}]$.

Bổ sung từng giọt dung dịch chứa hợp chất 29 (24g, 94mmol) trong THF khan (200mL) vào dung dịch chứa NaH (8,6g, 250mmol) trong THF khan (200mL) trong 30 phút ở nhiệt độ 0°C trong môi trường nitơ. Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 2 giờ. Sau khi làm lạnh đến nhiệt độ 0°C , bổ sung từng giọt pivaloyl

clorua (18g, 150mmol) trong 30 phút. Làm ẩm hỗn hợp đến nhiệt độ phòng và khuấy qua đêm. Dừng phản ứng bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (300mL) và chiết bằng EtOAc (3x200mL). Rửa các lớp hữu cơ đã kết hợp bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (300mL), làm khô trên MgSO_4 , lọc và cô để thu được sản phẩm thô, sản phẩm thô này được tinh chế thêm bằng sắc ký (hexan:EtOAc=25:1) để thu được hợp chất 30 (18g) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. LC-MS: 360 (M+Na).



Bổ sung từng giọt NaHMDS (47,7mL, 96mmol) vào dung dịch chứa hợp chất 30 (18g, 53mmol) trong THF khan (250mL) trong 30 phút ở nhiệt độ -78°C trong môi trường nitơ. Sau khi khuấy ở nhiệt độ -78°C trong 90 phút, bổ sung từng giọt dung dịch chứa (+)-(8,8-diclocamphorylsulfonyl)-oxaziridin (31,6g, 106mmol) vào trong 30 phút. Sau khi khuấy ở nhiệt độ 78°C trong 2 giờ, dừng phản ứng bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (400mL) và chiết bằng EtOAc (3x300mL). Rửa các lớp hữu cơ đã kết hợp bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (300mL), làm khô trên MgSO_4 , lọc, và cô để thu được sản phẩm thô, sản phẩm thô này được tinh chế thêm bằng sắc ký (hexan:EtOAc=15:1) để thu được hợp chất 31 (8,9g) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. LC-MS: 376 (M+Na).

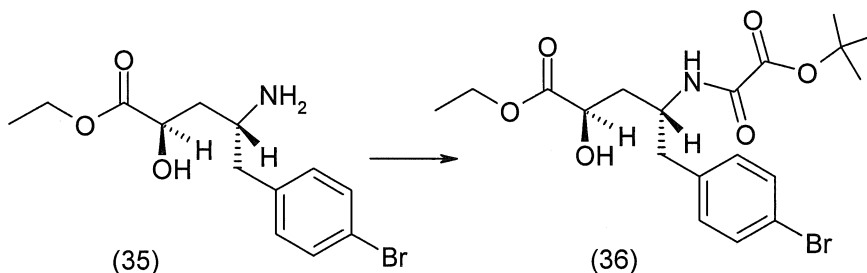
Gia nhiệt dung dịch chứa hợp chất 31 (8,9g, 25mmol) trong HCl đậm đặc (81mL, 81mmol) ở nhiệt độ 100°C trong 16 giờ. Sau đó cô hỗn hợp để thu được sản phẩm thô mà được tinh chế thêm bằng cách rửa với Et_2O để thu được hợp chất 32 (7g) dưới dạng muối HCl rắn màu vàng nhạt. LC-MS: 323 (M+H).

Kết hợp dung dịch chứa hợp chất 32 (7g, 22mmol) trong EtOH (10mL) với HCl 8M trong EtOH (120mL, 960mmol) ở nhiệt độ phòng. Gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ 50°C trong 16 giờ, sau đó cô. Tinh chế thêm sản phẩm thô bằng cách rửa với Et_2O để thu được hợp chất 33 (6g) dưới dạng muối HCl rắn màu vàng nhạt. LC-MS: 352 (M+H).

Quy trình điều chế 7: t-Butyl este của axit clo-oxo-axetic (Hợp chất 34)

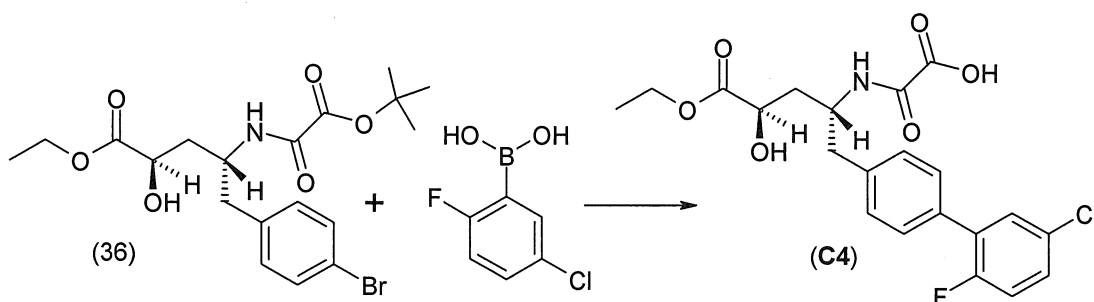
Kết hợp oxalyl clorua (232 μ L, 2,8mmol) và rượu t-butylic (228 μ L) trong ete (6,7mL) trong môi trường nitơ ở nhiệt độ 0°C. Khuấy hỗn hợp tạo thành trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Làm bay hơi dung môi trong môi trường chân không để tạo ra hợp chất 34.

Quy trình bảo chế 8: Etyl este của axit (2R,4R)-5-(4-bromophenyl)-4-(t-butoxyoxalyl-amino)-2-hydroxypentanoic (Hợp chất 36)



Kết hợp oxalyl clorua (401 μ L, 4,7mmol) trong DCM (8mL) với rượu t-butylic (454 μ L, 4,7mmol). Bỏ sung từng giọt Et₃N (198 μ L, 1,4mmol) vào, và khuấy dung dịch thu được trong 5 phút. Sau đó bỏ sung từng giọt dung dịch này vào dung dịch chứa Etyl este của axit (2R,4R)-4-amino-5-(4-bromophenyl)-2-hydroxypentanoic (35) (150mg, 474 μ mol) và Et₃N (198 μ L, 1,4mmol) trong DCM (5mL), và khuấy cho đến khi kết thúc phản ứng. Làm bay hơi các dung môi và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký pha thường (20-100% EtOAc/hexan) để thu được hợp chất 36.

Ví dụ 4: Etyl este của axit (2R,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-(oxalylamino)pentanoic (Hợp chất so sánh C4)

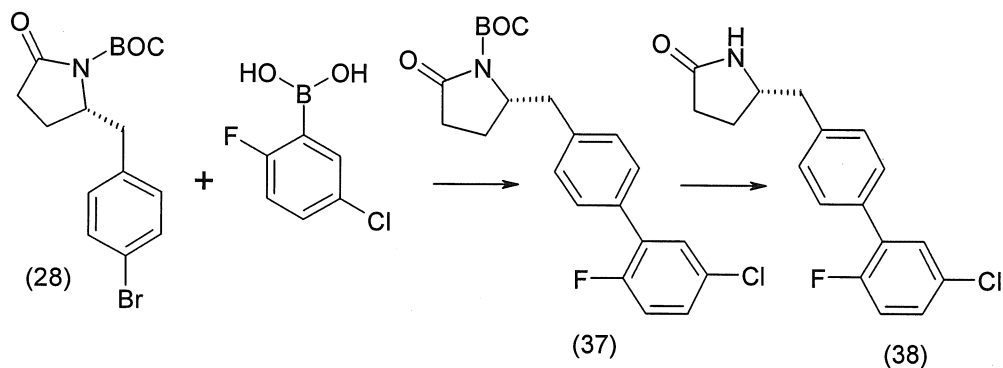


Kết hợp etyl este của axit (2R,4R)-5-(4-bromophenyl)-4-(t-butoxyoxalyl-amino)-2-hydroxypentanoic (36) (48,5mg, 109 μ mol) với axit 5-clo-2-flophenylboronic (22,8mg, 131 μ mol) và K₂CO₃ (45,2mg, 327 μ mol) trong rượu t-butylic (2mL) và nước (0,3mL). Bỏ sung SilicaCat®DPP-Pd (nạp 0,28mmol/g; 39mg, 11 μ mol) vào và gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ 80°C trong 15 phút, tại thời điểm đó LC/MS cho thấy sản

phẩm mong muốn. Lọc hỗn hợp và cô dịch lọc và tinh chế bằng HPLC điều chế để thu được hợp chất so sánh C4 (20mg). MS m/z $[M+H]^+$ được tính toán cho $C_{21}H_{21}ClFNO_6$, 438,10; được phát hiện 438,0.

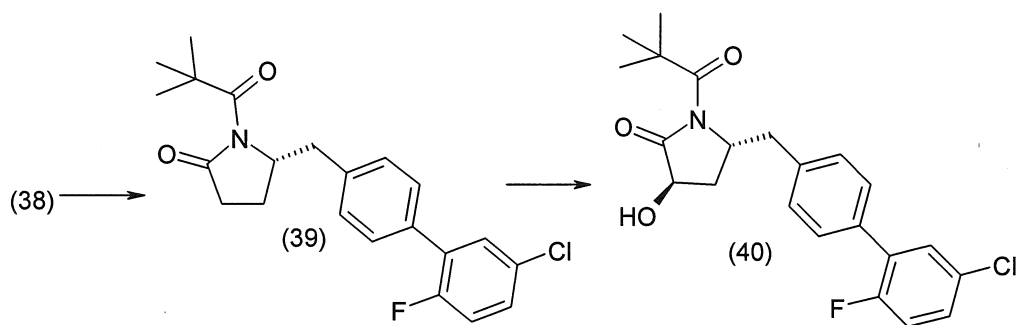
Hợp chất so sánh C4 được mô tả trong ví dụ 5-6 của Patent Mỹ số 8,691,868 của Hughes et al.

Quy trình điều chế 9: Ethyl este của axit (2R,4R)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxypentanoic (Hợp chất 42)



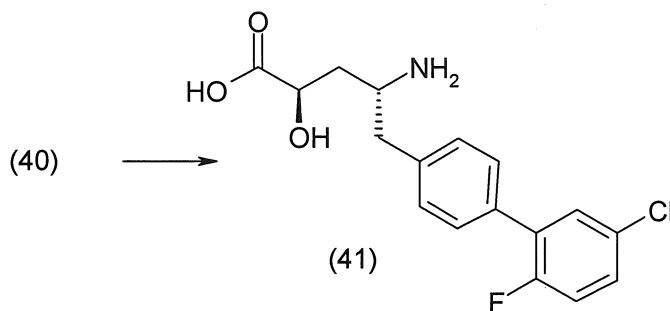
Bổ sung axit 5-clo-2-flophenylboronic (24,6g, 141mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (4,1g, 3,5mmol) và dung dịch chứa K_2CO_3 (17,8g, 141mmol) trong nước (90mL) vào dung dịch chứa t-butyl este của axit (S)-2-(4-brombenzyl)-5-oxopyrrolidin-1-carboxylic (28) (25g, 70,6mmol) trong 1,4-dioxan (500mL) ở nhiệt độ phòng trong môi trường nitơ. Gia nhiệt hỗn hợp đến nhiệt độ $60^\circ C$ và khuấy qua đêm. Bổ sung nước (500mL) vào và làm bay hơi dung môi. Chiết hỗn hợp bằng EtOAc (3x200mL). Rửa các lớp hữu cơ đã kết hợp bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (300mL) và lọc. Cô dịch lọc để thu được sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký để thu được hợp chất 37 (22,7g) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. LC-MS: 829,2 $[2M+Na^+]$.

Bổ sung TFA (4,5mL, 60,7mmol) vào dung dịch chứa hợp chất 37 (4,9g, 12,1mmol) trong DCM (100mL) ở nhiệt độ $0^\circ C$ trong môi trường nitơ, và khuấy trong 1 giờ. Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ. Sau khi làm bay hơi dung môi, pha loãng phần cặn với EtOAc (100mL), sau đó rửa bằng dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa (3x100mL), nước (2x100mL), dung dịch nước NaCl bão hòa (100mL), sau đó làm khô trên Na_2SO_4 . Lọc hỗn hợp và cô dịch lọc để thu được hợp chất thô 38 (kết hợp với mẻ riêng để có tổng cộng 16,9g). LC-MS: 304 $[M+H]$.

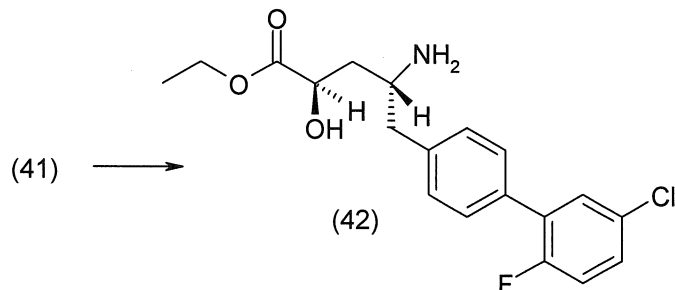


Bổ sung từng giọt dung dịch chứa hợp chất 38 (8,5g, 278mmol) trong THF (50mL) vào dung dịch chứa NaH (2,4g, 695mmol) trong THF (200mL) ở nhiệt độ 0°C trong môi trường nitơ. Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 2 giờ. Sau khi làm lạnh đến nhiệt độ 0°C, bổ sung từng giọt pivaloyl clorua (5g, 41,7mmol) vào trong 30 phút. Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 9,5 giờ. Dừng phản ứng bằng dung dịch nước NH₄Cl bão hòa (250mL) và chiết bằng EtOAc (3x400mL). Làm khô các lớp hữu cơ đã kết hợp trên Na₂SO₄ và cô để thu được sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký để thu được hợp chất 39 (18g) dưới dạng chất rắn màu vàng. LC-MS: 388 [M+H⁺].

Bổ sung từng giọt NaHMDS (20,9mL, 41,8mmol) vào dung dịch chứa hợp chất 39 (9g, 23,2mmol) trong THF (200mL) ở nhiệt độ -78°C trong môi trường nitơ. Sau khi khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ -78°C, bổ sung từng giọt dung dịch chứa (+)-(8,8-diclocamphorylsulfonyl)oxaziridin (10,4g, 34,8mmol) trong THF (50mL) vào. Sau khi khuấy ở nhiệt độ -78°C trong 1 giờ, dừng phản ứng bằng dung dịch nước NH₄Cl bão hòa (50mL) và chiết bằng EtOAc (3x400mL). Rửa các lớp hữu cơ đã kết hợp bằng HCl 1M (400mL), dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (400mL), và dung dịch nước NaCl bão hòa (400mL), làm khô trên Na₂SO₄, và cô để thu được sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký để thu được hợp chất 40 (8,8g) dưới dạng chất bán rắn màu trắng. LC-MS: 426,1 [M+Na⁺].

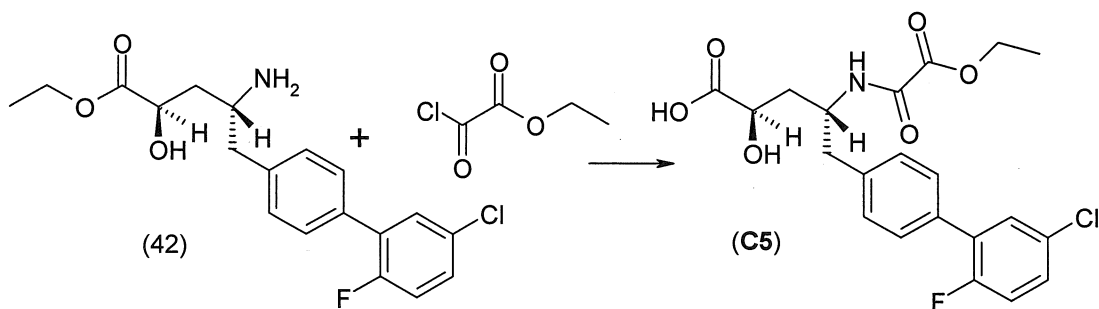


Bổ sung dung dịch chứa hợp chất 40 (8,8g, 21,8mmol) trong EtOH (12mL) vào HCl đậm đặc (200mL) và gia nhiệt ở nhiệt độ 100°C và khuấy qua đêm. Sau đó cô hỗn hợp để thu được sản phẩm thô mà được tinh chế bằng cách rửa với Et₂O (100mL) để thu được hợp chất 41 dưới dạng muối HCl rắn (7,5g). LC-MS: 338 [M+ H⁺].



Gia nhiệt dung dịch chứa hợp chất 41 (7,5g, 20,1mmol) trong EtOH/HCl (100mL) ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Cô hỗn hợp và tinh chế sản phẩm thô bằng cách rửa với Et₂O (200mL) để thu được hợp chất 42 (6,5g) dưới dạng muối HCl rắn màu trắng. LC-MS: 366,1 [M+ H⁺].

Ví dụ 5: Axit (2R,4R)-5-(5'-(clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxy pentanoic (Hợp chất so sánh C5)

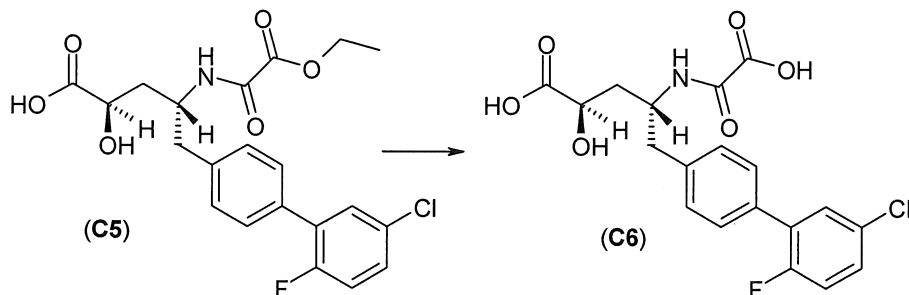


Bổ sung HCl 1,0N (6mL) vào etyl este của axit (2R,4R)-4-amino-5-(5'-(clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxypentanoic (42) (114mg, 313μmol) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 90°C trong 24 giờ sau đó cô trong điều kiện áp suất giảm. Kết hợp sản phẩm ion lưỡng tính với Et₃N (157μL, 1,1mmol) trong DCM (6mL), sau đó bổ sung dung dịch chứa etyl oxalyl clorua (34,9μL, 313μmol) trong DCM (2mL) vào ở nhiệt độ 0°C, và khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Bổ sung dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (5mL) vào và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp được chiết bằng DCM (3x3mL) và được cô và tinh chế phần cặn bằng HPLC điều chế để thu được hợp chất so sánh C5 (5mg). MS m/z [M+H]⁺ được tính toán cho

$C_{21}H_{21}ClFNO_6$, 438,10; được phát hiện 438,2.

Hợp chất so sánh C5 được mô tả trong ví dụ 5-14 của Patent Mỹ số 8,691,868 của Hughes et al.

Ví dụ 6: Axit (2R,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxy-4-(oxalylamino) pentanoic (Hợp chất so sánh C6)



Kết hợp axit (2R,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxypentanoic (C5) với LiOH trong nước 1M (2,5mL, 2,5mmol). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, tại thời điểm đó LCMS cho thấy phản ứng hoàn toàn. Loại bỏ dung môi trong chân không để thu được hợp chất so sánh C6 (20,8mg). MS m/z $[M+H]^+$ được tính toán cho $C_{19}H_{17}ClFNO_6$, 410,07; được phát hiện 410,0.

Hợp chất so sánh C6 được mô tả trong ví dụ 5-5 của Patent Mỹ số 8,691,868 của Hughes et al.

Ví dụ 7: Nghiên cứu độ ổn định của hợp chất ở dạng tinh thể canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat (1')

Một thách thức trong phát triển dược chất liên quan đến việc tìm ra dạng tinh thể ổn định của dược chất có điểm nóng chảy cao một cách hợp lý. Thách thức theo sáng chế là không thể thu được tinh thể của axit tự do của hợp chất 1. Ngoài ra, nhiều quá trình sàng lọc tinh thể gặp thất bại, ngoại trừ việc thu được hai tinh thể arginin và canxi của axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic. Tuy nhiên, tinh thể arginin (xem Ví dụ 1) tan chảy ở điều kiện môi trường và khó để nghiên cứu phát triển thêm. Nói cách khác, tinh thể canxi ổn định và nóng chảy ở nhiệt độ khoảng 239°C. Vì lý do này, nghiên cứu độ ổn định cấp tốc của hợp chất 1' được tiến hành ở các nhiệt độ và % độ ẩm tương đối (RH) được báo cáo dưới đây.

Thời gian (tháng)	25°C, RH 60%		40°C, RH 75%		5°C	
	Thử nghiệm ^a	Độ tinh khiết ^b	Thử nghiệm	Độ tinh khiết	Thử nghiệm	Độ tinh khiết
0	95,0	97,3	95,0	97,3	95,0	97,3
1	nt ^c	nt	95,5	95,9	nt	nt
2	94,4	97,3	92,1	95,3	93,4	97,6
3	92,9	96,8	92,1	93,9	92,4	97,5

^aThử nghiệm = (khối lượng chất/tổng khối lượng)*100 = % (khối lượng/khối lượng).

^bĐộ tinh khiết = (AUC của chất tinh khiết/AUC của chất không tinh khiết)*100 = % (a/a).

^cnt = không được thử nghiệm.

Các dữ liệu này cho thấy rằng hợp chất 1' vẫn tương đối ổn định lên đến ít nhất ba tháng ở các nhiệt độ và độ ẩm tương đối được thử nghiệm.

Thử nghiệm

Hợp chất 1 và hợp chất so sánh C2, C3, C4, C5, và C6 được đánh giá trong các thử nghiệm được mô tả dưới đây. Bảng sau minh họa các chất chuyển hóa mà có thể được tạo ra từ một hoặc nhiều hợp chất được phân cắt ở các vị trí khác nhau trên cấu trúc của nó.

Hợp chất hoặc Tiền dược chất →	Chất chuyển hóa có hoạt tính
Hợp chất 1	Hợp chất so sánh C2
Hợp chất so sánh C3	Hợp chất so sánh C2
Hợp chất so sánh C4	Hợp chất so sánh C6
Hợp chất so sánh C5	Hợp chất so sánh C6

Thử nghiệm 1: Thử nghiệm in vitro để định lượng hiệu lực của chất ức chế ở NEP người và chuột cống

Hoạt tính ức chế ở neprilysin người và chuột cống (EC 3.4.24.11; NEP) được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm in vitro như được mô tả dưới đây.

Tách hoạt tính NEP từ thận chuột cống

NEP chuột cống được chuẩn bị từ thận của chuột cống trưởng thành Sprague Dawley. Toàn bộ thận được rửa trong nước muối đệm phosphat (PBS) lạnh và đưa vào trong chất đệm phân giải đá lạnh (Triton X-114 1%, NaCl 150mM, tris(hydroxymetyl)

aminometan (Tris) 50mM độ pH = 7,5; Bordier (1981) J. Biol. Chem. 256: 1604-1607) ở tỷ lệ là 5mL chất đệm cho mỗi gam thận. Các mẫu được đồng nhất trên đá bằng cách sử dụng thiết bị nghiền mô cầm tay polytron. Các dịch đồng nhất được ly tâm ở 1000 x g trong giá treo ở rô-to trong 5 phút ở nhiệt độ 3°C. Pelet được tạo hỗn dịch lại trong 20mL chất đệm phân giải đá lạnh và ủ trên đá trong 30 phút. Sau đó các mẫu (15-20mL) được xếp lên trên 25mL chất đệm lót đá lạnh (6% khối lượng/thể tích sucroza, Tris 50mM độ pH = 7,5, NaCl 150mM, 0,06%, Triton X-114), gia nhiệt đến 37°C trong 3 đến 5 phút và ly tâm ở 1000 x g trong giá treo ở rô-to ở nhiệt độ phòng trong 3 phút. Hai lớp trên được hút ra, để lại chất kết tủa dạng dầu nhớt chứa phần màng được làm giàu. Glyxerol được bổ sung đến nồng độ bằng 50% và các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Nồng độ protein được định lượng bằng cách sử dụng hệ dò BCA với albumin huyết thanh bò (BSA) làm chất chuẩn.

Thử nghiệm ức chế enzym

NEP người tái tổ hợp có được bằng cách mua trên thị trường (R&D Systems, Minneapolis, MN, số danh mục 1182-ZN). Cơ chất peptit sinh 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 thực hiện trong đĩa màu trắng đục có 384 giếng ở nhiệt độ 37°C bằng cách sử dụng cơ chất peptit sinh huỳnh quang ở nồng độ 10µM trong chất đệm thử nghiệm (HEPES 50mM, độ pH = 7,5, NaCl 100mM, polyetylen glycol sorbitan monolaurat 0,01% (Tween-20), ZnSO₄ 10µM). Các enzym tương ứng được sử dụng ở các nồng độ gây ra sự phân giải protein định lượng của 1µM cơ chất sau 20 phút ở nhiệt độ 37°C.

Hợp chất thử nghiệm được thử nghiệm trong khoảng nồng độ từ 10µM đến 20pM. Hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào enzym và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C trước khi bắt đầu phản ứng bằng cách bổ sung cơ chất. Các phản ứng được kết thúc sau 20 phút ủ ở nhiệt độ 37°C bằng cách bổ sung axit axetic đá băng đến 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 ra được thiết lập lần lượt đến 320nm và 405nm. Hằng số ức chế thu được bằng cách hồi quy không tuyến tính dữ liệu bằng cách sử dụng phương trình (phần mềm GraphPad, 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 bị ức chế, I là nồng độ chất ức chế và K' là hằng số ức chế biểu kiến.

Hợp chất	pK _i chuột cống	pK _i người
1	9,1	9,1
C2	9,5	9,2
C3	5,7	5,4
C4	8,1	7,8
C5	9,7	9,7
C6	9,8	9,7

Các dữ liệu này cho thấy rằng hợp chất 1 có hiệu lực ở NEP chuột cống và người tương tự với hợp chất so sánh C2 trong khi đó hợp chất so sánh C3 có hiệu lực rất thấp ở enzyme NEP chuột cống và người so với hiệu lực của hợp chất so sánh C2. Tương tự, hợp chất so sánh C5 có hiệu lực ở NEP chuột cống và người tương tự với hợp chất so sánh C6 trong khi đó hợp chất so sánh C4 có hiệu lực thấp ở enzyme NEP chuột cống và người so với hiệu lực của hợp chất so sánh C6.

Hợp chất 1, C2, C5, và C6 có hoạt tính đáng kể ở enzyme NEP chuột cống và người và đạt ngưỡng hoạt tính là $pK_i \geq 9,0$ để hữu ích để sử dụng trong điều trị như được mô tả trên đây.

Thử nghiệm 2: Nghiên cứu dược động học khi dùng qua đường miệng ở chuột cống, chó, và khỉ

Mỗi nghiên cứu dược động học ở chuột cống, chó, hoặc khỉ bắt đầu với chế phẩm chứa hợp chất thử nghiệm. Các khối lượng thích hợp của mỗi hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào thể tích của tá dược lỏng (ví dụ, natri bicacbonat 5%, dextroza 5% trong nước) sao cho nồng độ cuối cùng của mỗi hợp chất là thích hợp để được sử dụng ở liều 2mL/kg. Mặc dù hỗn dịch đồng nhất được chấp nhận để sử dụng liều qua đường miệng, dung dịch dùng trong tĩnh mạch được lọc vô khuẩn (0,2µm) trước khi sử dụng liều để đảm bảo không có hạt nào được sử dụng.

Trong nghiên cứu ở chuột cống, chuột cống đực Sprague-Dawley được đưa ống thông vào từ trước (3 con mỗi đường) từ 8 đến 10 tuần tuổi thu được từ Harlan

Laboratories (Indianapolis, IN). Chuột cống nhận một liều dung dịch được đưa qua ống thông qua miệng hoặc vào trong tĩnh mạch (qua tĩnh mạch đuôi bên). Liều cuối cùng thường là 0,5 đến 3mg/kg. Các mẫu máu nối tiếp được lấy qua ống thông được cấy trong tĩnh mạch cổ ở các thời điểm là 3 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, và 24 giờ sau khi dùng liều. Việc lấy mẫu được thực hiện thủ công hoặc sử dụng thiết bị lấy mẫu máu tự động. Các mẫu được gom vào ống microtainer chứa natri florua, kali oxalat và paraoxon (chất chống đông và chất ức chế esterase, tương ứng), và được xử lý thành huyết tương bằng cách ly tâm lạnh.

Trong nghiên cứu ở chó, chó săn đực (3 con mỗi đường) được nuôi nhốt trong phòng thí nghiệm Agilux Laboratories (Worcester, MA) và có cân nặng từ 7 đến 12 kg nhận một liều dung dịch qua ống thông qua đường miệng. Liều cuối cùng thường là từ 0,1 đến 2 mg/kg. Các mẫu máu nối tiếp được lấy bằng cách chọc tiêm tĩnh mạch trực tiếp ở các thời điểm là 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 liều. Tất cả các mẫu được lấy thủ công vào ống microtainer chứa natri florua, kali oxalat và paraoxon, và được xử lý thành huyết tương bằng cách ly tâm lạnh.

Trong nghiên cứu ở khỉ, khỉ đực cynomolgus (3 con mỗi đường) được nuôi nhốt ở Xenometrics (Stilwell, KS) và có cân nặng từ 4 đến 5 kg, nhận một liều dung dịch qua ống thông qua đường miệng. Liều cuối cùng là 2mg/kg. Các mẫu máu nối tiếp được lấy từ tĩnh mạch đầu hoặc tĩnh mạch hiển ở các thời điểm là trước khi dùng liều và 5 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ, và 24 giờ sau khi dùng liều. Tất cả các mẫu được lấy vào các ống chứa kali oxalat, natri florua và paraoxon, và được xử lý thành huyết tương bằng cách ly tâm lạnh.

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

Sinh khả dụng qua đường miệng (%F) là tỷ lệ phần trăm liều đến được tuần hoàn toàn thân sau liều dùng qua đường miệng so với liều trong tĩnh mạch khi toàn bộ liều được sử dụng trực tiếp vào hệ tuần hoàn toàn thân. Giá trị này bằng với tỷ lệ của

diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian sau liều dùng qua đường miệng với diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian sau liều trong tĩnh mạch, được chuẩn hóa cho các sai lệch bất kỳ ở các mức liều giữa các đường sử dụng.

Loài	Hợp chất so sánh C2		Hợp chất 1	
	AUC_{last}^a ($\mu\text{g} \cdot \text{giờ}/\text{mL}$) (được chuẩn hóa) ^b	Sinh khả dụng qua đường miệng (%F)	AUC_{last}^a ($\mu\text{g} \cdot \text{giờ}/\text{mL}$) (được chuẩn hóa) ^b	Sinh khả dụng qua đường miệng %F
chuột cống	0,45	33	3,4	>100
chó	0,27	13	0,89	44
khỉ	0,82	1,7	7,4	77

^a AUC_{last} là diện tích dưới đường cong nồng độ huyết tương theo thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm sau khi sử dụng liều mà tại đó quan sát được nồng độ định lượng được cuối cùng, được đánh giá bằng phương pháp hình thang tuyến tính

^b Được chuẩn hóa bằng cách chia AUC_{last} cho liều dùng

Dữ liệu này cho thấy rằng hợp chất so sánh C2 (chất chuyển hóa có hoạt tính của hợp chất 1) có sinh khả dụng qua đường miệng thấp trong khi hợp chất 1 có sinh khả dụng qua đường miệng tương đối cao trong tất cả ba mô hình động vật được thử nghiệm.

Thử nghiệm 3: Nghiên cứu dược động học IV/PO ở chuột cống và chó

Mỗi nghiên cứu dược động học ở chuột cống hoặc chó bắt đầu bằng chế phẩm chứa hợp chất thử nghiệm. Các khối lượng thích hợp của mỗi hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào thể tích của tá dược lỏng (ví dụ, natri bicacbonat 5%, dextroza 5% trong nước) sao cho nồng độ cuối cùng của mỗi hợp chất là thích hợp để được sử dụng ở liều 2mL/kg. Mặc dù hỗn dịch đồng nhất là chấp nhận được để sử dụng qua đường miệng, dung dịch liều trong tĩnh mạch được lọc vô khuẩn (0,2 μm) trước khi sử dụng liều để đảm bảo không có hạt nào được dùng.

Trong nghiên cứu ở chuột cống, chuột cống đực Sprague-Dawley được đặt ống thông từ trước (3 con mỗi đường) từ 8 đến 10 tuần tuổi thu được từ phòng thí nghiệm Harlan (Indianapolis, IN). Chuột cống nhận một liều dung dịch qua ống thông qua đường miệng hoặc trong tĩnh mạch (qua tĩnh mạch bên đuôi) của dung dịch liều. Liều cuối cùng thường là 0,5 đến 3mg/kg. Các mẫu máu nối tiếp được thu gom thông qua

ống thông được cấy trong tĩnh mạch cổ ở các thời điểm là 3 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, và 24 giờ sau khi dùng liều. Việc lấy mẫu được thực hiện thủ công hoặc sử dụng thiết bị lấy mẫu máu tự động. Các mẫu được gom vào ống microtainer chứa natri florua, kali oxalat và paraoxon, và được xử lý thành huyết tương bằng cách ly tâm lạnh.

Trong nghiên cứu ở chó, chó săn đực (3 con mỗi đường dùng) được nuôi nhốt ở phòng thí nghiệm Agilux Laboratories (Worcester, MA) và có cân nặng từ 7 đến 12 kg nhận một liều dung dịch qua ống thông qua đường miệng hoặc trong tĩnh mạch (qua ống thông tiểu giữ lưu). Liều cuối cùng thường là 0,1 đến 2mg/kg. Các mẫu máu nối tiếp được thu gom bằng cách chọc tĩnh mạch trực tiếp ở các thời điểm là 3 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 12 giờ, và 24 giờ sau khi dùng liều. Tất cả các mẫu được gom thủ công vào ống microtainer chứa natri florua, kali oxalat và paraoxon, và được xử lý thành huyết tương bằng cách ly tâm lạnh.

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

Dữ liệu dược động học ở chuột cống

Hợp chất được sử dụng	Đường dùng	Chất phân tích	AUC _{last} ^a (µg*giờ/mL)		Sinh khả dụng qua đường miệng ^b của chất chuyển hóa có hoạt tính
			Trung bình	CV	Trung bình
1	PO	1	0	NA	NA
1	PO	C2	15	18%	>100%
C2	IV	C2	16	32%	NA
C3	PO	C3	0,56	20%	NA
C3	PO	C2	0,67	20%	21%
C2	IV	C2	16	32%	NA
C5	PO	C5	0	NA	NA
C5	PO	C6	0,62	12%	11%
C6	IV	C6	15	17%	NA
C4	PO	C4	0,04	32%	NA
C4	PO	C6	0,59	34%	9%
C6	IV	C6	15	17%	NA

^a AUC_{last} là diện tích dưới đường cong nồng độ huyết tương theo thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm sau khi sử dụng liều mà tại đó quan sát được nồng độ định lượng được cuối cùng, được đánh giá bằng phương pháp hình thang tuyến tính

^b Sinh khả dụng qua đường miệng được tính bằng AUC_{last} của phân tử hoạt tính sau khi sử dụng qua đường miệng tiền được chất, chia cho AUC_{last} sau khi dùng trong tĩnh mạch phân tử hoạt tính, được chuẩn hóa cho các sai lệch bất kỳ ở các liều được sử dụng, được biểu thị dưới dạng phần trăm.

Các dữ liệu ở chuột cống này cho thấy rằng hợp chất theo sáng chế, hợp chất 1, dẫn đến sự tiếp xúc toàn thân của chất chuyển hóa có hoạt tính của nó lớn hơn đáng kể so với hợp chất C3, C5 hoặc C4 (giá trị sinh khả dụng của chất chuyển hóa lần lượt là >100%, 21%, 11% và 9%).

Chất chuyển hóa có hoạt tính	Hợp chất hoặc Tiền được chất	AUC_{last} hoạt hóa / AUC_{last} tiền được chất
C2	1	Không có tiền được chất nào được phát hiện ra
C2	C3	1,2
C6	C5	Không có tiền được chất nào được phát hiện ra
C6	C4	17

Đối với cả hợp chất 1 và hợp chất so sánh C5, không có tiền được chất nào được phát hiện ra vì vậy có thể giả định rằng sự chuyển hóa hoàn toàn của hợp chất tiền được chất thành chất chuyển hóa có hoạt tính xảy ra in vivo ở chuột cống. Cả hai hợp chất này có tỷ lệ tiếp xúc chất chuyển hóa lớn hơn so với hợp chất so sánh C4 (17) hoặc hợp chất so sánh C3 (1,2).

Các tiền được chất này phân cắt bằng cách thủy phân este, thường xảy ra nhanh hơn ở chuột cống so với ở chó hoặc người. Vì lý do này, mô hình chuột cống có thủy phân este không phải lúc nào cũng dự báo được về sự phân cắt ở người. Vì thế, tiền được chất như của sáng chế cũng nên được đánh giá ở chó để thu được dữ liệu dự báo bổ sung để đánh giá tốc độ phân cắt ở người.

Dữ liệu được động học ở chó

Hợp chất được sử dụng	Đường dùng	Chất phân tích	AUC _{last} (µg*giờ/mL)		Sinh khả dụng qua đường miệng của chất chuyển hóa có hoạt tính
			Trung bình	CV	Trung bình
1	PO	1	0,0037	37%	NA
1	PO	C2	0,65	30%	44%
C2	IV	C2	1,97	5%	NA
C3	PO	C3	0,95	3%	NA
C3	PO	C2	0	0%	0%
C2	IV	C2	1,97	5%	NA
C5	PO	C5	0,029	26%	NA
C5	PO	C6	0,37	19%	29%
C6	IV	C6	1,28	26%	NA
C4	PO	C4	0,48	33%	NA
C4	PO	C6	0,59	17%	46%
C6	IV	C6	1,28	26%	NA

Dữ liệu ở chó cho thấy rằng hợp chất theo sáng chế, hợp chất 1, dẫn đến sinh khả dụng qua đường miệng của chất chuyển hóa có hoạt tính của nó tương tự với hợp chất so sánh C4 và sinh khả dụng lớn hơn nhiều so với hợp chất C3 hoặc C5 (các giá trị lần lượt là 44%, 46%, 0% và 29%).

Chất chuyển hóa có hoạt tính	Hợp chất hoặc tiền dược chất	AUC _{last} hoạt hóa/AUC _{last} tiền dược chất
C2	1	177
C2	C3	0
C6	C5	13
C6	C4	1,2

Dữ liệu ở chó này cho thấy rằng tiền dược chất theo sáng chế, hợp chất 1, đạt được sự tiếp xúc tương đối với phân tử chất chuyển hóa có hoạt tính của nó (tức là, AUC_{last}) lớn hơn đáng kể so với hợp chất hoặc tiền dược chất bất kỳ khác được thử nghiệm. Sự thủy phân tiền dược chất nhanh và rộng này tạo ra ưu điểm ý nghĩa và đáng ngạc nhiên đối với hợp chất theo sáng chế. Ở chó, hợp chất 1 phân cắt hiệu quả hơn nhiều so với hợp chất so sánh C5, dẫn đến sự cải thiện gấp hơn 10 lần về tỷ lệ tiếp xúc (177 so với 13). Ngoài ra, hợp chất 1 thậm chí phân cắt hiệu quả hơn nữa khi so với hợp chất so sánh C3 (tỷ lệ tiếp xúc là 177 so với 0). Biên độ của chênh lệch này không thể đoán trước được trên cơ sở so sánh mức độ thủy phân của hợp chất so sánh C5 so với C4 (13 so với 1,2).

Thử nghiệm 4: Sự bài tiết qua thận của hợp chất 1 ở chó săn đực

Một yếu tố quan trọng để đảm bảo việc sử dụng liều được chất thích hợp trong thời gian dài và nồng độ được chất ở trạng thái ổn định chính xác ở bệnh nhân là sự thải trừ được chất. Nhìn chung, sự thải trừ được chất giảm dẫn đến nồng độ được chất cao hơn và tác dụng của được chất mạnh hơn. Để hiểu về sự thải trừ qua thận của hợp chất 1, tỷ lệ phần trăm liều được dùng được thu hồi trong nước tiểu sau một liều IV được đánh giá ở chó săn đực như được mô tả dưới đây.

Chó săn đực (N=3), có khối lượng cơ thể từ 9,58 đến 10,42kg, nhận liều IV 1,0mg/kg hợp chất 1. Hợp chất 1 được bào chế trong NaHCO₃ 5% trong D5W. Chó bị nhịn đói qua đêm và được điều trị trước bằng pentagastrin (60µg/mL, 0,1mL/kg, IM) khoảng 30 phút trước khi sử dụng liều để kích thích sự tiết dịch vị. Cho ăn trở lại khoảng 4 giờ sau khi dùng liều. Các mẫu nước tiểu đã lấy được bao quanh bởi túi đá lạnh trong thời gian lấy. Sau 24 giờ, khối lượng mẫu được ghi lại, các mẫu được trộn kỹ, và các phần phân ước được thu và làm đông lạnh (-80°C) trước khi phân tích sinh học.

Nồng độ của hợp chất 1 trong nước tiểu chó được xác định bằng LC/MS/MS. Các mẫu nghiên cứu nước tiểu (pha loãng trong huyết tương) được xoay và 50µL được đặt trong đĩa 96 giếng. Các mẫu này được chiết bằng axetonitril với chất chuẩn nội chrysin. Dịch chiết được ly tâm và phần dịch nổi trên bề mặt được chuyển vào đĩa 96 giếng mới và được pha loãng 1 phần mẫu trong 4 phần nước với axit formic 0,2%. Các mẫu (12µL) được tiêm lên cột Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1mm, 1,7µm) với tốc độ dòng là 0,9mL/phút. Pha động A gồm có nước:axetonitril:axit formic với tỷ lệ 95:5:0,1 (thể tích:thể tích:thể tích) và pha động B gồm có metanol:axetonitril:axit formic với tỷ lệ 50:50:0,1 (thể tích:thể tích:thể tích). Khoảng thử nghiệm của hợp chất 1 là từ 0,001 đến 5,00 µg/mL.

Lượng nước tiểu trung bình thải ra trong thời gian lấy 24 giờ và tỷ lệ % gần đúng của liều sử dụng được thải vào nước tiểu được báo cáo trong bảng dưới đây.

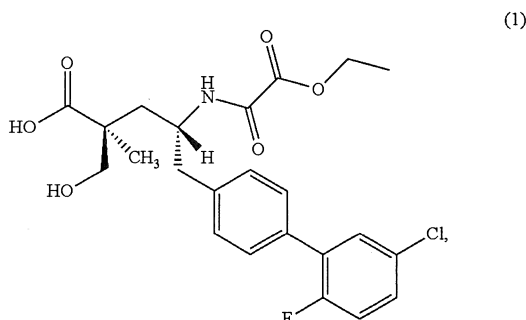
Loài	Lượng sử dụng IV (mg/kg)	Lượng hợp chất 1 được thải vào nước tiểu trong thời gian lấy (0-24 giờ) (µg) Trung bình ^a	Bài tiết nước tiểu (tỷ lệ % gần đúng của liều sử dụng được thải vào nước tiểu) Trung bình ^a
Chó	1,0	28,9	0,284%

^a trung bình của ba lần xác định

Sự bài tiết qua thận của hợp chất 1 ở chó là xấp xỉ $< 0,5\%$ liều được sử dụng.
Dữ liệu này chỉ ra rằng hợp chất 1 có sự bài tiết qua thận thấp ở chó săn đực.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (1):



hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic.

3. Hợp chất canxi (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4-(2-etoxy-2-oxoaxetamido)-2-(hydroxymetyl)-2-metylpentanoat ở dạng tinh thể.

4. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3, trong đó hợp chất ở dạng tinh thể này được đặc trưng bởi mẫu nhiễu xạ bột tia X bao gồm các đỉnh nhiễu xạ ở giá trị 2θ là $7,18 \pm 0,2$, $7,38 \pm 0,2$ và $7,97 \pm 0,2$.

5. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3, trong đó hợp chất ở dạng tinh thể này được đặc trưng bởi mẫu nhiễu xạ bột tia X bao gồm các đỉnh nhiễu xạ ở giá trị 2θ là $3,98 \pm 0,2$, $5,00 \pm 0,2$, $7,18 \pm 0,2$, $7,38 \pm 0,2$, $7,97 \pm 0,2$, $8,87 \pm 0,2$, và $10,91 \pm 0,2$.

6. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 5, trong đó hợp chất ở dạng tinh thể này còn được đặc trưng bởi có một hoặc nhiều đỉnh nhiễu xạ bổ sung ở giá trị 2θ được chọn từ $3,47 \pm 0,2$, $9,99 \pm 0,2$, $15,74 \pm 0,2$, $15,98 \pm 0,2$, và $18,98 \pm 0,2$.

7. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3, trong đó hợp chất ở dạng tinh thể này được đặc trưng bởi mẫu nhiễu xạ bột tia X trong đó các vị trí đỉnh về cơ bản là theo vị trí đỉnh của mẫu được thể hiện trên Fig.1.

8. Hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3, trong đó hợp chất ở dạng tinh thể này được đặc trưng bởi vạch phân tích nhiệt quét vi sai được ghi lại ở tốc độ gia nhiệt là 10°C trong mỗi phút thể hiện tốc độ biến thiên nhiệt lượng thu vào tối đa ở nhiệt độ nằm

trong khoảng từ khoảng 237°C đến khoảng 241°C.

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

10. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3 và một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

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

12. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3 và chất đối kháng thụ thể AT₁, chất ức chế enzym chuyển dạng angiotensin, chất ức chế phosphodiesteraza (PDE), chất ức chế renin, chất lợi niệu, hoặc sự kết hợp của chúng, và tùy ý một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

13. Chế phẩm dạng liều sử dụng bằng đường miệng chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3 ở dạng viên nang, viên nén, chất lỏng hoặc hỗn dịch.

14. Chế phẩm dạng liều sử dụng bằng đường miệng theo điểm 13, trong đó cơ chế giải phóng hợp chất theo điểm 1 hoặc hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3 trong cơ thể đối tượng là giải phóng ngay, giải phóng kiểm soát hoặc giải phóng chậm.

15. Chế phẩm dạng liều sử dụng bằng đường miệng theo điểm 13, trong đó nguyên liệu tạo viên nang là gelatin, polysacarit, chitosan hoặc polyme tổng hợp.

16. Chế phẩm dạng liều sử dụng bằng đường miệng theo điểm 13, trong đó viên nang cứng chứa gelatin, polysacarit, hoặc polyme tổng hợp.

17. Chế phẩm dạng liều sử dụng bằng đường miệng theo điểm 13, trong đó viên nang chứa hydroxypropyl metylxenluloza.

18. Chế phẩm dạng liều sử dụng trong tĩnh mạch chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc hợp chất ở dạng tinh thể theo điểm 3 trong dung dịch được đệm.

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

(a) trộn etanol và oxalyl clorua để tạo ra dung dịch; (b) cho benzyl este của axit (2S,4R)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic

phản ứng với dung dịch này; và (c) kết hợp hỗn hợp tạo thành với paladi trên cacbon trong môi trường hydro để thu được 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) hòa tan etanol trong diclometan;
- (b) bổ sung oxalyl clorua để tạo ra dung dịch và khuấy ở nhiệt độ phòng;
- (c) làm bay hơi dung môi khỏi dung dịch;
- (d) bổ sung dung dịch còn lại vào benzyl este của axit (2S,4R)-4-amino-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic mà trước tiên được hòa tan trong diclometan;
- (e) bổ sung N,N-diisopropyletylamin và khuấy ở nhiệt độ phòng;
- (f) làm bay hơi dung môi để tạo ra chất rắn;
- (g) kết hợp chất rắn với paladi 10% khối lượng trên cacbon trong dung môi để tạo ra hỗn hợp;
- (h) đặt hỗn hợp trong môi trường hydro trong khi khuấy; và
- (i) lọc sạch paladi trên cacbon và làm khô trong chân không để thu được hợp chất theo điểm 1.

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

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

- (a) hòa tan axit (2S,4R)-5-(5'-clo-2'-flobiphenyl-4-yl)-4-(etoxyoxalylamino)-2-hydroxymetyl-2-metylpentanoic trong etanol và N,N-diisopropyletylamin để tạo ra dung dịch A;
- (b) hòa tan canxi triflometan sulfonat trong etanol để tạo ra dung dịch B;
- (c) bổ sung từng giọt dung dịch B vào dung dịch A để tạo ra huyền phù đặc;
- (d) khuấy ở nhiệt độ phòng; và
- (e) tách chất rắn tạo thành để thu được hợp chất dạng tinh thể.

23. Quy trình theo điểm 22, trong đó quy trình này còn bao gồm các bước:

(f) làm lạnh hợp chất ở dạng tinh thể xuống nhiệt độ khoảng 5°C và bổ sung hỗn hợp etanol:nước lạnh trong điều kiện khuấy mạnh; và

(g) lọc và làm khô ở nhiệt độ phòng để thu được hợp chất dạng tinh thể.