



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07D 261/18 (2021.08); A61K 31/42 (2021.08); A61P 9/00 (2021.08); C07B 2200/13 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2018135072, 07.03.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.03.2017Дата регистрации:
28.09.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
08.03.2016 US 62/305,393;
06.06.2016 US 62/346,336

(43) Дата публикации заявки: 08.04.2020 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 28.09.2021 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 08.10.2018(86) Заявка РСТ:
US 2017/021172 (07.03.2017)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/156009 (14.09.2017)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ХЬЮЗ Адам Д. (US),
ФЛЕРИ Мелисса (US),
РАПТА Мирослав (US),
ТАЛЛАДИ Венкат Р. (US),
ФЭСС Джин Тимоти (US),
СИМЕОН Майкл (US),
БОЛДУИН Р. Майкл (US),
БУРДЕ Дэвид Л. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ТЕРЕВАНС БАЙОФАРМА Ар энд Ди
АйПи, ЭлЭлСи (US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2014/025891 A1, 13.02.2014.
MINO R. CAIRA: "Crystalline Polymorphism of
Organic Compounds", TOPICS IN CURRENT
CHEMISTRY, 1998, vol.198, pp.163-208.
SHERRY L. MORISETTE et al.: "High-
throughput crystallization: polymorphs, salts, co-
crystals and solvates of pharmaceutical solids",
Advanced drug delivery reviews, 2004, v.56,
pp.275-300. WO (см. прод.)

(54) КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ (2S,4R)-5-(5'-ХЛОР-2'-ФТОР-[1,1'-БИФЕНИЛ]-4-ИЛ)-2-(ЭТОКСИМЕТИЛ)-4-(3-ГИДРОКСИИЗОКСАЗОЛ-5-КАРБОКСАМИДО)-2-МЕТИЛПЕНТАНОВАЯ КИСЛОТА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения кристаллической формы (2S,4R)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты, включающему (а) образование раствора, включающего (2S,4R)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановую кислоту и

смесь этилацетата и воды, этилацетат или этанол при повышенной температуре; (b) охлаждение раствора до температуры между около -20°C и 5°C; и (c) выделение полученных твердых веществ с получением кристаллической формы. При этом раствор со стадии (a) дополнительно содержит акцептор металлов, такой как SiliaMetS® Thiol. Температура на стадии (a) находится между около 60°C и 95°C. Выделение твердых веществ на

стадии (с) включает фильтрование, промывку одним или несколькими растворителями, сушку на воздухе или в вакууме или комбинацию этих стадий. Сушку в вакууме осуществляют при температуре между 25°C и 70°C. Технический результат - кристаллическая форма (2*S*,4*R*)-5-(5'-

хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты, обладающая стабильностью, высокой температурой плавления и низкой гигроскопичностью. 6 з.п. ф-лы, 10 ил., 9 табл., 6 пр.

(56) (продолжение):

2015/116786 A1, 06.08.2015. ЕА 201101671 A1, 30.07.2012. ЕА 201101672 A1, 29.06.2012.

R U 2 7 5 6 2 2 3 C 2

R U 2 7 5 6 2 2 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07D 261/18 (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07D 261/18 (2021.08); A61K 31/42 (2021.08); A61P 9/00 (2021.08); C07B 2200/13 (2021.08)(21)(22) Application: **2018135072, 07.03.2017**(24) Effective date for property rights:
07.03.2017Registration date:
28.09.2021

Priority:

(30) Convention priority:
08.03.2016 US 62/305,393;
06.06.2016 US 62/346,336(43) Application published: **08.04.2020 Bull. № 10**(45) Date of publication: **28.09.2021 Bull. № 28**(85) Commencement of national phase: **08.10.2018**(86) PCT application:
US 2017/021172 (07.03.2017)(87) PCT publication:
WO 2017/156009 (14.09.2017)Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"

(72) Inventor(s):

HUGHES, Adam D. (US),
FLEURY, Melissa (US),
RAPTA, Miroslav (US),
THALLADI, Venkat R. (US),
FASS, Gene Timothy (US),
SIMEONE, Michael (US),
BALDWIN, R. Michael (US),
BOURDET, David L. (US)

(73) Proprietor(s):

THERAVANCE BIOPHARMA R&D IP, LLC
(US)**(54) CRYSTALLINE (2S,4R)-5-(5'-CHLOR-2'-FLUORO-[1,1'-BIPHENYL]-4-YL)-2-(ETHOXYMETHYL)-4-(3-HYDROXYISOXAZOL-5-CARBOXAMIDO)-2-METHYLPENTANIC ACID AND ITS APPLICATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a method for producing a crystalline form of (2S,4R)-5-(5'-chlor-2'-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(ethoxymethyl)-4-(3-hydroxyisoxazol-5-carboxamido)-2-methylpentanic acid, including (a) forming a solution including (2S,4R)-5-(5'-chlor-2'-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(ethoxymethyl)-4-(3-hydroxyisoxazol-5-carboxamido)-2-methylpentanic acid and a mixture of ethyl acetate and water, ethyl acetate or ethanol at an increased temperature; (b) cooling the solution to a temperature

between about -20°C and 5°C; and (c) isolating obtained solids with obtaining a crystalline form. The solution from the stage (a) additionally contains a metal acceptor, such as SiliaMetS® Thiol. A temperature at the stage (a) is between about 60°C and 95°C. Isolating solids at the stage (c) includes filtering, washing with one or several solvents, drying in the air or in a vacuum or a combination of these stages. Drying in a vacuum is carried out at a temperature between 25°C and 70°C.

EFFECT: crystalline form of (2S,4R)-5-(5'-chlor-2'-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(ethoxymethyl)-4-(3-

hydroxyisoxazol-5-carboxamido)-2-methylpentanic
acid having stability, high melting point and low

hygroscopicity.
7 cl, 10 dwg, 9 tbl, 6 ex

R U 2 7 5 6 2 2 3 C 2

R U 2 7 5 6 2 2 3 C 2

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество предварительных заявок США №№ 62/305393 и 62/346336, поданных 8 марта 2016 года и 6 июня 2016 года, соответственно, полное раскрытие которых включено в настоящую заявку посредством ссылки.

5 Предпосылки создания изобретения

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новой кристаллической форме, обладающей неприлизин-ингибирующей активностью. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим соединение, способам для получения
10 соединения и способам применения соединения для лечения заболеваний, таких как гипертензия, сердечная недостаточность и почечное заболевание.

Известный уровень техники

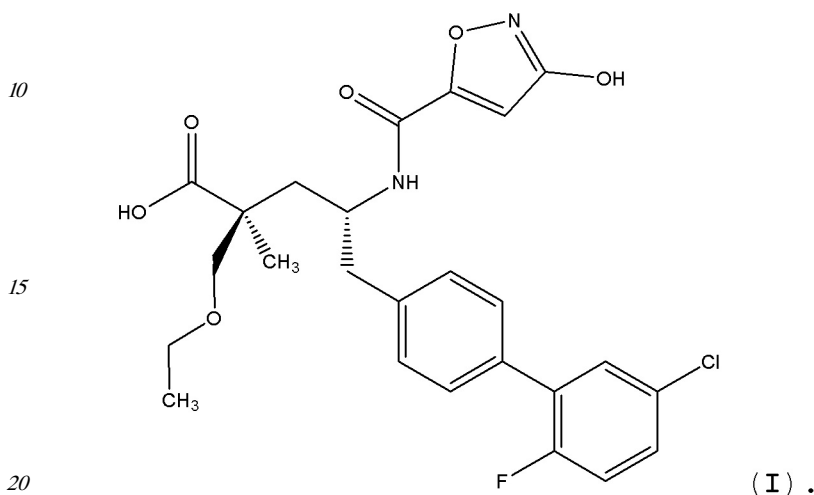
Неприлизин (нейтральная эндопептидаза, ЕС 3.4.24.11) (NEP) представляет собой связанную с эндотелиальной мембраной Zn^{2+} металлопептидазу, обнаруженную во
15 многих органах и тканях, включая головной мозг, почки, легкие, желудочно-кишечный тракт, сердце и периферическую сосудистую сеть. NEP деградирует и инактивирует ряд эндогенных пептидов, таких как энкефалины, циркулирующий брадикинин, ангиотензиновые пептиды и натрийуретические пептиды, последние из которых
20 обладают несколькими эффектами, включая, например, вазодилатацию и натрийурез/диурез, а также ингибирование сердечной гипертрофии и вентрикулярного фиброза. Таким образом, NEP играет важную роль в гомеостазе кровяного давления и здоровье сердечно-сосудистой системы.

Ингибиторы NEP, такие как тиорфан, кандоксантрил и кандоксантрилат, были исследованы как потенциальные терапевтические средства. Известны также соединения,
25 которые ингибируют как NEP, так и ангиотензин-1 превращающий фермент (ACE), и они включают омапатрилат, гемпатрилат и сампатрилат. Указанные как ингибиторы вазопептидазы, этот последний класс соединений описан в Robl et al. (1999) Exp. Opin. Ther. Patents 9 (12): 1665-1677.

Многочисленные ингибиторы NEP описаны в патенте США № 9126956 на имя Fleury
30 et al. Многие из этих соединений обладают одним или несколькими желательными свойствами. Однако для эффективного использования соединения-ингибитора NEP в качестве терапевтического средства было бы желательно иметь твердую форму, которую можно легко получить и которая обладает приемлемой химической и физической
35 стабильностью. Например, было бы очень желательно иметь физическую форму, которая является термически стабильной при достаточно высокой температуре, облегчая, таким образом, обработку и хранение вещества, а также небольшой размер кристалла, который повышает растворение, биодоступность и абсорбцию, обеспечивая, таким образом, выгодные характеристики доставки лекарственного средства.
40 Кристаллические твердые вещества обычно предпочтительны по сравнению с аморфными формами для повышения чистоты и стабильности готового продукта. Однако образование кристаллических форм органических соединений крайне непредсказуемо. Не существует надежных методов предсказания, какая форма органического соединения, если вообще таковая будет, будет кристаллической. Более того, не существует способов, предсказывающих, какая кристаллическая форма, если
45 вообще таковая будет, будет иметь физические свойства, необходимые для использования в качестве фармацевтических средств. Соответственно, существует потребность в стабильной кристаллической форме, которая имеет достаточно высокую температуру плавления и небольшой размер кристалла.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение обеспечивает новую кристаллическую форму Соединения I, которая, как было обнаружено, обладает активностью, ингибирующей фермент неприлизин (NEP). Соответственно, ожидают, что это соединение будет полезным и эффективным в качестве терапевтического средства для лечения состояний, таких как гипертензия, легочная гипертензия, сердечная недостаточность и почечное заболевание. Структура Соединения I следующая:



Один аспект изобретения относится к кристаллической свободной кислотной форме (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты (Соединение I'). В одном варианте осуществления Соединение I' является безводным, негигроскопичным или имеет обе эти характеристики. Соединение I' также может быть указано как кристаллическая форма I'.

Другой аспект изобретения относится к фармацевтическим композициям, включающим один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и Соединение I'. Такие композиции необязательно могут содержать другие терапевтические средства, включая, но не ограничиваясь этим, антагонист АТ₁ рецептора, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, ингибитор фосфодиэстеразы (PDE), ингибитор ренина, диуретик или их комбинации.

Соединение I' по изобретению обладает ингибирующей NEP фермент активностью, и поэтому ожидают, что оно будет полезным в качестве терапевтического средства для лечения пациентов, страдающих заболеванием или расстройством, которое лечат путем ингибирования NEP фермента или путем повышения уровней его пептидных субстратов. Таким образом, один аспект изобретения относится к способу лечения пациентов, страдающих заболеванием или расстройством, которое лечат путем ингибирования NEP фермента, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества Соединения I'. Другой аспект изобретения относится к способу лечения гипертензии, легочной гипертензии, сердечной недостаточности или почечного заболевания, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества Соединения I'. Еще один аспект изобретения относится к способу для ингибирования NEP фермента у субъекта, включающему введение субъекту ингибирующего NEP фермент количества Соединения I'.

Еще один аспект изобретения относится к способам, полезным для получения Соединения I и его кристаллической формы - Соединения I'.

Еще один аспект изобретения относится к применению Соединения I и его

кристаллической формы - Соединения I' для получения лекарственного средства, в частности, для получения лекарственного средства, полезного для лечения гипертензии, сердечной недостаточности или почечного заболевания. Другой аспект изобретения относится к применению Соединения I или Соединения I' для ингибирования NEP фермента у субъекта. Другие аспекты и варианты осуществления изобретения раскрыты в настоящей заявке.

Краткое описание чертежей

Различные аспекты настоящего изобретения проиллюстрированы посредством ссылки на прилагаемые чертежи.

Фиг. 1 показывает порошковую рентгеновскую дифрактограмму (PXRD) кристаллической (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты (I').

Фиг. 2 показывает термограмму, полученную методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), кристаллической формы (I').

Фиг. 3 показывает полученный термогравиметрическим методом профиль для кристаллической формы (I').

Фиг. 4 показывает полученную методом динамической сорбции влаги (DMS) изотерму кристаллической формы (I').

Фиг. 5 представляет изображение, полученное при помощи микроскопа в поляризованном свете (PLM), кристаллической формы (I').

Фиг. 6 показывает изменение от исходного уровня средней концентрации в плазме сGMP (нМ) у здоровых субъектов, либо вообще не принимающих, либо принимающих разовую дозу 50 мг, 100 мг, 200 мг, 400 мг и 600 мг в течение 24 часов.

Фиг. 7 иллюстрирует n-кратное изменение в сGMP от исходного уровня против дозы (мг) для данных, полученных в исследовании действия однократных нарастающих доз.

Фиг. 8 представляет концентрацию Соединения I (нг/мл) против времени (час) для данных, полученных в исследовании действия однократных нарастающих доз.

Фиг. 9 показывает % выведения почками сакубитрила против Соединения I у здоровых субъектов.

Фиг. 10 показывает изменение от исходного уровня средней концентрации в плазме сGMP (нМ) к дню 14 у здоровых взрослых и пожилых субъектов, либо вообще не принимающих, либо принимающих разовую дозу 10 мг, 50 мг, 100 мг и 200 мг в течение 24 часов.

Подробное описание изобретения

В одном аспекте изобретение относится к кристаллической (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоте (I').

Соединение I' по изобретению содержит два хиральных центра, и поэтому соединение такой структуры может существовать в различных стереоизомерных формах. В частности, атомы углерода могут иметь определенную (R,R), (S,S), (S,R) или (R,S) конфигурацию или обогащены стереоизомерной формой, имеющей такую конфигурацию. Соединение I', как оно показано и названо, находится в (2*S*,4*R*) конфигурации.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что незначительные количества других стереоизомеров могут присутствовать в композициях по изобретению, если не указано иное, при условии, что полезность композиции в целом не устраняется наличием таких других изомеров. Индивидуальные стереоизомеры можно получить различными способами, хорошо известными в данной области, включая хиральную хроматографию с использованием подходящей хиральной стационарной фазы или носителя, или путем

их химического преобразования в диастереоизомеры, разделения диастереоизомеров обычными способами, такими как хроматография или перекристаллизация, затем восстановления исходного стереоизомера.

Соединение I' по изобретению обладает неприлизин (NEP)-ингибирующей активностью, то есть соединение способно ингибировать каталитическую активность фермента. Одним из показателей способности соединения ингибировать активность NEP является константа ингибирования (pK_i). Значение pK_i представляет собой отрицательный логарифм по основанию 10 константы диссоциации (K_i), который обычно представляют в молярных единицах. Соединение по изобретению имеет pK_i при $NEP \geq 9,0$. Другие свойства и применения Соединения I' могут быть продемонстрированы с использованием анализов *in vitro* и *in vivo*, которые хорошо известны специалистам в данной области, включая, среди прочего, те, которые описаны в патенте США № 9126956.

Соединение I', а также те соединения, которые используются в его синтезе, могут также включать изотопно-меченные соединения, то есть когда один или несколько атомов обогащены атомами, имеющими атомную массу, отличную от атомной массы, преимущественно встречающейся в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения, описанные в настоящем изобретении, например, включают, но не ограничиваются этим, 2H , 3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{36}Cl и ^{18}F . Особый интерес представляет Соединение I', обогащенное тритием или углеродом-14, которое можно использовать, например, в исследованиях распределения тканей; Соединение I', обогащенное дейтерием, особенно на участке метаболизма, что приводит, например, к соединению, имеющему большую метаболическую стабильность; и Соединение I', обогащенное позитрон-испускающим изотопом, таким как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , которое можно использовать, например, в методах позитронно-эмиссионной томографии (PET).

В настоящей заявке химические структуры названы в соответствии с номенклатурой IUPAC, реализованной в программе ChemDraw (Perkin Elmer, Inc., Cambridge, MA).

Определения

При описании соединения, композиций, способов и процессов изобретения следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Кроме того, как используется в настоящей заявке, формы единственного числа, указанные артиклями «a», «an» и «the», включают соответствующие формы множественного числа, если контекст, в котором они используются явно не диктует иное. Предполагается, что термины «включающий», «включая» и «содержащий» являются инклюзивными и означают, что могут быть дополнительные элементы, кроме перечисленных элементов. Все числа, выражающие количества ингредиентов, свойства, такие как молекулярная масса, реакционные условия и т.д., используемые в настоящей заявке, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около», если не указано иное. Соответственно, цифровые значения, приведенные в настоящей заявке, являются приближениями, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которые необходимо получить в соответствии с настоящим изобретением. По меньшей мере, но не в качестве попытки ограничения применения доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждое числовое значение должно, по меньшей мере, истолковываться в свете значащих цифр и с применением обычных методов округления.

Термин "около" или "приблизительно" при использовании в контексте теплового поведения Соединения I' определяется как $\pm 1-3^\circ C$. Термин "приблизительный" при использовании в контексте % дозы Соединения I', выделяемого в моче, определяется пределом погрешности, который обычно примерно в два раза превышает стандартное

отклонение или составляет половину ширины 95-процентного доверительного интервала. Термин "приблизительный" в других областях настоящего раскрытия может использоваться для обозначения стандартного отклонения или величины изменения или дисперсии набора данных.

5 Термин «контролируемое высвобождение» в контексте настоящей заявки является синонимом пролонгированного высвобождения и длительного высвобождения и относится к количеству лекарственного средства, доставляемому субъекту в течение длительного периода времени. Как правило, таблетки и капсулы с контролируемым высвобождением высвобождают активное вещество в течение периода времени
10 приблизительно 8, 12, 16 и 24 часов. С другой стороны, термин «немедленное высвобождение» относится к активному высвобождению в организме субъекта в течение небольшого периода времени, обычно менее чем за 30 минут. Термин «замедленное высвобождение» относится к таблеткам и капсулам, которые высвобождают фармацевтическую дозу через определенный промежуток времени. Эти лекарственные
15 формы обычно имеют энтеросолюбильное покрытие, чтобы предотвратить высвобождение в желудке, но обеспечить высвобождение в кишечнике.

Фраза «в соответствии с формулой» или «имеющий формулу» или «имеющий структуру» в контексте настоящей заявки не предназначена для ограничения и используется так же, как обычно используется термин «включающий». Например, если
20 изображена одна структура, то подразумевается, что охватываются все стереоизомерные и таутомерные формы, если не указано иное.

Как правило, при описании фармацевтических твердых веществ термин «несольватированный» подразумевает «без растворителя». Таким образом, когда кристаллическая форма по изобретению описывается как «несольватированная»,
25 подразумевается, что кристаллические частицы по существу содержат только молекулы (2S,4R)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты; форма не содержит значительных количеств других молекул, включенных в решетку, или, другими словами, растворитель не включен в кристаллическую решетку. Термин «несольватированный» является
30 синонимом термина «негидратированный», когда растворителем является вода. Термин «безводный» означает, что кристалл содержит от ничтожно малого до вообще никакого количества воды, в частности, воды кристаллизации. Ничтожно малое количество воды означает предел детекции, когда воду можно измерить. Например, измерение содержания воды по Карлу Фишеру (% масс./масс.) в настоящей заявке может иметь предел
35 количественной оценки (LOQ) 0,20% масс./масс. Следовательно, количество воды, содержащейся в Соединении I', будет указано как <LOQ или <0,20% масс./масс. Кроме того, гигроскопичное вещество представляет собой вещество, которое легко притягивает воду из его окружения путем абсорбции или адсорбции. Термин «негигроскопичный» используется для описания кристаллов, которые практически не склонны адсорбировать
40 влагу на своей поверхности или абсорбировать воду в кристаллическую решетку.

Термин "температура плавления" в контексте настоящей заявки означает температуру, при которой максимальный эндотермический тепловой поток наблюдают при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии, для теплового перехода, который соответствует фазовому изменению твердой фазы в жидкость.

45 Термин «фармацевтически приемлемый» относится к веществу, которое не является биологически или иным образом неприемлемым при использовании в изобретении. Например, термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к веществу, которое можно включить в композицию и вводить пациенту, не вызывая неприемлемых

биологических эффектов, или которое не взаимодействует неприемлемым образом с другими компонентами композиции. Такие фармацевтически приемлемые вещества обычно удовлетворяют требуемым стандартам токсикологических и производственных испытаний и включают вещества, которые были идентифицированы как подходящие неактивные ингредиенты Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, полученную из основания или кислоты, которая приемлема для введения пациенту, такому как млекопитающее (например, соли, имеющие приемлемую безопасность для млекопитающих при данном режиме дозирования). Однако понятно, что соли, охватываемые изобретением, необязательно должны быть фармацевтически приемлемыми солями, например, соли промежуточных соединений, которые не предназначены для введения пациенту.

Фармацевтически приемлемые соли могут быть получены из фармацевтически приемлемых неорганических или органических оснований и из фармацевтически приемлемых неорганических или органических кислот. Кроме того, когда соединение содержит как щелочную группу, такую как амин, пиридин или имидазол, так и кислотную группу, такую как карбоновая кислота или тетразол, могут быть образованы цвиттерионы, и они охватываются термином «соль», как используется в настоящей заявке. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых неорганических оснований, включают соли аммония, кальция, меди, трехвалентного железа, двухвалентного железа, лития, магния, трехвалентного марганца, двухвалентного марганца, калия, натрия и цинка и т.п. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических оснований, включают соли первичных, вторичных и третичных аминов, включая замещенные амины, циклические амины, природные амины и т.п., такие как аргинин, бетаин, кофеин, холин, N,N'-добензилэтилендиамин, диэтиламин, 2-диэтиламиноэтанол, 2-диметиламиноэтанол, этаноламин, этилендиамин, N-этилморфолин, N-этилпиперидин, глюкамин, глюкозамин, гистидин, гидабамин, изопропиламин, лизин, метилглюкамин, морфолин, пиперазин, пиперадин, полиаминовые смолы, прокаин, пурины, теобромин, триэтиламин, триметиламин, трипропиламин, трометамин и т.п. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых неорганических кислот, включают соли борной, угольной, галогеноводородных (бромистоводородной, хлористоводородной, фтористоводородной или иодистоводородной), азотной, фосфорной, сульфаминовой и серной кислот. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических кислот, включают соли алифатических гидроксильных кислот (например, лимонной, глюконовой, гликолевой, молочной, лактобионной, яблочной и винной кислоты), алифатических монокарбоновых кислот (например, уксусной, масляной, муравьиной, пропионовой и трифторуксусной кислот), аминокислот (например, аспарагиновой и глутаминовой кислот), ароматических карбоновых кислот (например, бензойной, п-хлорбензойной, дифенилуксусной, гентизиновой, гиппуриновой и трифенилуксусной кислот), ароматических гидроксильных кислот (например, о-гидроксibenзойной, п-гидроксibenзойной, 1-гидрокси-нафталин-2-карбоновой и 3-гидрокси-нафталин-2-карбоновой кислот), аскорбиновой, дикарбоновых кислот (например, фумаровой, малеиновой, щавелевой и янтарной кислот), глюкокуроновой, миндальной, муциновой, никотиновой, памовой, пантотеновой, сульфоновых кислот (например, бензолсульфоновой, камфосульфоновой, эдизиловой, этансульфоновой, изетионовой, метансульфоновой, нафталинсульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, нафталин-2,6-дисульфоновой и п-толуолсульфоновой кислот), ксинафоевой кислоты и т.п.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество, достаточное

для лечения при введении пациенту, нуждающемуся в этом, то есть количество лекарственного средства, необходимое для получения желаемого терапевтического эффекта. Например, терапевтически эффективное количество для лечения гипертензии представляет собой количество соединения, необходимое, например, для уменьшения, подавления, устранения или предотвращения симптомов гипертензии или для лечения основной причины гипертензии. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество лекарственного средства, необходимое для снижения артериального давления, или количество лекарственного средства, необходимое для поддержания нормального кровяного давления. С другой стороны, термин «эффективное количество» означает количество, достаточное для получения желаемого результата, который необязательно может быть терапевтическим результатом. Например, при исследовании системы, содержащей NER фермент, «эффективное количество» может быть количеством, необходимым для ингибирования фермента.

Термин «лечащий» или «лечение» в контексте настоящей заявки означает лечение заболевания или медицинского состояния (такого как гипертензия) у пациента, такого как млекопитающее (в частности, человек), которое включает одно или несколько из следующих: (а) предотвращение возникновения заболевания или медицинского состояния, т.е. предотвращение повторного возникновения заболевания или медицинского состояния или профилактическое лечение пациента, который предрасположен к заболеванию или медицинскому состоянию; (b) улучшение заболевания или медицинского состояния, то есть устранение или индукция регрессии заболевания или медицинского состояния у пациента; (с) подавление заболевания или медицинского состояния, то есть замедление или остановка развития заболевания или медицинского состояния у пациента; или (d) облегчение симптомов заболевания или медицинского состояния у пациента. Например, термин «лечение гипертензии» будет включать предотвращение возникновения гипертензии, улучшение артериальной гипертензии, подавление гипертензии и облегчение симптомов гипертензии (например, снижение артериального давления). Термин «субъект» или «пациент» предназначен для включения тех млекопитающих, таких как люди, которые нуждаются в лечении или профилактике заболеваний или которые в настоящее время принимают лечение для профилактики или лечения конкретного заболевания или медицинского состояния, а также испытуемых субъектов, на которых кристаллическое соединение оценивается или используется в анализе, например, животных моделей.

Предполагается, что все другие термины, используемые в настоящей заявке, имеют обычное значение, понятное специалистам в данной области техники.

Общие процедуры синтеза

Кристаллическую форму Соединения I по изобретению можно синтезировать из легко доступных исходных веществ, как описано ниже и в примерах. Понятно, что в тех случаях, когда указаны типичные или предпочтительные условия обработки (т.е. температуры реакции, температуры кристаллизации, время, мольные отношения реагентов, растворители, давление и т.д.), можно использовать другие условия обработки, если не указано иное. В некоторых случаях реакции или процедуры кристаллизации осуществляли при комнатной температуре, и фактическое измерение температуры не проводилось. Понятно, что комнатная температура означает температуру в пределах, обычно связанных с температурой окружающей среды в лабораторной среде, и обычно будет находиться в диапазоне от около 15°C до около 30°C, например, от около 20°C до около 25°C. В других случаях реакции или процедуры

кристаллизации осуществляли при комнатной температуре и действительно измеряли и регистрировали температуру.

Любые молярные отношения, описанные в способах по изобретению, легко можно определить различными способами, доступными специалистам в данной области.

5 Например, такие молярные отношения легко можно определить при помощи ^1H ЯМР. Альтернативно, для определения молярного отношения можно использовать элементный анализ и методы ВЭЖХ.

В одном варианте осуществления Соединение I можно получить путем (а) взаимодействия бензил (2*S*,4*R*)-4-амино-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-
10 (этоксиметил)-2-метилпентаноат гидрохлорида с 3-((4-метоксибензил)окси)изоксазол-5-карбоновой кислотой в растворителе приблизительно в 1:1 молярном соотношении с получением бензил (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-((4-метоксибензил)окси)изоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентаноата; и (б) снятия
15 защиты бензил (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-((4-метоксибензил)окси)изоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентаноата с получением (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты (I).

В одном варианте осуществления стадия (а) дополнительно включает добавление агента пептидного связывания и основания приблизительно в 1:3:1:1 молярном
20 соотношении связывающего агента, основания, бензил (2*S*,4*R*)-4-амино-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-2-метилпентаноат гидрохлорида и 3-((4-метоксибензил)окси)изоксазол-5-карбоновой кислоты. Репрезентативные примеры агентов пептидного связывания включают, но не ограничиваются этим, О-(бензотриазол-1-ил)-
25 N,N,N',N'-тетраметилуроний гексафторфосфат (HBTU), О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний тетрафторборат (TBTU), О-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний гексафторфосфат (HATU), О-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний тетрафторборат (TATU), О-(6-хлорбензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний гексафторфосфат (HCTU) и О-[(этоксикарбонил)цианометиленамино]-N,N,N',N'-тетраметилуроний тетрафторборат (TOTU). В
30 предпочтительном варианте осуществления агент пептидного связывания представляет собой HATU, HBTU и HCTU, при этом HCTU является наиболее предпочтительным. Примером основания, которое можно использовать в реакции, является DIPEA.

В другом варианте осуществления стадию снятия защиты (б) осуществляют с использованием палладиевого катализатора, например, палладия на углероде (5% или
35 10% масс/масс) и газообразного водорода. В дополнительных вариантах осуществления следующие стадии можно осуществить после стадии (б). Палладиевый катализатор удаляют с последующим добавлением окислителя, такого как пероксид водорода. Реакционную смесь затем можно перемешивать по меньшей мере в течение 1 часа или предпочтительно 2 часов при температуре между около 20°C и 30°C. После этой стадии
40 можно осуществить дистилляцию и промывку один или несколько раз и, необязательно, охлаждение и старение перед выделением Соединения I.

В одном варианте осуществления изобретение относится к кристаллической форме (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты (I'). В другом варианте осуществления
45 кристаллическая форма является безводной, негигроскопичной или имеет обе эти характеристики.

Получение кристаллической формы I', как правило, осуществляют в подходящем инертном разбавителе, примеры которого включают, но не ограничиваются этим,

ацетон, ацетонитрил, этилацетат, метилэтилкетон, метанол, этанол, изопропанол, изобутанол, дихлорметан, метил *трет*-бутиловый эфир, циклопентилметилловый эфир, гексан и т.п. и их смеси, необязательно содержащие воду. Смеси инертных разбавителей (также указаны как системы растворителей) включают ацетон с водой, ацетонитрил с
 5 водой, этанол и этилацетат, этилацетат и гексан и низшие спирты (C_{1-6} алкил-ОН) с водой, например, метанол и воду, изопропанол и воду. Особенно подходящие системы растворителей включают этилацетат и воду. После завершения кристаллизации кристаллическое соединение можно выделить из реакционной смеси обычными способами, такими как осаждение, фильтрование, концентрирование,
 10 центрифугирование, сушка в вакууме и т.п.

В одном варианте осуществления кристаллическую форму I' можно получить путем (а) образования раствора, включающего (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановую кислоту (Соединение I) с растворителем, необязательно содержащего металл-акцептор, при
 15 повышенной температуре; (b) охлаждения раствора до температуры между около -20°C и 5°C; и (с) выделения полученных твердых веществ с получением кристаллической формы I'. В другом варианте осуществления способ дополнительно включает перемешивание или взбалтывание раствора при температуре между около -20°C и 5°C.

Стадию (а), как правило, осуществляют при комнатной температуре в полярном
 20 растворителе. Полярный растворитель может быть протонным или апротонным и включает, например, смесь этилацетата и воды, этилацетат или этанол. Повышенная температура на стадии (а) типично находится между около 60°C и 95°C, и предпочтительно между 70°C и 85°C, 70°C и 80°C или 75°C и 85°C. Стадия выделения (с) включает фильтрование, промывку одним или несколькими растворителями, сушку
 25 на воздухе или в вакууме или комбинацию этих стадий. Если Соединение I' или кристаллическую форму I' сушат в вакууме, это можно осуществить при температуре между 25°C и 70°C, предпочтительно между 30°C и 60°C, 30°C и 50°C, 40°C и 60°C или 40°C и 50°C.

В другом варианте осуществления способ дополнительно включает стадию
 30 перемешивания смеси при температуре между 0°C и 30°C по меньшей мере в течение 5 минут перед повышением температуры до температуры между около 60°C и 95°C. Альтернативно, перемешивание можно осуществить при температуре между 25°C и 35°C по меньшей мере в течение 1 часа.

Еще в одном варианте осуществления смесь дополнительно подвергают осаждению
 35 и верхнюю не-водную фазу отделяют перед повышением температуры. Альтернативно, смесь фильтруют, промывают и уменьшают в объеме перед повышением температуры.

Еще в одном варианте осуществления температура на стадии (b) способа, описанного выше, независимо находится между -15°C и -5°C или, альтернативно, независимо между
 40 -5°C и 5°C.

Кристаллические свойства

Как хорошо известно в области рентгеновской порошковой дифракции (PXRD), относительная высота пиков PXRD образцов зависит от ряда факторов, связанных с подготовкой образца и геометрией инструмента, тогда как положения пиков относительно нечувствительны к экспериментальным деталям. PXRD,
 45 дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC), термогравиметрический анализ (TGA) и оценку динамической сорбции влаги (DMS) (также известную как анализ сорбции-десорбции влаги) осуществляли, как описано в настоящей заявке.

В одном аспекте изобретение относится к кристаллической форме (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-

2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты (I') и характеризуется рентгеновской порошковой дифрактограммой, в которой положения пиков по существу соответствуют показанным на Фиг. 1.

5 Пики с относительной интенсивностью более 1% по площади приведены в таблице ниже. Эта картина показывает резкие дифракционные пики в диапазоне 5-35° в 2θ. Эти и другие пики в дифракционной картине могут быть использованы для идентификации этой формы.

10 Пики с относительными интенсивностями больше чем 1% в площади перечислены в таблице ниже. Эта картина показывает резкие дифракционные пики в диапазоне 5-35° в 2θ. Эти и другие пики в картине дифракции можно использовать для идентификации этой формы.

	2θ*	d (Å)	Площадь	Площадь%
15	6,51	13,57	10871,5	100
	11,17	7,92	199,4	1,8
	11,62	7,61	2441,7	22,5
	13,05	6,78	2380,2	21,9
	15,07	5,88	3944,4	36,3
	15,72	5,63	1321,5	12,2
20	17,12	5,18	2026,8	18,6
	17,12	5,18	2026,8	18,6
	18,77	4,72	979,9	9,0
	19,63	4,52	585,3	5,4
	20,79	4,27	1339,1	12,3
	21,10	4,21	1192,2	11,0
25	22,38	3,97	814,6	7,5
	23,28	3,82	6169,3	56,7
	23,89	3,72	840,8	7,7
	24,48	3,63	1053,9	9,7
	25,17	3,54	281,4	2,6
	25,81	3,45	1604,8	14,8
30	26,19	3,40	1943,7	17,9
	27,05	3,29	181,9	1,7
	28,11	3,17	363,1	3,3
	28,76	3,10	176,1	1,6
	29,21	3,06	372,8	3,4
	30,29	2,95	1003,4	9,2
35	31,76	2,816	486,3	4,5

*2θ значения указаны как значение $\pm 0,20$.

Таким образом, в одном варианте осуществления кристаллическая форма I' характеризуется рентгеновской порошковой дифрактограммой, включающей дифракционные пики при 2θ значениях 6,51 $\pm 0,20$, 11,62 $\pm 0,20$, 13,05 $\pm 0,20$, 15,07 $\pm 0,20$ и 23,28 $\pm 0,20$.

В другом варианте осуществления кристаллическая форма I' характеризуется рентгеновской порошковой дифрактограммой, включающей дифракционные пики при 2θ значениях 6,51 $\pm 0,20$, 11,62 $\pm 0,20$, 13,05 $\pm 0,20$, 15,07 $\pm 0,20$, 17,12 $\pm 0,20$, 23,28 $\pm 0,20$ и 26,19 $\pm 0,20$.

45 В другом варианте осуществления кристаллическая форма I' дополнительно характеризуется тем, что имеет один или несколько дополнительных дифракционных пиков при 2θ значениях, выбранных из 6,51 $\pm 0,20$, 11,62 $\pm 0,20$, 13,05 $\pm 0,20$, 15,07 $\pm 0,20$, 15,72 $\pm 0,20$, 17,12 $\pm 0,20$, 20,79 $\pm 0,20$, 21,10 $\pm 0,20$, 23,28 $\pm 0,20$, 24,48 $\pm 0,20$, 25,81 $\pm 0,20$ и

26,19±0,20; и еще в одном варианте осуществления кристаллическое соединение дополнительно характеризуется тем, что имеет три или больше таких дополнительных дифракционных пиков.

В одном варианте осуществления кристаллическая форма I' характеризуется DSC термограммой или кривой дифференциальной сканирующей калориметрии по существу в соответствии с показанной на Фиг. 2. Кристаллическая форма I' характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, полученной при скорости нагрева 10°C в минуту, которая показывает максимум в эндотермическом тепловом потоке при температуре между около 214°C и около 218°C. Термограмма DSC или кривая дифференциальной сканирующей калориметрии иллюстрирует эндотерму плавления с пиком при около 216,1°C, началом при 214,2°C и площадью под эндотермой, соответствующей 107,2 Дж/г. Разложение соединения совпадает с плавлением, и вклад 107,2 Дж/г в энтальпию плавления не установлен.

В одном варианте осуществления кристаллическая форма I' характеризуется профилем TGA на Фиг. 3. Этот профиль не показывает никакую потерю массы до примерно 240°C; кристаллическое соединение разлагается после плавления, что видно из значительного снижения массы, возникающего в начале плавления приблизительно при 242°C. Нет никакой дополнительной потери массы до температуры разложения, что указывает на отсутствие адсорбированных молекул, таких как вода.

В одном варианте осуществления кристаллическая форма I' характеризуется изотермой DMS на Фиг. 4. Эта форма представляет собой негигроскопичное твердое вещество. Наблюдаемое общее приращение влаги составляет менее 0,02% масс. при относительной влажности 5-90%. Никакого значительного гистерезиса не обнаружено между двумя последовательными циклами сорбции-десорбции. Твердое вещество, полученное после циклов сорбции-десорбции, показало ту же картину PXRD, что и исходное вещество, что указывает на отсутствие изменения формы после этого эксперимента. Эти данные показывают, что кристаллическая форма I' не преобразуется в гидратированную форму в присутствии воды. Кристаллическая форма I' остается негигроскопичной и поэтому может быть охарактеризована как безводная, негигроскопическая или как обладающая и той и другой характеристикой.

Кристаллическая форма I' может быть охарактеризована PLM изображением на Фиг. 5, которое показывает эту форму как кристаллические, двулучепреломляющие, пластинчатые частицы.

Применимость

In vitro-в-in-vivo экстраполяция поведения лекарственного средства в организме субъекта продолжает улучшаться (см., например, Chiba et al., AAPS J., 2009 June, 11 (2): 262-276). В настоящем изобретении оценивали активность ингибитора человеческого неприлизина in vitro, чтобы определить неприлизин-ингибирующую активность соединения I и кристаллической формы I'. Достигался порог $pK_i \geq 9,0$. Однако затем осуществляли дополнительные эксперименты in vivo для более точного прогнозирования поведения соединения I и кристаллической формы I' в организме субъекта.

Что касается поведения in vivo, существует несколько свойств, которые полезны при оценке того, будет ли доставлено достаточное количество лекарственного средства в плазму для достижения необходимой терапевтической пользы, такой как низкий плазматический клиренс для всех испытываемых соединений, высокая пероральная биодоступность, благоприятное потенцирование ответа циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) и низкий почечный клиренс для пациентов с нарушенной функцией почек.

Для настоящего изобретения, исследования фармакокинетики при пероральном и внутривенном введении осуществляли на таких видах, как крысы, собаки и обезьяны, для определения пероральной биодоступности соединения I, то есть растворимой формы соединения I' (анализ 1). Этот анализ также использовали для определения скорости плазменного клиренса для этих соединений; считается, что низкая скорость клиренса предсказывает, насколько долго соединение может оставаться в кровотоке, то есть его стабильность и стойкость *in vivo* без идентификации отдельных процессов элиминирования.

Фармакокинетические/фармакодинамические исследования осуществляли на людях для определения уровня ингибирования неприлизина, который достигается с использованием соединения I (анализ 3). В этом анализе измеряли уровень циклического гуанозинмонофосфата (сGMP). сGMP является эффекторной молекулой на пути ниже от связывания натрийуретического пептидного рецептора и, таким образом, служит эффективным биомаркером *in vivo* активности натрийуретического пептида. Уровень сGMP увеличивается, когда животному вводят ингибитор неприлизина, по сравнению с плацебо. Один из вариантов осуществления изобретения относится к способу повышения уровня атриального натрийуретического пептида (ANP) или базального уровня сGMP у субъекта с гипертензией, сердечной недостаточностью или почечной недостаточностью, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения I или кристаллической формы I'. Уровни ANP и сGMP измеряют либо в моче, либо в плазме, либо и в моче и в плазме, у субъекта. В другом варианте осуществления уровень ANP или сGMP повышается по меньшей мере $\geq 1,1$ -кратно, $\geq 1,2$ -кратно, $\geq 1,3$ -кратно, $\geq 1,4$ -кратно, $\geq 1,5$ -кратно, ≥ 2 -кратно, ≥ 3 -кратно, ≥ 4 -кратно или ≥ 5 -кратно в течение 24-часового периода у субъекта при введении терапевтически эффективного количества соединения I или кристаллической формы I'. В другом аспекте изобретение относится к способу увеличения количества циклического гуанозинмонофосфата в плазме человека, при этом способ включает введение человеку кристаллической свободной кислотной формы. В одном аспекте изобретение относится к снижению кровяного давления у человека, при этом способ включает введение человеку снижающего кровяное давление количества кристаллической свободной кислотной формы (2S,4R)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты.

Кристаллическая форма I', которая растворяется до ее растворимой формы, т.е. Соединения I, в организме субъекта, ингибирует фермент NEP и поэтому, как ожидается, будет полезна для лечения и/или профилактики медицинских состояний, респонсивных к ингибированию NEP. Таким образом, ожидается, что пациентов, страдающих заболеванием или расстройством, которое лечат путем ингибирования фермента NEP или путем увеличения уровней его пептидных субстратов, можно лечить путем введения терапевтически эффективного количества соединения I или кристаллической формы I'. Например, как ожидают, ингибируя NEP, соединение I или кристаллическая форма I' будут потенцировать биологические эффекты эндогенных пептидов, которые метаболизируются NEP, таких как натрийуретические пептиды, бомбезин, брадикинины, кальцитонин, эндотелины, энкефалины, нейротензин, вещество P и вазоактивный кишечный пептид. Таким образом, ожидается, что это соединение будет иметь другие физиологические действия, например, на почечную, центральную нервную, репродуктивную и желудочно-кишечную системы.

Лекарственные средства удаляются из организма субъекта через различные процессы элиминации, которые классифицируются как экскреция и биотрансформация. Экскреция

относится к выведению интактного нелетучего лекарственного средства преимущественно почками в мочевой пузырь в мочу, в то время как другие пути экскреции включают желчь (печень), пот, слюну, молоко (через лактацию) или другие жидкости организма. Летучие лекарственные средства, такие как спиртовые и газообразные анестетики, выделяются через легкие в выдыхаемый воздух. С другой стороны, биотрансформация или метаболизм лекарственного средства относится к химическому преобразованию лекарственного средства в организме в метаболит и обычно является ферментативным процессом. Исключением является, когда лекарственное средство химически изменяется неферментативно, например, в результате сложноэфирного гидролиза. Ферменты, участвующие в биотрансформации лекарственных средств, присутствуют главным образом в печени. Другие ткани, такие как почки, легкие, тонкий кишечник и кожа, также содержат метаболические ферменты.

Фармакокинетические исследования также можно использовать для исследования путей элиминации у субъекта, например, почечного клиренса через экскрецию введенного лекарственного средства в моче через определенное время. Почечная экскреция соединения I у крыс, собак и обезьян, а также людей была проведена для оценки почечной экскреции в качестве пути элиминации (анализы 2 и 4). Этот путь элиминации имеет важное значение для субъектов с нарушением функции почек, и которые нуждаются в терапиях, которые минимально выводятся путем почечной экскреции. В одном варианте осуществления почечная экскреция соединения I или кристаллической формы I' у субъекта составляет приблизительно $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1\%$ или $\leq 0,5\%$ от введенной дозы в течение 24 часов.

Как описано в разделе ниже, относящемся к анализам, осуществляли *in vivo* определение плазматического клиренса, пероральной биодоступности и почечной экскреции у нескольких видов животных. Соединение I или кристаллическая форма I' продемонстрировали высокую ингибирующую человеческий неприлизин активность, высокую пероральную биодоступность, низкий плазматический клиренс, повышенное потенцирование cGMP и низкую почечную экскрецию, которые, как ожидается, приведут к особой полезности для лечения заболевания.

Сердечно-сосудистые заболевания

Ожидают, что, потенцируя эффекты вазоактивных пептидов, таких как натрийуретические пептиды и брадикинин, соединение I и кристаллическая форма I' будут полезны для лечения и/или профилактики заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания. См., Например, Roques et al. (1993) Pharmacol. Rev. 45: 87-146 и Dempsey et al. (2009) Amer. J. of Pathology 174 (3): 782-796. Сердечно-сосудистые заболевания, представляющие особый интерес, включают гипертензию и сердечную недостаточность. Гипертензия включает, в качестве иллюстрации, а не ограничения: первичную гипертензию, которую также называют эссенциальной гипертензией или идиопатической гипертензией; вторичную гипертензию; гипертензию с сопутствующей почечной недостаточностью; тяжелую гипертензию с или без сопутствующей почечной болезни; легочную гипертензию, включая легочную артериальную гипертензию; и резистентную гипертензию. Сердечная недостаточность включает, в качестве иллюстрации, а не ограничения: застойную сердечную недостаточность; острую сердечную недостаточность; хроническую сердечную недостаточность, например, с уменьшенной фракцией выброса левого желудочка (также называемую систолической сердечной недостаточностью) или с сохраненной фракцией выброса левого желудочка (также называемую диастолической сердечной недостаточностью); и острую и хроническую декомпенсированную сердечную недостаточность. Таким образом, один

вариант осуществления изобретения относится к способу лечения гипертензии, в частности, первичной гипертензии, легочной артериальной гипертензии, хронической тромбоэмболической легочной гипертензии (СТЕРН) или гипертензии со стенозом почечной артерии, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения I или кристаллической формы I'.

Для лечения первичной гипертензии терапевтически эффективное количество обычно представляет собой количество, достаточное для снижения артериального давления у пациента. В одном аспекте изобретение относится к снижению артериального давления у человека, при этом способ включает введение человеку снижающее артериальное давление количество кристаллической свободной кислотной формы (2S,4R)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты. Это будет включать лечение как легкой, так и умеренной гипертензии и тяжелой гипертензии. При использовании для лечения гипертензии соединение I или кристаллическую форму I' можно вводить в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как антагонисты альдостерона, ингибиторы альдостеронсинтазы, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и обладающие двойным действием ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента/неприлизина, активаторы и стимуляторы ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), ангиотензин II вакцины, антидиабетические средства, антилипидные средства, антитромботические средства, антагонисты рецептора AT_1 и обладающие двойным действием антагонисты рецептора AT_1 /ингибиторы неприлизина, антагонисты β_1 -адренергических рецепторов, обладающие двойным действием антагонисты β -адренергических рецепторов/антагонисты α_1 -рецепторов, блокаторы кальциевых каналов, диуретики, антагонисты рецептора эндотелина, ингибиторы эндотелин-превращающего фермента, ингибиторы неприлизина, натрийуретические пептиды и их аналоги, антагонисты клиренс-рецепторов натрийуретических пептидов, доноры оксида азота, стероидные противовоспалительные лекарственные средства, ингибиторы фосфодиэстеразы (в частности, ингибиторы PDE-V), агонисты рецепторов простагландина, ингибиторы ренина, стимуляторы и активаторы растворимой гуанилатциклазы и их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления изобретения соединение по изобретению используют в комбинации с антагонистом рецептора AT_1 , блокатором кальциевых каналов, диуретиком или их комбинацией и применяют для лечения первичной гипертензии. В другом конкретном варианте осуществления изобретения соединение по изобретению используют в комбинации с антагонистом рецептора AT_1 и применяют для лечения гипертензии с сопутствующим почечным заболеванием. При использовании для лечения резистентной гипертензии соединение можно вводить в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как ингибиторы альдостеронсинтазы.

Для лечения легочной артериальной гипертензии терапевтически эффективное количество обычно представляет собой количество, достаточное для снижения легочного сосудистого сопротивления. Другие цели терапии включают улучшение физической работоспособности пациента. Например, в клинической ситуации терапевтически эффективное количество может представлять собой такое количество, которое улучшает способность пациента комфортно ходить в течение 6 минут (проходить расстояние примерно 20-40 метров). При использовании для лечения легочной артериальной гипертензии соединение I или кристаллическую форму I' можно вводить в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как антагонисты

α-адренергических рецепторов, антагонисты β₁-адренергических рецепторов, агонисты β₂-адренергических рецепторов, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, антикоагулянты, блокаторы кальциевых каналов, диуретики, антагонисты рецептора эндотелина, ингибиторы PDE-V, аналоги простагландина, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления изобретения соединение I или кристаллическую форму I' используют в комбинации с ингибитором PDE-V или селективным ингибитором обратного захвата серотонина и применяют для лечения легочной артериальной гипертензии.

Для лечения хронической тромбоэмболической легочной гипертензии терапевтически эффективное количество обычно представляет собой количество, достаточное для снижения артериального давления в легочных артериях, независимо от того, образовалась или нет легочная эмболия у субъекта.

Кроме того, для лечения гипертензии со стенозом почечной артерии терапевтически эффективное количество обычно представляет собой количество, достаточное для снижения артериального давления. У субъектов, имеющих стеноз почечной артерии, артерии сужаются из-за атеросклероза. Это, в свою очередь, заставляет организм регистрировать меньше крови, достигающей почек, интерпретируя это как низкое кровяное давление, что, в свою очередь, посылает сигнал для вывобождения гормонов для повышения кровяного давления. Со временем это может привести к почечной недостаточности.

Другой вариант осуществления изобретения относится к способу лечения сердечной недостаточности, в частности, застойной сердечной недостаточности (включая систолическую и диастолическую застойную сердечную недостаточность), включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения I или кристаллической формы I'. Обычно терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения артериального давления и/или улучшения функций почек. В клинических условиях терапевтически эффективное количество может быть количеством, достаточным для улучшения сердечной гемодинамики, например, для снижения заклинивающего давления, давления правого предсердия, давления наполнения и сосудистого сопротивления. В одном варианте осуществления соединения вводят в виде внутривенной лекарственной формы. При использовании для лечения сердечной недостаточности соединения I или кристаллическую форму I' можно вводить в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как антагонисты аденозиновых рецепторов, средства, разрушающие конечные продукты усиленного гликозилирования, антагонисты альдостерона, антагонисты рецептора AT₁, антагонисты β₁-адренергических рецепторов, обладающие двойным действием антагонисты β-адренергического рецептора/α₁-рецептора, ингибиторы химазы, дигоксин, диуретики, ингибиторы эндотелин-превращающего фермента (ECE), антагонисты рецептора эндотелина, натрийуретические пептиды и их аналоги, антагонисты клиренс-рецепторов натрийуретических пептидов, доноры оксида азота, простагландиновые аналоги, ингибиторы PDE-V, активаторы и стимуляторы растворимой гуанилатциклазы и антагонисты рецепторов вазопрессина. В одном конкретном варианте осуществления изобретения соединения I или кристаллическую форму I' используют в комбинации с антагонистом альдостерона, антагонистом β₁-адренергического рецептора, антагонистом AT₁-рецептора или диуретиком и применяют для лечения застойной сердечной недостаточности.

Диарея

Ожидают, что в качестве ингибитора NEP Соединение I или кристаллическая форма I' будет ингибировать разложение эндогенных энкефалинов, и, таким образом, такие соединения также могут найти применение в лечении диареи, включая инфекционную и секреторную/водянистую диарею. См., например, Baumer et al. (1992) *Gut* 33:753-758; Farthing (2006) *Digestive Diseases* 24:47-58; и Marçais-Collado (1987) *Eur. J. Pharmacol.* 144 (2):125-132. При использовании для лечения диареи Соединение I или кристаллическую форму I' можно использовать в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами от диареи.

Почечные заболевания

Ожидают, что, потенцируя эффекты вазоактивных пептидов, таких как натрийуретические пептиды и брадикинин, соединение I и кристаллическая форма I' будут усиливать почечную функцию (см. Chen et al. (1999) *Circulation* 100:2443-2448; Lipkin et al. (1997) *Kidney Int.* 52:792-801; и Dussaule et al. (1993) *Clin. Sci.* 84:31-39) и найдут применение в лечении и/или профилактике почечных заболеваний у субъектов с нарушением функции почек. Заболевания почек, представляющие особый интерес, включают диабетическую нефропатию, хроническое заболевание почек, протеинурию, и особенно острое поражение почек (вызванное, например, сердечно-сосудистой хирургией, химиотерапией или использованием контрастных красителей при медицинской визуализации) или острую почечную недостаточность (см. Sharkovska et al. (2011) *Clin.*, 57: 507-515 и Newaz et al. (2010) *Renal Failure* 32:384-390). Другие заболевания почек, представляющие особый интерес, включают нефротический синдром, фокальный сегментный гломерулосклероз (FSGS) и поликистозную болезнь почек (PKD).

Субъект с нарушением функции почек, который имеет хроническое заболевание почек (CKD), может быть классифицирован в соответствии с руководством National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF KDOQI). Когда установлено хроническое заболевание почек, то есть повреждение почек или скорость клубочковой фильтрации (СКФ) <60 мл/мин/1,73 м² в течение 3 месяцев, стадию заболевания можно определить в соответствии с классификацией KDOQI CKD. Стадии включают Стадию 1 (повреждение почек с нормальной или повышенной СКФ): СКФ ≥ 90 ; Стадию 2 (повреждение почек со слегка пониженной СКФ): СКФ 60-89; Стадию 3 (умеренно пониженная СКФ): СКФ 30-59; Стадию 4 (серьезное снижение СКФ): СКФ 15-29; и Стадию 5 (почечная недостаточность): СКФ <15 (или диализ). СКФ определяется в единицах мл/мин/1,73 м².

Один из вариантов осуществления включает способ лечения субъекта с нарушением функции почек, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения I или кристаллической формы I'. Этот способ дополнительно включает лечение пациента с нарушением функции почек с гипертензией или сердечной недостаточностью. При использовании для лечения почечного заболевания соединение I или кристаллическую форму I' можно вводить в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, антагонисты рецептора АТ₁ и диуретики.

Другой вариант осуществления включает способ лечения пациента с нарушением функции почек, имеющего хроническое заболевание почек с расчетной скоростью клубочковой фильтрации (рСКФ) между 60 мл/мин/1,73 м² и 15 мл/мин/1,73 м², включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения I или кристаллической формы I'. Другой вариант осуществления включает способ

лечения пациента с нарушением функции почек, имеющего хроническое заболевание почек с расчетной скоростью клубочковой фильтрации (рСКФ) ≥ 90 мл/мин/1,73 м² (Стадия 1) или рСКФ <15 мл/мин/1,73 м² (Стадия 5), включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения I или кристаллической формы I'. Для целей настоящего изобретения тяжелое поражение почек можно классифицировать как рСКФ <30 мл/мин/1,73 м². В еще одном варианте осуществления способ лечения пациента с нарушением функции почек, имеющего хроническое заболевание почек, классифицированное как Стадия 1, Стадия 2, Стадия 3, Стадия 4, Стадия 5 или рСКФ в пределах, охватывающих одну или несколько из этих стадий, включает Соединение I или кристаллическую форму I'.

Профилактическое лечение

Ожидают, что, потенцируя эффекты натрийуретических пептидов, соединение I и кристаллическая форма I' будут полезными в профилактическом лечении, благодаря антигипертрофическому и антифибротическому действию натрийуретических пептидов (см. Potter et al. (2009) *Handbook of Experimental Pharmacology* 191:341-366), например, для предотвращения прогрессирования сердечной недостаточности после инфаркта миокарда, предотвращения артериального рестеноза после ангиопластики, предотвращения утолщения стенок кровеносных сосудов после операций на сосудах, предотвращения атеросклероза и предотвращения диабетической ангиопатии.

Глаукома

Ожидают, что, потенцируя эффекты натрийуретических пептидов, соединение I и кристаллическая форма I' будут полезными для лечения глаукомы. См., например, Diestelhorst et al. (1989) *International Ophthalmology* 12:99-101. При использовании для лечения глаукомы Соединение I можно использовать в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами от глаукомы.

Облегчение боли

Ожидают, что в качестве ингибитора NEP Соединение I или кристаллическая форма I' будет ингибировать разложение эндогенных энкефалинов, и, таким образом, такие соединения также могут найти применение в качестве анальгетиков. См., например, Roques et al. (1980) *Nature* 288:286-288 и Thanawala et al. (2008) *Current Drug Targets* 9:887-894. При использовании для лечения боли соединение I или кристаллическую форму I' можно использовать в комбинации с одним или несколькими дополнительными антиноцицептивными лекарственными средствами, такими как ингибиторы аминопептидазы N или дипептидилпептидазы III, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, ингибиторы обратного захвата моноаминов, миорелаксанты, антагонисты рецепторов NMDA, агонисты опиоидных рецепторов, агонисты рецепторов серотонина 5-HT_{1D} и трициклические антидепрессанты.

Другие применения

Ожидают, что соединение I или кристаллическая форма I', благодаря NEP-ингибирующим свойствам, также будет полезно в качестве противокашлевого средства, а также найдет применение в лечении портальной гипертензии, связанной с циррозом печени (см. Sansoe et al. (2005) *J Hepatol* 43: 791-798), рака (см. Vesely (2005) *J. Investigative Med.*, 53: 360-365), депрессии (см. Noble et al. (2007) *Exp. Opin. Ther. Targets* 11: 145- 159), менструальных расстройств, преждевременных родов, преэклампсии, эндометриоза, репродуктивных расстройств (например, мужского и женского бесплодия, синдрома поликистозных яичников, неудачной имплантации), а также мужской и женской сексуальной дисфункции, включая эректильную дисфункцию у мужчин и расстройство

полового возбуждения у женщин. Более конкретно, ожидается, что соединение I или кристаллическая форма I' будут полезны для лечения женской сексуальной дисфункции (см. Pryde et al. (2006) J. Med. Chem., 49: 4409-4424), которая часто определяется как трудности или невозможность найти удовлетворение в сексуальном выражении. Это охватывает множество разнообразных женских сексуальных расстройств, включая, в качестве иллюстрации, а не ограничения, гипоактивное расстройство сексуального желания, расстройство сексуального возбуждения, оргазмическое расстройство и болевое сексуальное расстройство. При использовании для лечения таких расстройств, особенно женской сексуальной дисфункции, соединение по изобретению можно комбинировать с одним или несколькими из следующих дополнительных средств: ингибиторы PDE-V, агонисты допамина, агонисты и/или антагонисты эстрогеновых рецепторов, андрогены и эстрогены. Ожидают, что благодаря NEP-ингибирующим свойствам соединение I или кристаллическая форма I' также будут обладать противовоспалительными свойствами и, как ожидается, будут полезны как таковые, особенно при использовании в комбинации со статинами.

Недавние исследования показывают, что NEP играет роль в регулировании нервной функции при диабете с дефицитом инсулина и ожирении, связанном с режимом питания. Correy et al. (2011) *Neuropharmacology* 60: 259-266. Поэтому также ожидается, что благодаря NEP-ингибирующим свойствам соединение I' или кристаллическая форма I' будут полезны для обеспечения защиты от нервного расстройства, вызванного диабетом или связанным с режимом питания ожирением.

Количество соединения I или кристаллической формы I', вводимое в расчете на дозу, или общее количество, вводимое в день, можно заранее определить или можно определить на основании индивидуальных особенностей пациента, принимая во внимание многочисленные факторы, включая характер и тяжесть состояния пациента, состояние, подлежащее лечению, возраст, массу тела и общее состояние здоровья пациента, переносимость активного средства пациентом, способ введения, фармакологические соображения, такие как активность, эффективность, фармакокинетика и профили токсичности вводимого соединения и любых дополнительных средств и т.п. Лечение пациента, страдающего заболеванием или медицинским состоянием (например, гипертензией), может начинаться с предварительно определенной дозы или дозы, определенной лечащим врачом, и будет продолжаться в течение периода времени, необходимого для предотвращения, улучшения, подавления или ослабления симптомов заболевания или медицинского состояния. Пациенты, проходящие такое лечение, обычно контролируются на регулярной основе для определения эффективности терапии. Например, при лечении гипертензии измерение артериального давления можно использовать для определения эффективности лечения. Аналогичные показатели для других заболеваний и состояний, описанных в настоящей заявке, хорошо известны и легко доступны лечащему врачу. Непрерывный мониторинг со стороны врача гарантирует, что оптимальное количество соединения I или кристаллической формы I' будет вводиться в любое установленное время, а также будет способствовать определению продолжительности лечения. Это особенно важно, когда вводят дополнительные средства, поскольку их выбор, дозировка и продолжительность терапии также могут потребовать корректировки. Таким образом, режим лечения и схему введения можно регулировать в ходе курса терапии, чтобы вводить самое низкое количество активного средства, которое обеспечивает желаемую эффективность, и, кроме того, такое введение продолжают только до тех пор, пока это необходимо для успешного лечения заболевания или медицинского состояния.

Соединение I также находит применение в качестве промежуточного соединения, полезного для получения кристаллических форм Соединения I, включая, например, кристаллическую форму I'

Исследовательские инструменты

5 Поскольку соединение I или кристаллическая форма I' обладает NEP фермент-ингибирующей активностью, они также полезны в качестве исследовательского инструмента для исследования или изучения биологических систем или образцов, содержащих NEP фермент, например, для изучения заболеваний, в которых NEP фермент
10 или его пептидные субстраты играют роль. Любую подходящую биологическую систему или образец, содержащий NEP фермент, можно использовать в таких исследованиях, которые могут проводиться как *in vitro*, так и *in vivo*. Репрезентативные биологические системы или образцы, подходящие для таких исследований, включают, но не ограничиваются этим, клетки, клеточные экстракты, плазматические мембраны, образцы тканей, изолированные органы, млекопитающие (такие как мыши, крысы, морские
15 свинки, кролики, собаки, свиньи и т.д.) и т.п., при этом млекопитающие представляют особый интерес. В одном конкретном варианте осуществления изобретения активность NEP фермента у млекопитающего ингибируется путем введения NEP-ингибирующего количества соединения I или кристаллической формы I'.

При использовании в качестве исследовательского инструмента биологическая
20 система или образец, содержащий NEP фермент, обычно контактируют с NEP-ингибирующим количеством соединения I или кристаллической формы I'. После того, как биологическая система или образец подвергаются воздействию соединения, эффекты ингибирования NEP фермента определяют с использованием обычных процедур и оборудования, таких как измерение связывания рецептора в анализе связывания или
25 измерение лиганд-опосредованных изменений в функциональном анализе. Экспозиция охватывает контактирование клеток или ткани с соединением, введение соединения млекопитающему, например, например, путем и/п (интраперитонеального), п/о (перорального), в/в (внутривенного), п/к (подкожного) или ингаляционного введения и т.д. Эта стадия определения может включать измерение ответа (количественный
30 анализ) или может включать осуществление наблюдения (качественный анализ). Измерение ответа включает, например, определение эффектов соединения на биологическую систему или образец с использованием обычных процедур и оборудования, таких как анализ активности ферментов и измерение ферментный субстрат- или продукт-опосредованных изменений в функциональных анализах.
35 Результаты анализа можно использовать для определения уровня активности, а также количества соединения, необходимого для достижения желаемого результата, то есть ингибирующего NEP фермент количества. Как правило, стадия определения будет включать определение эффектов ингибирования NEP фермента.

Кроме того, соединение I или кристаллическую форму I' можно использовать в
40 качестве исследовательского инструмента для оценки других химических соединений, и, таким образом, они также полезны для скрининговых анализов для идентификации, например, новых соединений, обладающих ингибирующей NEP активностью. Таким образом, соединение I или кристаллическую форму I' используют в качестве стандарта в анализе для сравнения результатов, полученных с испытываемым соединением и с
45 соединением I или кристаллической формой I' для идентификации тех испытываемых соединений, которые имеют примерно равную или более высокую активность, если они присутствуют. Например, рKi данные для испытываемого соединения или группы испытываемых соединений сравнивают с рKi данными для соединения I или

кристаллической формы I' для идентификации тех испытываемых соединений, которые обладают желаемыми свойствами, например, испытываемых соединений, имеющих рKi значение, равное или больше чем у соединения по изобретению. Этот аспект изобретения включает, в качестве отдельных вариантов осуществления, как получение сравнительных данных (с использованием соответствующих анализов), так и анализ данных испытаний для идентификации исследуемых соединений, представляющих интерес. Таким образом, испытываемое соединение может быть оценено в биологическом анализе способом, включающим стадии: (а) осуществление биологического анализа с испытываемым соединением для получения первого результата анализа; (b) осуществление биологического анализа с соединением I или кристаллической формой I' для получения второго результата анализа; при этом стадию (а) осуществляют до, после или одновременно со стадией (b); и (с) сравнение первого результата анализа со стадией (а) со вторым результатом анализа со стадии (b). Примеры биологических анализов включают анализ ингибирования NEP фермента.

Еще один аспект изобретения относится к способу исследования биологической системы или образца, включающего NEP фермент, при этом способ включает: (а) контактирование биологической системы или образца с соединением I или кристаллической формой I'; и (b) определение эффектов соединения на биологическую систему или образец.

Фармацевтические композиции и лекарственные формы

Соединение I или кристаллическую форму I' обычно вводят пациенту в форме фармацевтической композиции или в лекарственной форме. Такие фармацевтические композиции можно вводить пациенту любым приемлемым способом введения, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный, ректальный, вагинальный, назальный, ингаляционный, местный (в том числе чрескожный), глазной и парентеральный способы введения. Кроме того, соединение I или кристаллическую форму I' можно вводить, например, перорально в виде нескольких доз в день (например, два, три или четыре раза в день), в виде одной суточной дозы или одной недельной дозы. Понятно, что любую форму соединения I или кристаллической формы I' (то есть форму свободного основания, свободной кислоты, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и т.д.), которая подходит для конкретного способа введения, можно использовать в фармацевтических композициях, обсуждаемых в настоящей заявке.

Соответственно, в одном варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и соединение I. Композиция может содержать другие терапевтические средства и/или вещества, используемые для формулирования, если это желательно. При обсуждении композиций «Соединение I или кристаллическая форма I'» также могут быть указаны в настоящей заявке как «активное средство», чтобы отличить его от других компонентов рецептуры, таких как носитель. Таким образом, понятно, что термин «активное средство» включает соединение I или кристаллическую форму I', а также их фармацевтически приемлемые соли.

Фармацевтические композиции по изобретению обычно содержат терапевтически эффективное количество соединения I или кристаллической формы I'. Однако специалистам в данной области техники должно быть понятно, что фармацевтическая композиция может содержать больше, чем терапевтически эффективное количество, например, в нерасфасованных композициях, или меньше терапевтически эффективного количества, то есть отдельные единичные дозы, предназначенные для нескольких введений, для достижения терапевтически эффективного количества. Как правило,

композиция будет содержать от около 0,01 до 99% масс. активного средства, при этом фактическое количество зависит от самой композиции как таковой, пути введения, частоты дозирования и т.д. В одном варианте осуществления композиция, подходящая для пероральной лекарственной формы, например, может содержать около 10-99% масс. или около 50-99% масс. активного средства.

Любой обычный носитель или эксципиент можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению. Выбор конкретного носителя или эксципиента или комбинации носителей или эксципиентов будет зависеть от способа введения, используемого для лечения конкретного пациента, или типа медицинского состояния или болезненного состояния. В связи с этим, получение подходящей композиции для конкретного способа введения вполне входит в сферу компетенции специалистов в области фармацевтики. Кроме того, носители или эксципиенты, используемые в таких композициях, являются коммерчески доступными. В качестве дополнительной иллюстрации, традиционные способы получения описаны в *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); и Н. С. Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Репрезентативные примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают, но не ограничиваются этим, следующие: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза, такая как микрокристаллическая целлюлоза, и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; соли жирных кислот, такие как стеарат магния; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; эксципиенты, такие как масло какао и воски для суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этилаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; сжатые пропеллентные газы, такие как хлорфторуглероды и гидрофторуглероды; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических композициях.

В одном варианте осуществления изобретения фармацевтически приемлемым носителем является стеарат магния. Например, фармацевтическая композиция может содержать соединение I или кристаллическую форму I' и стеарат магния в соотношении от около 3:1 до около 10:1 соединения I или кристаллической формы I' и стеарата магния. Другие отношения соединения I или кристаллической формы I' к стеарату магния включают, но не ограничиваются этим, 1:1, 5:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1 и 50:1. В другом варианте осуществления количество соединения I или кристаллической формы I' по отношению к стеарату магния может быть выражено в % масс. Например, фармацевтическая композиция может содержать 99% масс. Соединения I или кристаллической формы I' и 1% масс. стеарата магния. В другом варианте осуществления массовое отношение соединения I или кристаллической формы I' к стеарату магния находится между 85:15 и 99:1, соответственно. В предпочтительном варианте осуществления массовое соотношение соединения I или кристаллической формы I' и стеарата магния находится между 95:5 и 99:1, предпочтительно составляет 99:1.

Фармацевтические композиции обычно получают путем тщательного и тесного

смешивания или перемешивания активного средства с фармацевтически приемлемым носителем и одним или несколькими необязательными ингредиентами. Полученную однородно смешанную смесь затем можно формовать или загружать в таблетки, капсулы, пилюли, канистры, картриджи, распыляющие устройства и т.п., используя

5 обычные процедуры и оборудование.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции являются подходящими для перорального введения. Подходящие композиции для перорального введения могут быть в форме капсул, таблеток, пилюль, лепешек, крахмалов, драже, порошков, гранул; растворов или суспензий в водной или неводной жидкости; жидких

10 эмульсий масло-в-воде или вода-в-масле; эликсиров или сиропов; и т.п.; каждый из которых содержит заданное количество активного средства.

Когда она предназначена для перорального введения в твердой лекарственной форме (капсулы, таблетки, пилюли и т.п.), композиция обычно будет включать активное средство и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, таких как

15 цитрат натрия, дикальцийфосфат или стеарат магния. Твердые лекарственные формы могут также содержать наполнители или создающие объем вещества, такие как крахмалы, микрокристаллическая целлюлоза, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; связующие, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; увлажнители, такие

20 как глицерин; разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и/или карбонат натрия; замедлители растворения, такие как парафин; ускорители абсорбции, такие как соединения четвертичного аммония; смачивающие агенты, такие как цетиловый спирт и/или глицеринмоностеарат; абсорбенты, такие как каолин и/или бентонитовая глина;

25 смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и/или их смеси; красители; и буферные агенты. Для целей настоящего изобретения термины «фармацевтически приемлемые носители» включают все термины, такие как носители, наполнители или создающие объем вещества, связующие вещества, увлажнители, замедлители растворения,

30 смачивающие агенты, абсорбенты, смазывающие вещества, красители и буферные агенты, описанные выше.

В фармацевтических композициях могут также присутствовать вещества, регулирующие высвобождение, смачивающие агенты, агенты покрытия, подсластители, отдушки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты. Примерами агентов покрытия

35 для таблеток, капсул, пилюль и т.п. являются вещества, которые используют для энтеросолюбивых покрытий, такие как фталат ацетилцеллюлозы, поливинилацетат фталат, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сополимеры сложного эфира метакриловой кислоты и метакриловой кислоты, ацетат тримеллитат целлюлозы, карбоксиметилэтилцеллюлоза, ацетат сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы и т.п.

40 Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, сульфит натрия, метабисульфат натрия и т.п.; маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и металл-хелатирующие

45 агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота, сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Композиции также могут быть сформулированы для обеспечения медленного или контролируемого высвобождения активного средства с использованием, например,

гидроксипропилметилцеллюлозы в разных пропорциях или других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Кроме того, фармацевтические композиции по изобретению могут содержать опалесцирующие агенты и могут быть сформулированы таким образом, чтобы высвободить активное средство только или предпочтительно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, с задержкой. Примеры композиций, которые можно использовать для заключения в них лекарственного средства, включают полимерные вещества и воски. Активное средство также может быть в микроинкапсулированной форме, необязательно с одним или несколькими из вышеописанных эксципиентов.

Один вариант осуществления изобретения включает пероральную лекарственную форму, содержащую соединение I или кристаллическую форму I' в капсуле, таблетке, жидкости или суспензии. Другой вариант осуществления изобретения относится к пероральной лекарственной форме, где высвобождение соединения I или кристаллической формы I' в организме субъекта является немедленным, контролируемым или замедленным высвобождением. Если капсулу используют в виде пероральной лекарственной формы, другой вариант осуществления включает капсулу, состоящую из желатина, полисахаридов или синтетических полимеров. В конкретном варианте осуществления капсула включает гидроксипропилметилцеллюлозу.

Подходящие вещества для капсул в соответствии с изобретением выбирают из желатина, производных целлюлозы, крахмала, производных крахмала, хитозана и синтетических пластиков. Если желатин используют в качестве вещества капсулы, его можно использовать в смеси с другими добавками, выбранными из полиэтиленгликоля (ПЭГ), глицерина, сорбита, полипропиленгликоля, ПЭО-ППО блоксополимеров и других многоатомных спиртов и простых полиэфиров. Когда в качестве материала капсулы используют производное целлюлозы, предпочтительными полимерами являются гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза и гидроксиэтилцеллюлоза. Если синтетические пластики используют в качестве материала капсулы, предпочтительными являются полиэтилен, поликарбонат, полиэфир, полипропилен и полиэтилентерефталат. Особенно предпочтительными являются полиэтилен, поликарбонат или полиэтилентерефталат.

Подходящие жидкие лекарственные формы для перорального введения включают, в качестве иллюстрации, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Жидкие лекарственные формы обычно содержат активное средство и инертный разбавитель, такой как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (например, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры сорбитана и жирных кислот и их смеси. Суспензии могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сорбитановые сложные эфиры, микрокристаллическая целлюлоза, метакрилат полиметакрилат, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Когда они предназначены для перорального введения, фармацевтические композиции по изобретению могут быть упакованы в виде единичной дозированной формы. Термин «единичная дозированная форма» относится к физически дискретной единице, подходящей для введения пациенту, то есть каждая единица, содержит заданное количество активного средства, рассчитанное для получения желаемого

терапевтического эффекта либо отдельно, либо в комбинации с одной или несколькими дополнительными единицами. Например, такими единичными дозированными формами могут быть капсулы, таблетки, пилюли и т.п.

В другом варианте осуществления композиции по изобретению являются подходящими для ингаляционного введения и обычно будут иметь форму аэрозоля или порошка. Такие композиции обычно вводят с использованием известных устройств доставки, таких как распылитель, сухой порошок или дозирующий ингалятор. Распылительные устройства создают поток воздуха с высокой скоростью, который заставляет композицию распыляться в виде тумана, который переносится в дыхательные пути пациента. Иллюстративная композиция для распылителя включает активное средство, растворенное в носителе с образованием раствора, или микронизированное и объединенное с носителем с образованием суспензии микронизированных частиц подходящего для вдыхания размера. Ингаляторы сухого порошка вводят активное средство в виде свободно текучего порошка, который рассеивается в воздушном потоке, вдыхаемом пациентом. Иллюстративная композиция сухого порошка включает сухую смесь активного средства с эксципиентом, таким как лактоза, крахмал, маннит, декстроза, полимолочная кислота, полилактид-ко-гликолид и их комбинации. Дозирующие ингаляторы выпускают отмеренное количество активного средства с использованием сжатого газа-пропеллента. Иллюстративная дозированная композиция включает раствор или суспензию активного средства в сжиженном пропелленте, таком как хлорфторуглерод или гидрофторалкан. Необязательные компоненты таких композиций включают сорастворители, такие как этанол или пентан, и поверхностно-активные вещества, такие как сорбитантриолеат, олеиновая кислота, лецитин, глицерин и лаурилсульфат натрия. Такие композиции обычно получают путем добавления охлажденного или находящегося под давлением гидрофторалкана в подходящий контейнер, содержащий активное средство, этанол (если присутствует) и поверхностно-активное вещество (если присутствует). Для приготовления суспензии активное средство микронизируют и затем объединяют с пропеллентом. Альтернативно, композицию суспензии можно получить путем нанесения покрытия из поверхностно-активного вещества на микронизированные частицы активного средства путем распылительной сушки. Затем препарат загружают в аэрозольный баллон, который является частью ингалятора.

Соединение I или кристаллическую форму I' и их композиции также можно вводить парентерально, например, путем подкожной, внутривенной, внутримышечной или интраперитонеальной инъекции. Для такого введения активное средство обеспечивается в стерильном растворе, суспензии или эмульсии. Типичные растворители для получения таких композиций включают воду, физиологический раствор, электролиты, низкомолекулярные спирты, такие как пропиленгликоль и полиэтиленгликоль, масла, аминокислоты, желатин, сахара, сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, и т.п. Композиции для парентерального введения могут также содержать один или несколько антиоксидантов, солюбилизирующих веществ, стабилизаторов, консервантов, смачивающих веществ, эмульгаторов и диспергирующих веществ. Поверхностно-активные вещества, дополнительные стабилизирующие вещества или вещества, регулирующие pH (кислоты, основания или буферы) и антиоксиданты особенно полезны для обеспечения стабильности композиции, например, для сведения к минимуму или избежания гидролиза сложноэфирных и амидных связей, которые могут присутствовать в соединении. Эти композиции можно сделать стерильными с использованием стерильной инъекционной среды, стерилизующего агента, фильтрации, облучения или нагревания.

Репрезентативные физиологически приемлемые водные носители включают, например, стерильную воду для инъекций, USP; раствор декстрозы для инъекций, USP (например, 2,5, 5,0, 10, 20% раствор декстрозы, включая 5% раствор декстрозы для инъекций (D5/W)); раствор декстрозы и хлорида натрия для инъекций, USP (например, 5 декстро́за варьируется от 2,5 до 10%, а хлорид натрия, варьируется от 0,12 (19 мэкв. натрия) до 0,9% (154 мэкв натрия)); раствор маннита для инъекций, USP (например, 5, 10, 15, 20 и 25% маннита); раствор Рингера для инъекций, USP (например, 147 мэкв. натрия, 4 мэкв. калия, 4,5 мэкв. кальция и 156 мэкв. хлорида на литр); содержащий лактат раствор Рингера для инъекций, USP (например, 2,7 мэкв. кальция, 4 мэкв. калия, 130 мэкв. натрия и 28 мэкв. лактата на литр); раствор хлорида натрия для инъекций, USP (например, 0,9% хлорида натрия) и т.п.

При введении пациенту соединение I или кристаллическую форму I' обычно разбавляют в примерно от 0,5 мл до 10 мл водного носителя на мг соединения I или кристаллической формы I', например, от около 0,6 до около 8 мл на мг.

В одном конкретном варианте осуществления парентеральная композиция содержит водный раствор циклодекстрина в качестве фармацевтически приемлемого носителя. Подходящие циклодекстрины включают циклические молекулы, содержащие шесть или более α -D-глюкопиранозных единиц, соединенных в положениях 1,4 связями, как в амилазе, β -циклодекстрине или циклогептаамилозе. Примеры циклодекстринов включают производные циклодекстрина, такие как гидроксипропиловый и сульфобутиловый эфиры циклодекстринов, такие как гидроксипропил- β -циклодекстрин и сульфобутиловый эфир β -циклодекстрина. Типичные буферы для таких композиций включают буферы на основе карбоновых кислот, такие как цитратные, лактатные и малеатные буферные растворы. В одном варианте осуществления изобретения внутривенная лекарственная форма включает соединение I или кристаллическую форму I' в буферном растворе.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическая форма I' или фармацевтическая композиция такого соединения представляет собой лиофилизированный порошок. Как правило, лиофилизированный порошок является стерильным и упаковывается в герметичный флакон или ампулу или аналогичный контейнер.

Соединение I или кристаллическую форму I' также можно вводить чрескожно с использованием известных чрескожных систем доставки и эксципиентов. Например, соединение I или кристаллическую форму I' можно смешать с усилителями проницаемости, такими как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль монолаурат, азициклоалкан-2-оны и т.п., и включить в пластырь или подобную систему доставки. Дополнительные эксципиенты, включая гелеобразующие агенты, эмульгаторы и буферы, можно использовать в таких композициях для чрескожного введения, если это необходимо.

40 *Дополнительные средства*

Соединение I или кристаллическая форма I' могут быть полезны в качестве единственного лечения заболевания, или их можно использовать в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами для получения желаемого терапевтического эффекта. Таким образом, в одном варианте осуществления фармацевтические композиции по изобретению содержат другие лекарственные средства, которые совместно вводят с соединением I или кристаллической формой I'. Например, композиция может дополнительно содержать одно или несколько лекарственных средств (также называемых «дополнительными средствами»). Такие терапевтические

средства хорошо известны в данной области и включают антагонисты аденозиновых рецепторов, антагонисты α -адренергических рецепторов, антагонисты β_1 -адренергических рецепторов, агонисты β_2 -адренергических рецепторов, обладающие двойным действием антагонисты β -адренергических рецепторов/антагонисты α_1 -рецепторов, ингибиторы конечных продуктов усиленного гликозилирования, антагонисты альдостерона, ингибиторы альдостеронсинтазы, ингибиторы аминопептидазы N, андрогены, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и обладающие двойным действием ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента/неприлизина, активаторы и стимуляторы ангиотензин-превращающего фермента 2, ангиотензин II вакцины, антикоагулянты, антидиарейные средства, средства против глаукомы, антилипидные средства, антиноцицептивные средства, антитромботические средства, антагонисты AT_1 рецепторов и обладающие двойным действием антагонисты AT_1 рецепторов/ингибиторы неприлизина, многофункциональные блокаторы ангиотензиновых рецепторов, антагонисты рецепторов брадикинина, блокаторы кальциевых каналов, ингибиторы химазы, дигоксин, диуретики, агонисты допамина, ингибиторы эндотелин-превращающего фермента, антагонисты эндотелиновых рецепторов, ингибиторы HMG-CoA-редуктазы, эстрогены, агонисты и/или антагонисты рецепторов эстрогенов, антагонисты минералокортикоидных рецепторов, ингибиторы обратного захвата моноаминов, миорелаксанты, натрийуретические пептиды и их аналоги, антагонисты клиренс-рецепторов натрийуретических пептидов, ингибиторы неприлизина, доноры оксида азота, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, антагонисты рецепторов N-метил-d-аспартата, агонисты опиоидных рецепторов, ингибиторы фосфодиэстеразы (например, PDE5 и PDE9), аналоги простагландина, агонисты рецепторов простагландина, ингибиторы ренина, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, блокаторы натриевых каналов, стимуляторы и активаторы растворимой гуанилатциклазы, трициклические антидепрессанты, антагонисты рецепторов вазопрессина и их комбинации. Конкретные примеры этих средств подробно описаны в настоящей заявке.

Конкретный вариант осуществления включает фармацевтическую композицию, включающую соединение I или его кристаллическую форму I' и антагонист рецептора AT_1 , ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, ингибитор фосфодиэстеразы (PDE), ингибитор ренина, диуретик или их комбинации, и необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

Соответственно, еще в одном аспекте изобретения фармацевтическая композиция включает соединение I или кристаллическую форму I', второе активное средство и фармацевтически приемлемый носитель. Третье, четвертое и т.д. активные средства также могут быть включены в композицию. В комбинированной терапии вводимое количество соединения I или кристаллической формы I', а также количество дополнительных средств может быть меньше количества, обычно вводимого при монотерапии.

Соединение I или кристаллическую форму I' можно физически смешивать со вторым активным средством с образованием композиции, содержащей оба средства; или каждое средство может присутствовать в отдельных и разных композициях, которые вводят пациенту одновременно или в отдельные моменты времени. Например, соединение I или кристаллическую форму I' можно объединить со вторым активным средством с использованием обычных процедур и оборудования для получения комбинации активных средств, содержащих соединение I или кристаллическую форму I' и второе

активное средство. Кроме того, активные средства могут быть объединены с фармацевтически приемлемым носителем для образования фармацевтической композиции, включающей соединение I или кристаллическую форму I', второе активное средство и фармацевтически приемлемый носитель. В этом варианте осуществления

5 компоненты композиции обычно смешивают или перемешивают для создания физической смеси. Затем физическую смесь вводят в терапевтически эффективном количестве, используя любой из описанных в настоящей заявке способов.

Альтернативно, активные средства могут оставаться отдельными и разграниченными перед введением пациенту. В этом варианте осуществления средства физически не

10 смешивают друг с другом перед введением, но вводят одновременно или в разное время в виде отдельных композиций. Такие композиции могут быть упакованы отдельно или могут быть упакованы вместе в наборе. При введении в отдельные моменты времени дополнительное средство обычно вводят с промежутком менее чем 24 часа после введения соединения I или кристаллической формы I', при варьировании времени

15 введения от одновременного введения с соединением по изобретению до примерно 24 часов после его введения. Это также называется последовательным введением. Таким образом, соединение I или кристаллическую форму I' можно вводить перорально одновременно или последовательно с другим активным средством с использованием двух таблеток, по одной таблетки для каждого активного средства, где

20 "последовательное" может означать введение сразу после введения соединения I или кристаллической формы I' или через некоторое время (например, через час или три часа). Также предполагается, что дополнительное средство можно вводить более чем через 24 часа после введения соединения I или кристаллической формы I'. Альтернативно, комбинацию можно вводить различными путями введения, то есть одно средство

25 вводить перорально, а другое путем ингаляции.

В одном варианте осуществления набор содержит первую лекарственную форму, содержащую соединение I или кристаллическую форму I', и по меньшей мере одну дополнительную лекарственную форму, содержащую одно или несколько

30 дополнительных средств, указанных в настоящей заявке, в количествах, достаточных для осуществления способов по изобретению. Первая лекарственная форма и вторая (или третья и т.д.) лекарственная форма вместе содержат терапевтически эффективное количество активных средств для лечения или профилактики заболевания или медицинского состояния у пациента.

Дополнительное средство (средства), если оно включено, присутствует в

35 терапевтически эффективном количестве, таким образом, их обычно вводят в количестве, которое дает терапевтически благоприятный эффект при совместном введении с соединением I или кристаллической формой I' по изобретению. Дополнительное средство может быть в форме фармацевтически приемлемой соли, сольвата, оптически чистого стереоизомера и т.п. Дополнительное средство также может быть в форме пролекарства,

40 например, соединения, содержащего группу карбоновой кислоты, которая была этерифицирована. Таким образом, дополнительные средства, перечисленные в настоящей заявке, предназначены для включения всех таких форм и являются коммерчески доступными или могут быть получены с использованием обычных процедур и реагентов.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят

45 в комбинации с антагонистом аденозинового рецептора, примерами которого являются наксифиллин, ролофиллин, SLV-320, теофиллин и тонафобиллин.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антагонистом α -адренергического рецептора, примеры которого

включают доксазозин, празозин, тамсулозин и теразозин.

Соединение I или кристаллическую форму I' также можно вводить в комбинации с антагонистом β_1 -адренергического рецептора (« β_1 -блокатор»), примеры которого включают ацебутолол, алпренолол, амосулолол, аротинолол, атенолол, бефунолол, бетаксолол, бевантолол, бисопролол, бопиндолол, буциндолол, букумолол, буфетолол, буфуролол, бунитролол, бупранолол, бубридин, бутофилолол, каразолол, картеолол, карведилол, целипролол, цетамолол, клоранолол, дилевалола, эпанола, эсмола, инденола, лабетолола, левобунола, мепиндола, метипранолола, метопролола, такой как метопролол сукцинат и метопролол тартрат, мопролол, надолол, надоксолол, небивалола, нипрадилола, окпренолола, пенбутолола, пербутолола, пиндола, практола, пронетадола, пропранолола, соталола, суфиналола, талиндола, третатолола, тилизола, тимолола, толипролола, ксибенола и их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления β_1 -антагонист выбран из атенолола, бисопролола, метопролола, пропранолола, соталола и их комбинаций. Как правило, β_1 -блокатор вводят в количестве, достаточном для обеспечения около 2-900 мг на дозу.

В одном варианте осуществления соединения I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с агонистом β_2 -адренергического рецептора, примеры которого включают албутерол, битолтерол, фенотерол, формотерол, индакатерол, изоэтарин, левалбутерол, метапротеренола, пирбутерол, салбутамол, салмефамол, салметерол, тербуталин, вилантерол и т.п. Как правило, агонист β_2 -адренергического рецептора вводят в количестве, достаточном для обеспечения около 0,05-500 мкг на дозу.

В одном варианте осуществления соединения I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации со средством, разрушающим конечные продукты усиленного гликозилирования (AGE), примеры которого включают алагебриум (или ALT-711) и TRC4149.

В другом варианте осуществления соединения I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антагонистом альдостерона, примеры которого включают эплеренон, спиронолактон и их комбинации. Как правило, антагонист альдостерона можно вводить в количестве, достаточном для обеспечения примерно от 5 до 300 мг в день.

В одном варианте осуществления соединения I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с ингибитором аминопептидазы N или дипептидилпептидазы III, примеры которых включают бестатин и PC18 (2-амино-4-метилсульфонилбутантиол, метионинтиол).

Соединение I или кристаллическую форму I' можно также вводить в сочетании с ингибитором ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ), примеры которого включают аккуприл, алацеприл, беназеприл, беназеприлат, каптоприл, церанаприл, цилазаприл, делаприл, эналаприл, эналаприлат, фосиноприл, фосиноприлат, имидаприл, лизиноприл, моэксиприл, моноприл, мовелтиприл, пентоприл, периндоприл, хинаприл, хинаприлат, рамиприл, рамиприлат, саралазин ацетат, спираприл, темокаприл, трандолаприл, зофеноприл и их комбинации. В конкретном варианте осуществления ингибитор АСЕ выбирают из: беназеприла, каптоприла, эналаприла, лизиноприла, рамиприла и их комбинаций. Как правило, ингибитор АСЕ вводят в количестве, достаточном для обеспечения около 1-150 мг в день.

В другом варианте осуществления соединения I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с обладающим двойным действием ингибитором ангиотензин-превращающего фермента/неприлизина (АСЕ/NEP), примеры которого включают: AVE-0848 ((4*S*, 7*S*, 12*bR*)-7-[3-метил-2(*S*)-сульфанилбутирамидо]-6-оксо-1,2,3,4,6,7,8,12*b*-

октагидропиридо[2,1-а][2]-бензазепин-4-карбоновая кислота); AVE-7688 (илепатрил) и его исходное соединение; BMS-182657 (2-[2-оксо-3(*S*)-[3-фенил-2(*S*)-сульфанилпропионамидо]-2,3,4,5-тетрагидро-1H-1-бензазепин-1-ил]уксусная кислота); CGS-35601 (N-[1-[4-метил-2(*S*)-сульфанилпентанамидо]циклопентил-карбонил]-L-триптофан); фазидотрил; фазидотрилат; эналаприлат; ER-32935 ((3*R*,6*S*,9*aR*)-6-[3(*S*)-метил-2(*S*)-сульфанилпентанамидо]-5-оксопергидротиазоло[3,2-а]азепин-3-карбоновая кислота); гемпатрилат; MDL-101264 ((4*S*,7*S*,12*bR*)-7-[2(*S*)-(2-морфолиноацетилтио)-3-фенилпропионамидо]-6-оксо-1,2,3,4,6,7,8,12*b*-октагидропиридо[2,1-а][2]бензазепин-4-карбоновая кислота); MDL-101287 ([4*S*-[4*α*,7*α*(*R**),12*bβ*]]-7-[2-(карбоксиметил)-3-фенилпропионамидо]-6-оксо-1,2,3,4,6,7,8,12*b*-октагидропиридо[2,1-а][2]бензазепин-4-карбоновая кислота); омапатрилат; RB-105 (N-[2(*S*)-(меркаптометил)-3(*R*)-фенилбутил]-L-аланин); сампатрилат; SA-898 ((2*R*,4*R*)-N-[2-(2-гидроксифенил)-3-(3-меркаптопропионил)тиазолидин-4-илкарбонил]-L-фенилаланин); Sch-50690 (N-[1(*S*)-карбокси-2-[N2-(метансульфонил)-L-лизиламино]этил]-L-валил-L-тирозин); и их комбинации также могут быть включены. В одном конкретном варианте осуществления ингибитор ACE/NEP выбран из: AVE-7688, эналаприлата, фазидотрила, фазидотрилата, омапатрилата, сампатрилата и их комбинаций.

В одном варианте осуществления Соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с активатором или стимулятором ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2).

В одном варианте осуществления Соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с ангиотензин-II вакциной, примеры которой включают ATR12181 и CYT006-AngQb.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антикоагулянтом, примеры которого включают: кумарины, такие как варфарин; гепарин; и прямые ингибиторы тромбина, такие как аргатробан, бивалирудин, дабигатран и лепирудин.

В еще одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антидиабетическим средством, примеры которого включают инъекционные лекарственные средства, а также перорально эффективные лекарственные средства и их комбинации. Примеры инъекционных лекарственных средств включают инсулин и производные инсулина. Примеры перорально эффективных лекарственных средств включают: бигуаниды, такие как метформин; антагонисты глюкагона; ингибиторы α -глюкозидазы, такие как акарбоза и миглитол; ингибиторы дипептидилпептидазы IV (ингибиторы DPP-IV), такие как алоглиптин, денаглиптин, линаглиптин, саксаглиптин, ситаглиптин и вилдаглиптин; меглитиниды, такие как репаглинид; оксадиазолидиндионы; сульфонилмочевины, такие как хлорпропамид, глимепирид, глипизид, глибурид и толазамид; тиазолидиндионы, такие как пиоглитазон и розиглитазон; и их комбинации.

В другом варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в сочетании со средствами против диареи. Типичные варианты лечения включают пероральные регидратационные растворы (ORS), лоперамид, дифеноксилат и субсалицилат висмута.

В еще одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации со средством против глаукомы, примеры которого включают: α -адренергические агонисты, такие как бримонидин; антагонисты β_1 -адренергических рецепторов; местные β_1 -блокаторы, такие как бетаксолол, левобунолол и тимолол; ингибиторы карбоангидразы, такие как ацетазоламид, бринзоламид или дорзоламид;

холинергические агонисты, такие как цевимелин и DMXB-анабазин; соединения эпинефрина; миотики, такие как пилокарпин; и аналоги простагландинов.

В еще одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антилипидным средством, примеры которого включают ингибиторы белков переноса холестерина эфиров (СЕТР), такие как анацетрапиб, далцетрапиб и торцетрапиб; статины, такие как аторвастатин, флувастатин, ловастатин, правастатин, розувастатин и симвастатин; и их комбинации.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антитромботическим средством, примеры которого включают: аспирин; антитромбоцитарные средства, такие как клопидогрел, прасугрел и тиклопидин; гепарин и их комбинации.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антагонистом рецептора АТ₁, также известным как блокатор рецепторов ангиотензина II типа 1 (ARB). Например, ARB включают абитесартан, азилсартан (например, азилсартан медоксомил), бензиллосартан, кандесартан, кандесартан цилексетил, элисартан, эмбусартан, енолтазосартан, эпросартан, EXP3174, фонсартан, форасартан, глицилосартан, ирбесартан, изотеолин, лосартан, медоксомил, милфасартан, олмесартан (например, олмесартан медоксомил), опомисартан, пратосартан, риписартан, саприсартан, саралазин, сармезин, ТАК-591, тасосартан, телмисартан, валсартан, золасартан и их комбинации. В конкретном варианте осуществления ARB выбирают из азилсартана медоксомила, кандесартана цилексетила, эпросартана, ирбесартана, лосартана, олмесартана медоксомила, саприсартана, тазосартана, телмисартана, валсартана и их комбинаций. Иллюстративные соли и/или пролекарства включают кандесартан цилексетил, эпросартан мезилат, калиевую соль лосартана и олмесартан медоксомил. Как правило, ARB вводят в количестве, достаточном для обеспечения около 4-600 мг на дозу, с суточными дозами в пределах 20-320 мг в день.

Соединение I или кристаллическую форму I' также можно вводить в комбинации с обладающим двойным действием средством, таким как антагонист АТ₁ рецептора/ингибитор неприлизина (ARB/NEP), примеры которого включают соединения, описанные в Патентах США №№ 7879896 и 8013005, оба на имя Allegretti et al., таким как соединение 4'-{2-этокси-4-этил-5-[(S)-2-меркапто-4-метилпентаноиламино)-метил]имидазол-1-илметил}-3'-фторбифенил-2-карбоновой кислоты.

Соединение I или кристаллическую форму I' также можно вводить в комбинации с многофункциональными блокаторами ангиотензиновых рецепторов, описанными в Kurtz & Klein (2009) *Hypertension Research* 32:826-834.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антагонистом брадикининового рецептора, например, икатибантом (НОЕ-140). Ожидается, что эта комбинированная терапия может иметь преимущество в предотвращении ангиотека или других нежелательных последствий повышенного уровня брадикинина.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с блокатором кальциевых каналов, примеры которого включают амлодипин, анипамил, аранипин, барнидипин, бенциклан, бенидипин, бепридил, клентиазем, цилнидипин, циннаризин, дилтиазем, эфонидипин, элгодипин, этафенон, фелодипин, фендилин, флунаризин, галлопамил, исрадипин, лацидипин, лерканидипин, лидофлазин, ломеризин, манидипин, мибефрадил, никардипин, нифедипин, нигулдипин, нилудипин, нилвадипин, нимодипин, нисолдипин, нитрендипин, нивалдипин,

пергекселин, прениламин, риозидин, семотиадил, теродилин, тиапамил, верапамил и их комбинации. В конкретном варианте осуществления блокатор кальциевых каналов выбран из амлодипина, бепридила, дилтиазема, фелодипина, исрадипина, лацидипина, никардипина, нифедипина, нигулдипина, нилудипина, нимодипина, нисолдипина, риозидина, верапамила и их комбинаций. Как правило, блокатор кальциевых каналов вводят в количестве, достаточном для обеспечения около 2-500 мг на дозу.

В одном варианте осуществления Соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с ингибитором химазы, таким как TPC-806 и 2-(5-формиламино-6-оксо-2-фенил-1,6-дигидропиримидин-1-ил)-N-[{3,4-диоксо-1-фенил-7-(2-пиридилокси)}-2-гептил]ацетамид (NK3201).

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с диуретиком, примеры которого включают: ингибиторы карбоангидразы, такие как ацетазоламид и дихлорфенамид; петлевые диуретики, которые включают сульфонамидные производные, такие как ацетазоламид, амбусид, азосемид, буметанид, бутазоламид, хлораминофенамид, клофенамид, клопамид, клорексолон, дисульфамид, этоксизоламид, фуросемид, мефрузид, метазоламид, пиретанид, торсемид, трипамид и ксипамид, а также не-сульфонамидные диуретики, такие как этакриновая кислота и другие соединения феноксиуксусной кислоты, такие как тиениловая кислота, индакринон и квинкарбат; осмотические диуретики, такие как маннит; калийсберегающие диуретики, которые включают антагонисты альдостерона, такие как спиронолактон, и ингибиторы Na⁺ каналов, такие как амилорид и триамтерен; тиазидные и тиазидоподобные диуретики, такие как алтиазид, бендрофлуметиазид, бензилгидрохлортиазид, бензтиазид, бутиазид, хлорталидон, хлортиазид, циклопентиазид, циклотиазид, эпитиазид, этиазид, фенквизон, флуметиазид, гидрохлоротиазид, гидрофлуметиазид, индапамид, метилхлортиазид, метикран, метолазон, парафлутизид, политиазид, хинэтазон, теклотиазид и трихлорметиазид; и их комбинации. В конкретном варианте осуществления диуретик выбирают из амилорида, буметанида, хлортиазида, хлорталидона, дихлорфенамида, этакриновой кислоты, фуросемида, гидрохлоротиазида, гидрофлуметиазида, индапамида, метилхлортиазида, метолазона, торсемида, триамтерина и их комбинаций. Диуретик можно вводить в количестве, достаточном для обеспечения около 5-50 мг в день, более типично 6-25 мг в день, при этом обычная доза составляет 6,25 мг, 12,5 мг или 25 мг в день.

Соединение I или кристаллическую форму I' также можно вводить в сочетании с ингибитором эндотелин-превращающего фермента (ECE), примеры которого включают фосфорамидон, CGS 26303 и их комбинации.

В конкретном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антагонистом рецептора эндотелина, примеры которого включают: селективные антагонисты рецептора эндотелина, которые влияют на рецепторы эндотелина A, такие как авосентан, амбрисентан, атрасентан, BQ-123, клазосентан, дарусентан, ситаксентан и зиботентан; и антагонисты эндотелиновых рецепторов двойного действия, которые влияют на как A, так и на B эндотелиновые рецепторы, такие как босентан, мацитентан и тезосентан.

В еще одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с одним или несколькими ингибиторами HMG-CoA-редуктазы, которые также известны как статины. Типичные статины включают аторвастатин, флувастатин, ловастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин и симвастатин.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с ингибитором обратного захвата моноаминов, примеры которого

включают ингибиторы обратного захвата норадреналина, такие как атомоксетин, бупроприон и бупроприоновый метаболит гидробупропион, мапротилин, ребоксетин и виллоксазин; селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (SNRIs), такие как циталопрам и метаболит циталопрама десметилциталопрам, дапоксетин, эсциталопрам (например, эсциталопрам оксалат), флуоксетин и десметиловый метаболит флуоксетаина норфлуоксетин, флувоксамин (например, флувоксамин малеат), пароксетин, сертралин и метаболит сертралина деметилсертралин; двойные ингибиторы обратного захвата серотонина-норэпинефрина (SNRI), такие как бицифадин, дулоксетин, милнаципран, нефазодон и венлафаксин; и их комбинации.

В другом варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с миорелаксантом, примеры которого включают: карисопродол, хлорзоксазон, циклобензаприн, дифлунисал, метаксалон, метокарбамол и их комбинации.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в сочетании с натрийуретическим пептидом или аналогом, примеры которых включают: карперитид, CD-NP (Nile Therapeutics), CU-NP, несиритид, PL-3994 (Palatin Technologies, Inc.), уларитид, сендеритид и соединения, описанные в Ogawa et al (2004) J.Biol.Chem. 279: 28625-31. Эти соединения также указаны как агонисты рецепторов

натрийуретического пептида A (NPR-A). В другом варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антагонистом клиренс-рецептора натрийуретического пептида (NPR-C), таким как SC-46542, cANF (4-23) и AP-811 (Veale (2000) Bioorg Med Chem Lett 10: 1949-52). Например, AP-811 продемонстрировал синергизм в сочетании с ингибитором NEP, тиорфаном (Wegner (1995) Clin.Exper.Hypert. 17: 861-876).

В другом варианте осуществления Соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с ингибитором неприлизина (NEP), примеры которого включают: АНУ-377; кандоксантрил; кандоксантрилат; дексекадотрил (бензиловый эфир (+)-N-[2(R)-(ацетилтиометил)-3-фенилпропионил]глицина); CGS-24128 (3-[3-(бифенил-4-ил)-2-(фосфонометиламино)пропионамидо]пропионовая кислота); CGS-24592 ((S)-3-[3-(бифенил-4-ил)-2-(фосфонометиламино)пропионамидо]пропионовая кислота); CGS-25155 (бензиловый эфир N-[9(R)-(ацетилтиометил)-10-оксо-1-азациклодекан-2(S)-илкарбонил]-4(R)-гидрокси-L-пролина); производные 3-(1-карбамоилциклогексил)пропионовой кислоты, описанные в WO 2006/027680 Hepworth et al. (Pfizer Inc.); JMV-390-1 (2(R)-бензил-3-(N-гидроксикарбамоил)пропионил-L-изолейцил-L-лейцин); экадотрил; фосфорамидон; ретротифорфан; RU-42827 (2-(меркаптометил)-N-(4-пиридинил)бензолпропионамид); RU-44004 (N-(4-морфолинил)-3-фенил-2-(сульфанилметил)пропионамид); SCH-32615 ((S)-N-[N-(1-карбокси-2-фенилэтил)-L-фенилаланил]-β-аланин) и его пролекарство SCH-34826 ((S)-N-[N-[1-[[2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-ил)метокси]карбонил]-2-фенилэтил]-L-фенилаланил]-β-аланин); сиалорфин; SCH-42495 (этиловый эфир N-[2(S)-(ацетилсульфанилметил)-3-(2-метилфенил)пропионил]-L-метионина); спинорфин; SQ-28132 (N-[2-(меркаптометил)-1-оксо-3-фенилпропил]лейцин); SQ-28603 (N-[2-(меркаптометил)-1-оксо-3-фенилпропил]-β-аланин); SQ-29072 (7-[[2-(меркаптометил)-1-оксо-3-фенилпропил]амино]гептановая кислота); тиорфан и его пролекарство рацекадотрил; UK-69578 (цис-4-[[[1-[2-карбокси-3-(2-метоксиэтокси)пропил]циклопентил]карбонил]амино] циклогексанкарбоновая кислота); UK-447841 (2-{1-[3-(4-хлорфенил)пропилкарбамоил]-циклопентилметил}-4-метоксимасляная кислота); UK-505749 ((R)-2-метил-3-{1-[3-(2-метилбензотиазол-6-ил)пропилкарбамоил]циклопентил}пропионовая кислота); 5-бифенил-4-ил-4-(3-карбоксипропиониламино)-2-метилпентановая кислота и этиловый эфир 5-бифенил-4-ил-4-(3-

карбоксипропиониламино)-2-метилпентановой кислоты (WO 2007/056546); даглутрил[(3*S*,2'*R*)-3-{1-[2'-(этоксикарбонил)-4'-фенилбутил]-циклопентан-1-карбониламино}-2,3,4,5-тетрагидро-2-оксо-1Н-1-бензазепин-1-уксусная кислота], описанный в WO 2007/106708 Khder et al. (Novartis AG); и их комбинации. В конкретном варианте осуществления ингибитор NEP выбран из ANU-377, кандоксантрила, кандоксантрилата, CGS-24128, фосфорамидона, SCH-32615, SCH-34826, SQ-28603, тиорфана и их комбинаций. В конкретном варианте осуществления ингибитор NEP представляет собой соединение, такое как даглутрил или CGS-26303 ([N-[2-(бифенил-4-ил)-1(*S*)-(1Н-тетразол-5-ил)этил]амино]метилфосфоновая кислота), которые обладают ингибиторной активностью как в отношении эндотелин-превращающего фермента (ECE), так и NEP. Другие соединения, обладающие двойным действием на ECE/NEP, также можно использовать. Ингибитор NEP можно вводить в количестве, достаточном для обеспечения около 20-800 мг в день, при этом типичные дозы составляют 50-700 мг в день, более типично 100-600 или 100-300 мг в день.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с донором оксида азота, примеры которого включают: никорандил; органические нитраты, такие как тетранитрат пентаэритрита; и сиднонимины, такие как линсидомин и молсидомин.

В еще одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с нестероидным противовоспалительным лекарственным средством (НСПВЛС), примеры которого включают: ацетатаин, ацетилсалициловая кислота, алклофенак, алминопрофен, амфенак, амиприлоза, алоксиприн, аниролак, апазон, азапропазон, бенорикат, беноксапрофен, бензпиперилон, броперамол, буклоксинавая кислота, карпрофен, клиданак, диклофенак, дифлунизал, дифталон, эноликам, этодолак, эторикоксиб, фенбуфен, фенклофенак, фенклозиновая кислота, фенопрофен, фентиазак, фепразон, флуфенамовая кислота, флуфенизал, флупрофен, флурбипрофен, фурофенак, ибуфенак, ибупрофен, индометацин, индопрофен, изоксепак, изоксикам, кетопрофен, кеторолак, лофемизол, лорноксикам, меклофенамат, меклофенамовая кислота, мефенамовая кислота, мелоксикам, мезаламин, миропрофен, мофебутазон, набуметон, напроксен, нифлумовая кислота, оксапрозин, окспинак, оксифенбутазон, фенилбутазон, пироксикам, пирпрофен, пранопрופן, салсалат, судоксикам, сульфасалазин, сулиндак, супрофен, теноксикам, тиопинак, тиапрофеновая кислота, тиоксапрофен, толфенамовая кислота, толметин, трифлумидат, зидометацин, зомепирак и их комбинации. В конкретном варианте осуществления НПВЛС выбирают из этодолака, флурбипрофена, ибупрофена, индометацина, кетопрофена, кеторолака, мелоксикама, напроксена, оксапрозина, пироксикама и их комбинаций.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антагонистом рецептора N-метил-D-аспартата (NMDA), примеры которого включают амантадин, декстрометорфан, декстропропосифен, кетамин, кетобемидон, мемантин, метадон и т.п.

В еще одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с агонистом опиоидных рецепторов (также называемым опиоидным анальгетиком). Типичные агонисты опиоидных рецепторов включают бупренорфин, буторфанол, кодеин, дигидрокодеин, фентанил, гидрокодон, гидроморфон, леваллорфан, леворфанол, меперидин, метадон, морфин, налбуфин, налмефен, налорфин, налоксон, налтрексон, налорфин, оксикодон, оксиморфон, пентазоцин, пропоксифен, трамадол и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления агонист опиоидного рецептора выбирают из кодеина, дигидрокодеина, гидрокодона, гидроморфона,

морфина, оксикодона, оксиморфона, трамадола и их комбинаций.

В конкретном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с ингибитором фосфодиэстеразы (PDE), в частности ингибитором PDE-V. Типичными ингибиторами PDE-V являются аванафил, лоденафил, миродефанил, силденафил (Revatio®), тадалафил (Adcirca®), варденафил (Levitra®) и уденафил.

В другом варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с аналогами простагландина (также называемыми простаноидами или аналогами простагличина). Репрезентативные аналоги простагличинов представляют собой берапрост натрий, биматопрост, эпопростенол, илопрост, латанопрост, тафлупрост, травопрост и трепростинил, при этом особый интерес представляют биматопрост, латанопрост и тафлупрост.

В еще одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с агонистом рецептора простагландина, примеры которого включают биматопрост, латанопрост, травопрост и т.п.

Соединение I или кристаллическую форму I' также можно вводить в комбинации с ингибитором ренина, примеры которого включают алискирен, эналкирен, ремикирен и их комбинации.

В другом варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с селективным ингибитором обратного захвата серотонина (SSRI), примеры которого включают: циталопрам и метаболит циталопрама десметил-циталопрам, дапоксетин, эсциталопрам (например, эсциталопрам оксалат), флуоксетин и десметил-метаболит флуоксетина норфлуоксетин, флувоксамин (например, флувоксамин малеат), пароксетин, сертралин и метаболит сертралина деметилсертралин и их комбинации.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с агонистом рецептора серотонина 5-HT_{1D}, примеры которого включают триптаны, такие как алмотриптан, авитриптан, элетриптан, фровариптан, наратриптан, ризатриптан, суматриптан и золмитриптан.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с блокатором натриевых каналов, примеры которого включают карбамазепин, фосфенитоин, ламотригин, лидокаин, мексилетин, окскарбазепин, фенитоин и их комбинации.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации со стимулятором или активатором растворимой гуанилатциклазы, примеры которых включают атацигват, риоцигват и их комбинации.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с трициклическим антидепрессантом (ТСА), примеры которого включают амитриптилин, амитриптилин оксид, бутриптилин, кломипрамин, демексиптилин, дезипрамин, дибензепин, диметакрин, досулепин, доксерин, имипрамин, имипрамин оксид, лофепрамин, мелитрацен, метапрамин, нитроксазепин, нортриптилин, ноксиптилин, пипофезин, пропизепин, протриптилин, хинупрамин и их комбинации.

В одном варианте осуществления соединение I или кристаллическую форму I' вводят в комбинации с антагонистом рецептора вазопрессина, примерами которого являются кониваптан и толваптан.

Комбинированные дополнительные терапевтические средства также могут быть полезны в дальнейшей комбинированной терапии с использованием соединения по изобретению. Например, соединение по изобретению можно комбинировать с диуретиком и ARB, или с блокатором кальциевых каналов и ARB, или с диуретиком и

ингибитором АСЕ, или с блокатором кальциевых каналов и статином. Конкретные примеры включают комбинацию ингибитора АСЕ эналаприла (в форме малеатной соли) и диуретика гидрохлоротиазида, который продается под маркой Vaseretic®, или комбинацию блокатора кальциевых каналов амлодипина (в форме безилатной соли) и ARB олмесартана (в форме пролекарства медоксимила), или комбинацию блокатора кальциевых каналов и статина, которые все также можно использовать с соединением I. Другие терапевтические средства, такие как агонисты $\alpha 2$ -адренергических рецепторов и антагонисты рецепторов вазопрессина, также могут быть полезны в комбинированной терапии. Примеры агонистов $\alpha 2$ -адренергических рецепторов включают клонидин, дексмететомидин и гуанфацин.

Следующие лекарственные формы иллюстрируют репрезентативные фармацевтические композиции по изобретению.

Примеры твердых желатиновых капсул для перорального введения

Соединение по изобретению (50 г), 440 г высушенной распылением лактозы и 10 г стеарата магния тщательно смешивают. Полученную композицию затем загружают в твердые желатиновые капсулы (500 мг композиции на капсулу). Альтернативно, Соединение I или кристаллическую форму I' (20 мг) тщательно смешивают с крахмалом (89 мг), микрокристаллической целлюлозой (89 мг) и стеаратом магния (2 мг). Смесь затем пропускают через сито № 45 меш США и загружают в твердую желатиновую капсулу (200 мг композиции на капсулу).

Альтернативно, Соединение I или кристаллическую форму I' (30 г), дополнительное средство (20 г), 440 г высушенной распылением лактозы и 10 г стеарата магния тщательно смешивают и обрабатывают, как описано выше.

Примеры формулирования желатиновых капсул для перорального введения

Соединение I или кристаллическую форму I' (100 мг) тщательно смешивают с полиоксиэтиленсорбитанмоноолеатом (50 мг) и порошкообразным крахмалом (250 мг). Смесь затем загружают в желатиновую капсулу (400 мг композиции на капсулу). Альтернативно, Соединение I (70 мг) и дополнительное средство (30 мг) тщательно смешивают с полиоксиэтиленсорбитанмоноолеатом (50 мг) и порошкообразным крахмалом (250 мг) и полученную смесь загружают в желатиновую капсулу (400 мг композиции на капсулу).

Альтернативно, Соединение I или кристаллическую форму I' (40 мг) тщательно смешивают с микрокристаллической целлюлозой (Avicel PH 103; 259,2 мг) и стеаратом магния (0,8 мг). Смесь затем загружают в желатиновую капсулу (Размер #1, белая, непрозрачная) (300 мг композиции на капсулу).

Примеры капсул из гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC) для перорального введения

Соединение I или кристаллическую форму I' (50 мг или 100 мг) загружают непосредственно в HPMC капсулу.

Примеры формулирования таблеток для перорального введения

Соединение I или кристаллическую форму I' (10 мг), крахмал (45 мг) и микрокристаллическую целлюлозу (35 мг) пропускают через сито № 20 меш США и тщательно смешивают. Полученные гранулы сушат при 50-60°C и пропускают через сито № 16 меш США. Раствор поливинилпирролидона (4 мг в виде 10% раствора в стерильной воде) смешивают с натрий карбоксиметилкрахмалом (4,5 мг), стеаратом магния (0,5 мг) и тальком (1 мг) и эту смесь затем пропускают через сито № 16 меш США. Натрий карбоксиметилкрахмал, стеарат магния и тальк затем добавляют к гранулам. После смешивания смесь прессуют в машине для таблетирования с получением

таблетки с массой 100 мг.

Альтернативно, Соединение I или кристаллическую форму I' (250 мг) тщательно смешивают с микрокристаллической целлюлозой (400 мг), дымящим диоксидом кремния (10 мг) и стеариновой кислотой (5 мг). Смесь затем прессуют с получением таблеток (665 мг композиции на таблетку).

Альтернативно, Соединение I или кристаллическую форму I' (400 мг) тщательно смешивают с кукурузным крахмалом (50 мг), натрий кроскармеллозой (25 мг), лактозой (120 мг) и стеаратом магния (5 мг). Смесь затем прессуют с получением таблетки с одной насечкой (600 мг композиции на таблетку).

Альтернативно, Соединение I или кристаллическую форму I' (100 мг) тщательно смешивают с кукурузным крахмалом (100 мг) и водным раствором желатина (20 мг). Смесь сушат и измельчают до тонкодисперсного порошка. Микрокристаллическую целлюлозу (50 мг) и стеарат магния (5 мг) затем смешивают с желатиновой композицией, гранулируют и полученную смесь прессуют с получением таблеток (100 мг соединения по изобретению на таблетку).

Пример композиции суспензии для перорального введения

Следующие ингредиенты смешивают с получением суспензии, содержащей 100 мг Соединения I или кристаллической формы I' на 10 мл суспензии:

Ингредиенты	Количество
Соединение I или кристаллическая форма I'	
Фумаровая кислота	
Хлорид натрия	
Метилпарабен	
Пропилпарабен	
Гранулированный сахар	
Сорбит (70% раствор)	
Veegum® K (алюмосиликат магния)	
Отдушка	0,035 мл
Красители	0,5 мг
Дистиллированная вода	сколько потребуется до 100 мл

Пример жидкой композиции для перорального введения

Подходящая жидкая композиция представляет собой композицию с карбоновокислотным буфером, таким как цитратный, лактатный и малеатный буферные растворы. Например, Соединение I или кристаллическую форму I' (которые можно предварительно смешать с DMSO) смешивают с 100 мМ аммонийцитратного буфера и pH доводят до pH 5 или смешивают с раствором 100 мМ лимонной кислоты и pH доводят до pH 2. Такие растворы также могут включать солюбилизующий эксципиент, такой как циклодекстрин, например, раствор может включать 10% масс. гидроксипропил-β-циклодекстрина.

Другие подходящие композиции включают 5% раствор NaHCO₃, с или без циклодекстрина.

Примеры парентеральной в/в композиции для введения путем инъекции

Соединение I или кристаллическую форму I' (0,2 г) смешивают с буферным раствором 0,4 М ацетата натрия (2,0 мл). pH полученного раствора доводят до pH 4 с использованием 0,5 N водного раствора хлористоводородной кислоты или 0,5 N водного раствора гидроксида натрия, при необходимости, и затем добавляют достаточное количество воды для инъекций с получением общего объема 20 мл. Смесь затем фильтруют через стерильный фильтр (0,22 микрон) с получением стерильного раствора,

подходящего для введения путем инъекции.

Следующие композиции иллюстрируют репрезентативные фармацевтические композиции по настоящему изобретению.

Пример композиции А

Замороженный раствор, подходящий для получения раствора для инъекций, получают следующим образом:

Ингредиенты	Количество
Активное Соединение I или I'	10-1000 мг
Экспципенты (например, декстроза)	0-50 г
Вода для инъекционного раствора	10-100 мл

Репрезентативная процедура: экспципенты, если используются, растворяют в около 80% воды для инъекций и добавляют активное Соединение I или I' и растворяют.

рН доводят раствором 1 М гидроксида натрия до 3-4,5 и объем затем доводят до 95% конечного объема водой для инъекций. рН контролируют и регулируют, если необходимо, и объем доводят до конечного объема водой для инъекций. Композицию затем стерильно фильтруют через фильтр 0,22 микрон и помещают в стерильный флакон в асептических условиях. Флакон закрывают крышкой, помечают этикеткой и хранят замороженным.

Пример композиции В

Лиофилизированный порошок или кристаллическое твердое вещество, подходящие для получения раствора для инъекций, получают следующим образом:

Ингредиенты	Количество
Активное Соединение I или I'	10-1000 мг
Экспципенты (например, маннит и/или сахароза)	0-50 г
Буферный агент (например, цитрат)	0-500 мг
Вода для инъекций	10-100 мл

Репрезентативная процедура: экспципенты и/или буферные агенты, если используются, растворяют в около 60% воды для инъекций. Активное Соединение I или I' добавляют и растворяют и рН доводят раствором 1 М гидроксида натрия до 3-4,5 и объем затем доводят до 95% конечного объема водой для инъекций. рН контролируют и регулируют, если необходимо, и объем доводят до конечного объема водой для инъекций.

Композицию затем стерильно фильтруют через фильтр 0,22 микрон и помещают в стерильный флакон в асептических условиях. Композицию затем лиофилизируют с использованием подходящего цикла лиофилизации. Флакон закрывают крышкой (необязательно в условиях частичного вакуума или сухого азота), помечают этикеткой и хранят при замораживании.

Пример композиции С

Раствор для инъекций для внутривенного введения пациенту получают из описанного выше Примера композиции В следующим образом:

Репрезентативная процедура: лиофилизированный порошок Примера композиции В (например, содержащий 10-1000 мг активного Соединения I или I') восстанавливают при помощи 20 мл стерильной воды и полученный раствор затем разбавляют 80 мл стерильного солевого раствора в 100-мл инфузионном мешке. Разбавленный раствор затем вводят пациенту внутривенно в течение 30-120 минут.

Примеры композиций для введения путем ингаляции

Соединение I или I' (0,2 мг) измельчают и затем смешивают с лактозой (25 мг). Затем эту смесь загружают в желатиновый ингаляторный картридж. Содержимое картриджа

вводят, например, с использованием ингалятора сухого порошка.

Альтернативно, микронизированное соединение I или I' (10 г) диспергируют в растворе, полученном растворением лецитина (0,2 г) в деминерализованной воде (200 мл). Полученную суспензию высушивают распылением и затем измельчают с
 5 образованием микронизированной композиции, содержащей частицы со средним диаметром меньше чем около 1,5 мкм. Затем микронизированную композицию загружают в дозированные ингаляторные картриджи, содержащие находящийся под давлением 1,1,1,2-тетрафторэтан, в количестве, достаточном для обеспечения 10-500 г соединения по изобретению на дозу при введении при помощи ингалятора.

10 Альтернативно, соединение I или I' (25 мг) растворяют в изотоническом солевом растворе (125 мл), забуференном цитратом (pH 5). Смесь перемешивают и обрабатывают ультразвуком до растворения соединения. pH раствора контролируют и регулируют, если необходимо, до pH 5 путем медленного добавления водного 1 N водного раствора NaOH. Раствор вводят с использованием распылителя, который обеспечивает около
 15 10-500 мкг Соединения I или I' на дозу.

ПРИМЕРЫ

Следующие схемы реакций/получения и примеры представлены для иллюстрации конкретных вариантов осуществления изобретения. Эти конкретные варианты осуществления, однако, не предназначены для ограничения объема изобретения каким-
 20 либо образом, если это специально не указано.

Следующие аббревиатуры имеют следующие значения, если не указано иное, и любые другие аббревиатуры, используемые, но не определенные в настоящей заявке, имеют их стандартное, общепринятое значение:

ACN=ацетонитрил

25 CPME=циклопентилметилловый эфир

d=день(дни)

DCC=*N,N'*-дициклогексилкарбодиимид

DCM=дихлорметан или метилхлорид

DIPE=диизопропиловый эфир

30 DIPEA=*N,N*-диизопропилэтиламин

DMF=*N,N*-диметилформамид

EDTA=этилендиаминтетрауксусная кислота

EtOH=этанол

EtOAc=этилацетат

35 г=грамм(граммы)

ч=час(часы)

H₂=газообразный водород

H₂O₂=пероксид водорода

40 HCTU=2-(6-хлор-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний
 гексафторфосфат(V)

HATU=*N,N,N',N'*-тетраметил-О-(7-азабензотриазол-1-ил)уроний гексафторфосфат

HCl=хлористый водород

NaNH₄=борогидрид натрия

45 NaCl=хлорид натрия

NaHCO₃=бикарбонат натрия

Na₂CO₃=карбонат натрия

NaNMDS=бис(триметилсилил)амид натрия или гексаметилдисилазид натрия

NaOH=гидроксид натрия

Na₂SO₄= сульфат натрия

NH₄Cl=хлорид аммония

NMM=N-метилморфолин

MeI=метилюидид

MeOH=метанол

мин=минута(минуты)

MgSO₄=сульфат магния

Pd(PPh₃)₄=тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0)

Pd/C=палладий на активированном угле, нагрузка 10%

PE=петролейный эфир

SiO₂=диоксид кремния или кремнезем

TFA=трифторуксусная кислота

THF=тетрагидрофуран

Если не указано иное, все материалы, такие как реагенты, исходные вещества и растворители, закупали у коммерческих поставщиков (таких как Sigma-Aldrich, Fluka Riedel-de Haën и т.п.) и использовали без дополнительной очистки.

Реакции осуществляли в атмосфере азота, если не указано иное. Развитие реакций контролировали тонкослойной хроматографией (ТСХ), аналитической высоко-эффективной жидкостной хроматографией (анал. ВЭЖХ) и масс-спектрометрией, детали которых описаны в конкретных примерах. Типичные условия аналитической ВЭЖХ следующие:

А. Условия аналитической ВЭЖХ - Метод А

Оборудование	Agilent 1260 HPLC
Колонка	Advance Material Technology HALO®; 150×4,6 мм; 2,7 микрон
Температура колонки	30°C
Скорость потока	1,0 мл/мин
Объем вводимой пробы	5 мкл
Подготовка образца	Растворяют в 1:1 ACN:воде
Подвижные фазы	A=Вода:ACN:TFA (98:2:0,1) B=Вода:ACN:TFA (30:70:0,1)
Длина волны детектора	254 нм
Градиент	22 мин всего Время (мин)/% B: 0/30, 15/100, 18/100, 20/30, 22/30

В. Условия аналитической ВЭЖХ - Метод В

Оборудование	Agilent 1260 HPLC
Колонка	Agilent Zorbax-Bonus RP-C18; 150×4,6 мм; 3,5 микрон
Температура колонки	40°C
Скорость потока	1,5 мл/мин
Объем вводимой пробы	5 мкл
Подготовка образца	Растворяют в 1:1 ACN:1 M HCl
Подвижные фазы	A=Вода:TFA (99,95:0,05) B=ACN:TFA (99,95:0,05)
Длина волны детектора	254 нм и 214 нм
Градиент	26 мин всего Время (мин)/% B: 0/5, 18/90, 22/90, 22,5/90, 26/5

Реакционные смеси обрабатывали, как описано, например, в каждом получении; обычно реакционные смеси очищали экстракцией и другими способами очистки, такими как зависящая от температуры и растворителя кристаллизация и осаждение. Кроме

того, реакционные смеси обычно очищали препаративной ВЭЖХ, как правило, с использованием наполнителей для колонок Microsorb C18 и Microsorb BDS и обычных элюентов. Развитие реакций обычно измеряли методом масс-спектрометрии с жидкостной хроматографией (ЖХМС). Характеризацию изомеров осуществляли при помощи спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (NOE). Характеризацию продуктов реакции обычно осуществляли по массе и методом ^1H -ЯМР-спектроскопии. Для ЯМР измерений образцы растворяли в дейтерированном растворителе (CD_3OD , CDCl_3 или $\text{DMSO}-d_6$) и ^1H -ЯМР-спектры получали на устройстве Varian Gemini 2000 (400 МГц) в стандартных условиях наблюдения. Масс-спектрометрическую идентификацию соединений обычно осуществляли с использованием метода электрораспылительной ионизации (ESMS) на устройстве API Applied Biosystems (Foster City, CA) API 150 EX или на устройстве Agilent (Palo Alto, CA) 1200 LC/MSD.

Методы измерений

Порошковая рентгеновская дифракция

Порошковый рентгеновский дифракционный анализ осуществляли с использованием рентгеновского дифрактометра Bruker D8-Advance. Источником рентгеновского излучения было $\text{Cu-K}\alpha$ излучение с напряжением на выходе 40 кВ и током 40 мА. Устройство работало в геометрии Брэгга-Брентано и с использованием зеркал Гебеля для получения параллельного рентгеновского луча. Любая расходимость в пучке была ограничена щелью вертикальной расходимости $0,2^\circ$ на источнике и щелями Соллера ($2,5^\circ$) у источника и детектора. Для измерения небольшое количество порошка (5-25 мг) осторожно прижимали на держателе для образца с нулевым фоном для образования гладкой поверхности и подвергали воздействию рентгеновского излучения. Образцы сканировали в режиме θ - 2θ в диапазоне от 2° до 35° в 2θ с размером шага $0,02^\circ$ и скоростью сканирования 0,3 сек/шаг. Сбор данных контролировали с использованием программы Bruker DifractSuite и анализировали с использованием программы Jade (версия 7.5.1). Устройство калибровали с использованием корундового стандарта в пределах угла $\pm 0,02^\circ 2\theta$.

Следует иметь в виду, что геометрия Брэгга-Брентано, используемая при сборе данных, склонна к предпочтительной ориентации. В этих условиях возможно, что относительные интенсивности дифракционных пиков могут не представлять истинные относительные интенсивности, которые были бы получены при идеализированном распределении сферических частиц или дифракционной картине, смоделированной на основании данных монокристалла. Возможно также, что некоторые пики не видны на некоторых дифрактограммах из-за экстенсивной предпочтительной ориентации.

Дифференциальная сканирующая калориметрия

Измерения методом DSC осуществляли с использованием модуля TA Instruments Model Q-100 с контроллером Thermal Analyst. Данные собирали и анализировали с использованием программы TA Instruments Universal Analysis. Образец точно взвешивали в закрытой алюминиевой чаше. После 5-минутного периода изотермического уравнивания при 5°C образец нагревали с использованием линейного нагрева $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ от 0°C до 250°C .

Термогравиметрический анализ

Измерения методом термогравиметрии осуществляли с использованием модуля TA Instruments Model Q-500 с возможностью высокого разрешения. Данные собирали с использованием контроллера TA Instruments Thermal Analyst и анализировали с использованием программы TA Instruments Universal Analysis. Взвешенный образец

помещали на платиновую чашу и сканировали со скоростью нагрева 10°C/мин от температуры окружающей среды до 300°C. Весы и камеры печи продували потоком азота во время использования.

Поляризованная световая микроскопия

5 Для исследований методом микроскопии в поляризованном свете (PLM) образцы исследовали под оптическим микроскопом (Olympus BX51) с кросс-поляризованным светофильтром. Изображения собирали при помощи камеры PaxCam, управляемой программой PaxIt Imaging (версия 6.4). Образцы подготавливали на предметных стеклах, со светлым минеральным маслом в качестве иммерсионной среды. В зависимости от
10 размера частиц для увеличения использовали объектив 4х, 10х или 20х.

Оценка методом динамической сорбции влаги

Измерения методом DMS осуществляли с использованием работающих при атмосферном давлении микровесов VTI, системы SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Использовали взвешенный образец, и влажность была наименее возможной (близкой
15 к 0% относительной влажности) в начале анализа. DMS анализ включал скорость сканирования 5% относительной влажности/шаг в полном диапазоне влажности 5-90%. DMS анализ осуществляли изотермически при 25°C.

Схемы реакций синтеза

(3S,5R)-5-[[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]метил]-3-(гидроксиметил)-3-
20 метилпирролидин-2-он (А), используемый в настоящем изобретении, может быть получен из исходных веществ и реагентов с использованием процедур, описанных в примере 1, и как показано на Схеме А

Схема А:

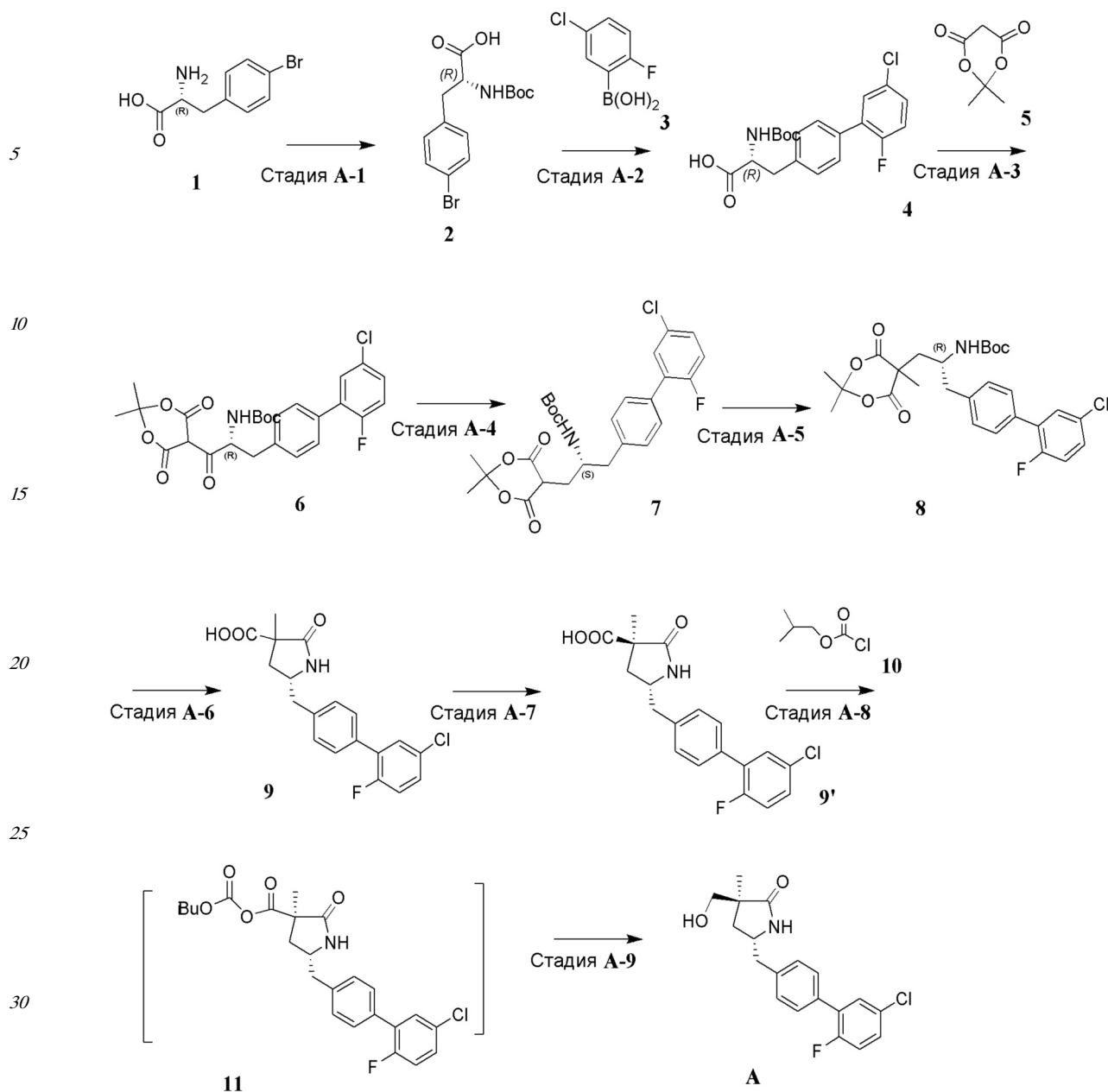
25

30

35

40

45



Общие стадии реакций на Схеме А следующие. Группу амина соединения 1 сначала защищают путем растворения 1 в растворителе с водным раствором основания в инертной атмосфере при низкой температуре, с последующим добавлением защитного агента для амина в растворителе при комнатной температуре перед выделением. Соединение 1, основание и защитный агент для амина можно использовать в молярном соотношении приблизительно 1:2:1. Растворители, которые можно использовать для реакции соединения 1 с амин-защитным агентом, включают, но не ограничиваются этим, полярные апротонные растворители, такие как ацетонитрил. Основания включают, но не ограничиваются этим, сильные основания, включая LiOH, NaOH и KOH. Низкие температуры типично означают температуры при или ниже -10°C .

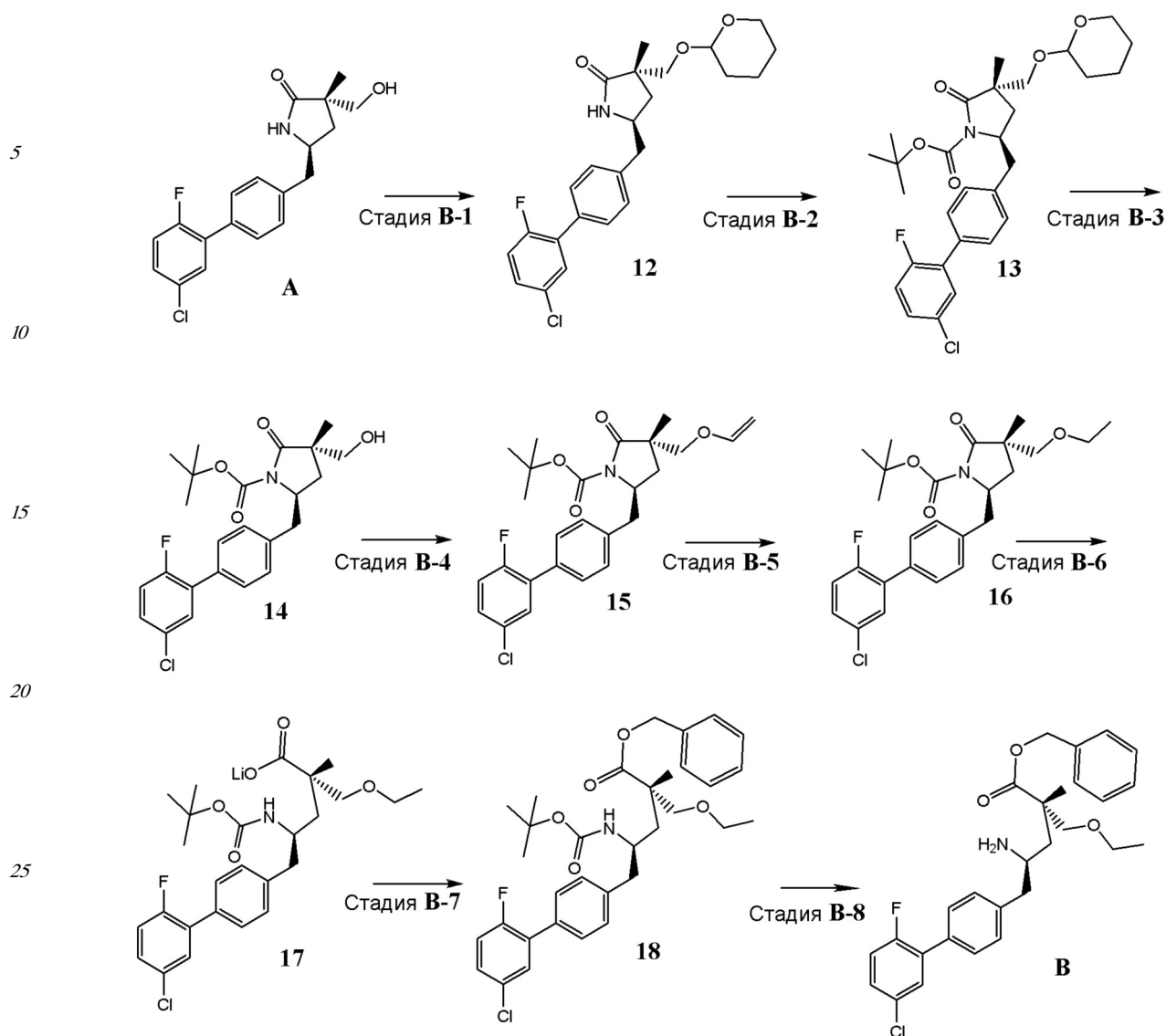
Соединение 2 затем подвергают взаимодействию с соединением 3 в растворителе с добавлением амфотерного соединения, например, NaHCO_3 в воде, и катализатора, такого как $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, в инертной атмосфере. Это приводит к производному 4, которое затем подвергают взаимодействию с соединением 5 в апротонном растворителе с нуклеофильным катализатором в инертной атмосфере. Затем используют агент

пептидного связывания для получения соединения 6. Соединение 6 затем помещают в растворитель со слабой кислотой в инертной атмосфере и добавляют восстановитель при низкой температуре (при или ниже -5°C). Эту смесь оставляют для перемешивания на несколько часов, затем гасят насыщенным соевым раствором. Соединение 7 затем выделяют экстракцией раствором слабого основания и сушат с использованием осушителя перед концентрированием в вакууме.

Соединение 7 затем метилируют в апротонном растворителе со слабым основанием с использованием метилирующего агента, такого как MeI. Образовавшееся твердое вещество выделяют и снова растворяют в растворителе перед сушкой с использованием осушителя и концентрирования в вакууме, с получением соединения 8. Соединение 8 затем подвергают взаимодействию с кислотой в эфирном растворителе с получением соединения 9, которое затем концентрируют и промывают дополнительным растворителем с получением соединения 9'. Соединение 9' затем помещают в инертную атмосферу в полярном апротонном растворителе и подвергают взаимодействию с 10 при низких температурах ($< -5^{\circ}\text{C}$) с получением промежуточного соединения 11. Соединение А получают путем взаимодействия 11 с органическим основанием с последующим взаимодействием с 10 при низкой температуре и восстановлением с использованием восстановителя.

(2*S*,4*R*)-бензил 4-амино-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-2-метилпентаноат (В), используемый в настоящем изобретении, можно получить из ранее полученного исходного вещества (А) и реагентов с использованием процедур, описанных в примере 2, и как показано на Схеме В:

Схема В



Общие стадии реакций на Схеме В следующие. Соединение А сначала подвергают взаимодействию с 3,4-дигидро-2Н-пираном в растворителе, содержащем кислоту, перед нейтрализацией и выделением. Полученную неочищенную смесь помещают в эфирный растворитель и перемешивают при низкой температуре с получением суспензии.

Суспензию затем промывают, сушат и концентрируют до получения вязкого масла 12 перед защитой азота кольца ди-*трет*-бутилдикarbonатом с получением 13 в стандартных условиях. Эфирную группу в 13 затем расщепляют сильной кислотой с получением спиртовой группы, как показано в 14. Соединение 14 затем подвергают взаимодействию с этилвиниловым эфиром путем добавления гетероциклического органического лиганда, например, 1,10-фенантролина, в инертной атмосфере, с последующим добавлением металлического катализатора, например, палладиевого катализатора. Алкеновую группу в очищенном продукте 15 восстанавливают с использованием, например, H_2 и 10% Pd/C, с получением 16. Раскрытие кольца пирролидона (омыление) в 16 осуществляют с использованием водного раствора перед очисткой и выделением, с получением соединения 17. Карбоксилатную группу в 17 затем защищают, например, бензилбромидом, в стандартных условиях с получением 18. Это осуществляют до снятия защиты группы амина соединения 18 для получения соединения В.

Как обсуждается выше, иллюстративные реакционные условия для Схем А и В

описаны ниже в примерах 1 и 2, соответственно.

ПРИМЕР 1

Синтез (3*S*,5*R*)-5-[[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]метил]-3-(гидроксиметил)-3-метилпирролидин-2-она (А)

Стадия А-1:

Раствор (2*R*)-2-амино-3-(4-бромфенил)пропановой кислоты (1) (3300 г, 13,52 моль) в ацетонитриле (46,2 л) помещали в 250-л реактор, который продували и в котором поддерживали инертную атмосферу азота. Добавляли раствор NaOH (1081 г, 27,02 моль) в воде (46,2 л) несколькими порциями при -10°C. После этого добавляли раствор ди-*трет*-бутилдикарбоната (2948 г, 13,51 моль) в ACN (6,6 л). Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и затем концентрировали в вакууме. Этот полученный раствор разбавляли при помощи 45 л воды/льда и значение рН раствора доводили до рН 2 1*N* раствором HCl. Полученный раствор затем экстрагировали при помощи 3×50 л DCM и органические слои объединяли. Полученную смесь промывали 1×50 л насыщенного солевого раствора и сушили над безводным MgSO₄ иконцентрировали в вакууме. В результате получали 3720 г (80%) (2*R*)-3-(4-бромфенил)-2-[[(*трет*-бутоксикарбонил)амино]пропановой кислоты (2) в виде белого твердого вещества.

Стадия А-2:

Раствор (2*R*)-3-(4-бромфенил)-2-[[(*трет*-бутоксикарбонил)амино]пропановой кислоты (2) (530 г, 1,54 моль) в диоксане (9,54 л), (5-хлор-2-фторфенил)бороновую кислоту (3) (348 г, 2,00 моль), раствор Na₂CO₃ (228 г, 2,15 моль) в воде (1,06 л) и Pd(PPh₃)₄ (8,89 г, 7,69 ммоль) помещали в 20-л 4-горлую круглодонную колбу, которую продували и поддерживали в инертной атмосфере азота. Полученный раствор нагревали с обратным холодильником в течение 2,5 часов на масляной бане и затем охлаждали до комнатной температуры на бане вода/лед. Полученный раствор разбавляли при помощи 15 л EtOAc и промывали при помощи 1×5 л 1*N* раствора HCl и 4×5 л насыщенного солевого раствора. Объединенные органические экстракты сушили над безводным MgSO₄ иконцентрировали в вакууме. Остаток промывали при помощи 2×1 л PE. В результате получали 510 г (84%) (2*R*)-2-[[(*трет*-бутоксикарбонил)амино]-3-[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]пропановой кислоты (4) в виде коричневого масла.

Стадия А-3:

Раствор (2*R*)-2-[[(*трет*-бутоксикарбонил)амино]-3-[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]пропановой кислоты (4) (510 г, 1,29 моль) в DCM (5000 мл), 2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона (5) (205 г, 1,42 моль) и 4-диметиламинопиридина (237 г, 1,94 моль) помещали в 10-л 4-горлую круглодонную колбу, которую перед этим продували и поддерживали в инертной атмосфере азота. После этого добавляли раствор DCC (294 г, 1,43 моль) в DCM (600 мл) по каплям при перемешивании при -10°C. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и твердое вещество удаляли фильтрованием. Фильтрат промывали 1 *N* раствором HCl (2 л) и насыщенным соевым раствором (3 л). Объединенные органические экстракты сушили над безводным MgSO₄ и твердые вещества удаляли фильтрованием. Фильтрат, *трет*-бутил N-[(2*R*)-3-[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]-1-(2,2-диметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)-1-оксопропан-2-ил]карбамат (6), использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия А-4:

Раствор *трет*-бутил N-[(2*R*)-3-[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]-1-(2,2-диметил-4,6-

диоксо-1,3-диоксан-5-ил)-1-оксопропан-2-ил]карбамата (6) в DCM (7 л) и AcOH (600 мл) помещали в 20-л 4-горлую круглодонную колбу, которую перед этим продували и поддерживали в инертной атмосфере азота. После этого добавляли NaBH_4 (88,8 г, 2,35 моль) несколькими порциями при -5°C . Полученный раствор перемешивали в течение 3 часов при -5°C на бане лед/соль и затем гасили добавлением 1 л насыщенного солевого раствора по каплям. Полученный раствор разбавляли 2 л насыщенного солевого раствора и промывали при помощи 2×2 л воды и 1×1 л Na_2CO_3 и 1×2 л насыщенного солевого раствора. Объединенные органические экстракты сушили над безводным MgSO_4 и концентрировали в вакууме. В результате получали 520 г (79%) *трет*-бутил N-[(2*S*)-1-[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]-3-(2,2-диметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)пропан-2-ил]карбамата (7) в виде желтого масла.

Стадия А-5:

Раствор *трет*-бутил N-[(2*S*)-1-[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]-3-(2,2-диметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)пропан-2-ил]карбамата (7) (520 г, 1,03 моль) в ацетоне/DMF (1:1) (5,2 л), Na_2CO_3 (163 г, 1,54 моль) и MeI (219 г, 1,54 моль) помещали в 10-л 4-горлую круглодонную колбу, которую перед этим продували и поддерживали в инертной атмосфере азота. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и затем разбавляли при помощи 15 л воды. После перемешивания в течение 1 часа твердые вещества собирали фильтрованием. Остаток растворяли в 5 л DCM. Объединенные органические экстракты сушили над безводным MgSO_4 и концентрировали в вакууме. В результате получали 520 г (97%) *трет*-бутил N-[(2*R*)-1-[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]-3-(2,2,5-триметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)пропан-2-ил]карбамата (8) в виде желтого твердого вещества.

Стадии А-6 и А-7:

Раствор *трет*-бутил N-[(2*R*)-1-[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]-3-(2,2,5-триметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)пропан-2-ил]карбамата (8) (520 г, 1,00 моль, 1,00 экв.) в CPME (2,6 л) помещали в 10-л 4-горлую круглодонную колбу, которую перед этим продували и поддерживали в инертной атмосфере азота. После этого добавляли HCl/CPME (4*N*) (2,6 л) при -5°C . Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали до половины объема в вакууме. Твердые вещества собирали фильтрованием и затем промывали при помощи EtOAc/DIPE (1:2). В результате получали 220 г (61%) (3*R*,5*R*)-5-[[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]метил]-3-метил-2-оксопирролидин-3-карбоновой кислоты (9') в виде не совсем белого твердого вещества.

Стадии А-8 и А-9:

Раствор (3*R*,5*R*)-5-[[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]метил]-3-метил-2-оксопирролидин-3-карбоновой кислоты (9') (218 г, 602,55 ммоль) в THF (4 л), NMM (170 г, 1,68 моль) помещали в 10-л 4-горлую круглодонную колбу, которую перед этим продували и поддерживали в инертной атмосфере азота. После этого добавляли 2-метилпропилхлорформиат (164,4 г, 1,20 моль) по каплям при перемешивании при -5°C . Полученный раствор перемешивали еще в течение 20 минут при -5°C на бане лед/соль. Затем добавляли раствор NaBH_4 (91,5 г, 2,42 моль) в воде (400 мл) по каплям при перемешивании при -5°C и перемешивали еще в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакцию затем гасили путем добавления по каплям 2,6 л 1*N* раствора HCl. Полученную смесь снова перемешивали в течение 1 часа и затем концентрировали в вакууме для удаления THF. Оставшуюся смесь затем перемешивали еще в течение 1 часа и затем твердые вещества собирали фильтрованием. Твердое вещество промывали

водой, растворяли в THF, сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. В результате получали 170 г (81%) (3*S*,5*R*)-5-[[4-(5-хлор-2-фторфенил)фенил]метил]-3-(гидроксиметил)-3-метилпирролидин-2-она (А) в виде белого твердого вещества.

ПРИМЕР 2

Синтез (2*S*,4*R*)-бензил 4-амино-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-2-метилпентаноата (В)

Стадия В-1:

В 5000-мл снабженную рубашкой круглодонную колбу добавляли (3*S*,5*R*)-5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-(гидроксиметил)-3-метилпирролидин-2-он (А) (121,0 г, 348 ммоль) и DCM (2420 мл) с получением гомогенного прозрачного раствора, который затем охлаждали до 0°C при перемешивании. Добавляли 3,4-дигидро-2Н-пиран (71,0 мл, 783 ммоль) и 4-метилбензолсульфоновую кислоту (20,97 г, 122 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 18,5°C в течение ночи с достижением >98% конверсии. Реакционную смесь затем гасили 2420 мл насыщенного раствора NaHCO₃, фазы медленно разделяли, органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и растворитель удаляли. Неочищенную смесь затем помещали в DIPE (1815 мл) при перемешивании при 21°C в течение 1 часа, затем охлаждали и перемешивали при 0-5°C в течение 5 часов с получением белой суспензии. Суспензию фильтровали и промывали 1× объемом холодного (0°C) DIPE и фильтровали. Полученное твердое вещество сушили в течение ночи с получением 113,8 г; чистота 99,1% по данным ВЭЖХ. Фильтрат затем сушили с получением 24 г густого масла. Добавляли DIPE (96 мл) и смесь перемешивали в течение ночи при 0-5°C с получением (3*S*,5*R*)-5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-метил-3-(((тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)метил)пирролидин-2-она (12).

Стадия В-2:

В 5000-мл снабженную рубашкой круглодонную колбу добавляли (3*S*,5*R*)-5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-метил-3-(((тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)метил)пирролидин-2-он (12) (113,8 г, 263 ммоль) и THF (1707 мл) при перемешивании с получением прозрачного гомогенного раствора, который продували азотом и охлаждали до -10°C. Добавляли по каплям 1М NaHMDs в THF (290 мл, 290 ммоль) при температуре ниже 0°C и реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут.

Ди-*трет*-бутилдикарбонат (69,0 г, 316 ммоль) растворяли добавлением по каплям в 3-кратно превышающий его объем THF (207 мл) при температуре ниже 10°C. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение ночи и гасили 20% раствором хлорида аммония (2731 мл). Добавляли EtOAc (1821 мл) и фазы разделяли на водный слой (pH 9) и органический слой. Органический слой промывали насыщенным соевым раствором (2731 мл) и фазы разделяли снова на водную фазу (pH 7) и органический слой, при этом органический слой сушили при помощи Na₂SO₄ перед фильтрованием. Растворитель удаляли с получением густого масла. Смесь сушили в течение ночи и получали (3*S*,5*R*)-*трет*-бутил 5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-метил-2-оксо-3-(((тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)метил)пирролидин-1-карбоксилат (13) (146,5 г, 275 ммоль, выход 105%, чистота 98,76%) в виде пенистого твердого вещества.

Стадия В-3:

(3*S*,5*R*)-*трет*-бутил 5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-метил-2-оксо-3-(((тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)метил)пирролидин-1-карбоксилат (13) (146,5 г, 275 ммоль) и MeOH (1465 мл) добавляли в 3000-мл круглодонную колбу. Затем добавляли 4-метилбензолсульфоновую кислоту, H₂O (3,93 г, 20,65 ммоль) и реакционную смесь

перемешивали при 0°C в течение 16 часов с достижением >97% конверсии. Для завершения реакции добавляли EtOAc (2930 мл) с последующей отгонкой при температуре бани ниже 30°C с уменьшением общего объема до приблизительно 293 мл. К концентрированному раствору добавляли снова EtOAc (2930 мл) и осуществляли дистилляцию до приблизительно 293 мл. Конечную промывку завершали путем добавления EtOAc (2930 мл) и осуществляли дистилляцию до конечного объема 1465 мл до полного удаления любого остаточного метанола. Оставшуюся кислоту гасили путем промывки указанного выше конечного объема (1465 мл) при помощи EtOAc, содержащего 10% NaHCO₃ (1465 мл), при перемешивании в течение 30 минут при температуре ≤ 21°C. Слои оставляли для разделения, прекращая перемешивание (водный слой pH~7). Органический слой промывали при помощи 1465 мл насыщенного солевого раствора и оставляли для разделения (водный слой pH=7). Этилацетатный слой затем сушили в вакууме до ~146,5 мл, затем медленно добавляли 1465 мл гексана до точки помутнения. Раствору давали отстояться в течение 1 часа с последующим добавлением 1465 мл гексана. Смесь перемешивали в течение ночи при 0°C и твердые вещества фильтровали и промывали при помощи 293 мл гексана. Оставшиеся твердые вещества сушили в течение ночи в условиях высокого вакуума с получением 98,4 г (3*S*,5*R*)-трет-бутил 5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-(гидроксиметил)-3-метил-2-оксопирролидин-1-карбоксилата (14); выход 80%; чистота 99,3% по данным ВЭЖХ.

Стадия В-4:

(3*S*,5*R*)-трет-бутил 5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-(гидроксиметил)-3-метил-2-оксопирролидин-1-карбоксилат (14) (118,2 г, 264 ммоль) и DCM (591 мл) добавляли в 100-мл круглодонную колбу с получением бесцветного раствора. В сосуд добавляли этилвиниловый эфир (761 мл, 7916 ммоль) и 1,10-фенантролин (4,76 г, 26,4 ммоль) и продували при помощи N₂, с последующим добавлением Pd(II)ацетата (8,89 г, 39,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов с достижением ~81% конверсии. Растворитель удаляли на ротаторном испарителе с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией. Колонку предварительно кондиционировали 100% гексаном и неочищенный продукт (30 г/цикл) растворяли в DCM и загружали в колонку с насадкой 300 г силикагеля. Использовали изократический градиент с 40% этилацетата/гексан для элюирования соединения, с получением 91,25 г очищенного (3*S*,5*R*)-трет-бутил 5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-метил-2-оксо-3-((винилокси)метил)пирролидин-1-карбоксилата (15).

Стадия В-5:

(3*S*,5*R*)-трет-бутил 5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-метил-2-оксо-3-((винилокси)метил)пирролидин-1-карбоксилат (15) (185 г, 390 ммоль) растворяли в THF (1900 мл) и добавляли уксусную кислоту (11,17 мл) с последующей N₂ продувкой в течение 10 минут. Смесь затем барботировали при помощи H₂ и добавляли 10% Pd/C (18,5 г). Медленную продувку газообразным H₂ продолжали в течение ночи при 22°C вплоть до завершения реакции, что показал анализ ВЭЖХ. Реакционную смесь фильтровали через целит с получением гомогенного раствора. Фильтрат затем сушили досуха в условиях высокого вакуума с получением 185 грамм (3*S*,5*R*)-трет-бутил 5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-(этоксиметил)-3-метил-2-оксопирролидин-1-карбоксилата (16); 89% ВЭЖХ; выход 99%.

Стадия В-6:

(3*S*,5*R*)-*трет*-бутил 5-((5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)метил)-3-(этоксиметил)-3-метил-2-оксопирролидин-1-карбоксилат (16) (185 г, 389 ммоль) и ~1205 мл THF добавляли в 3000-мл круглодонную колбу с получением бесцветного раствора.

Добавляли приблизительно 1205 мл 1М LiOH в H₂O и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи для завершения омыления. К реакционной смеси добавляли приблизительно 1205 мл EtOAc (pH=13) и затем промывали с использованием приблизительно 1205 мл насыщенного водного раствора NH₄Cl. Фазы разделяли на водную фазу (pH=8) и органическую фазу, при этом продукт оставался в органическом слое. Органический слой затем промывали насыщенным соевым раствором, слои снова разделяли и органический слой сушили над Na₂SO₄, затем фильтровали и сушили в вакууме с получением литий (2*S*,4*R*)-4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-2-метилпентаноата (17) (213 г, 426 ммоль, выход 94,6%).

Стадия В-7:

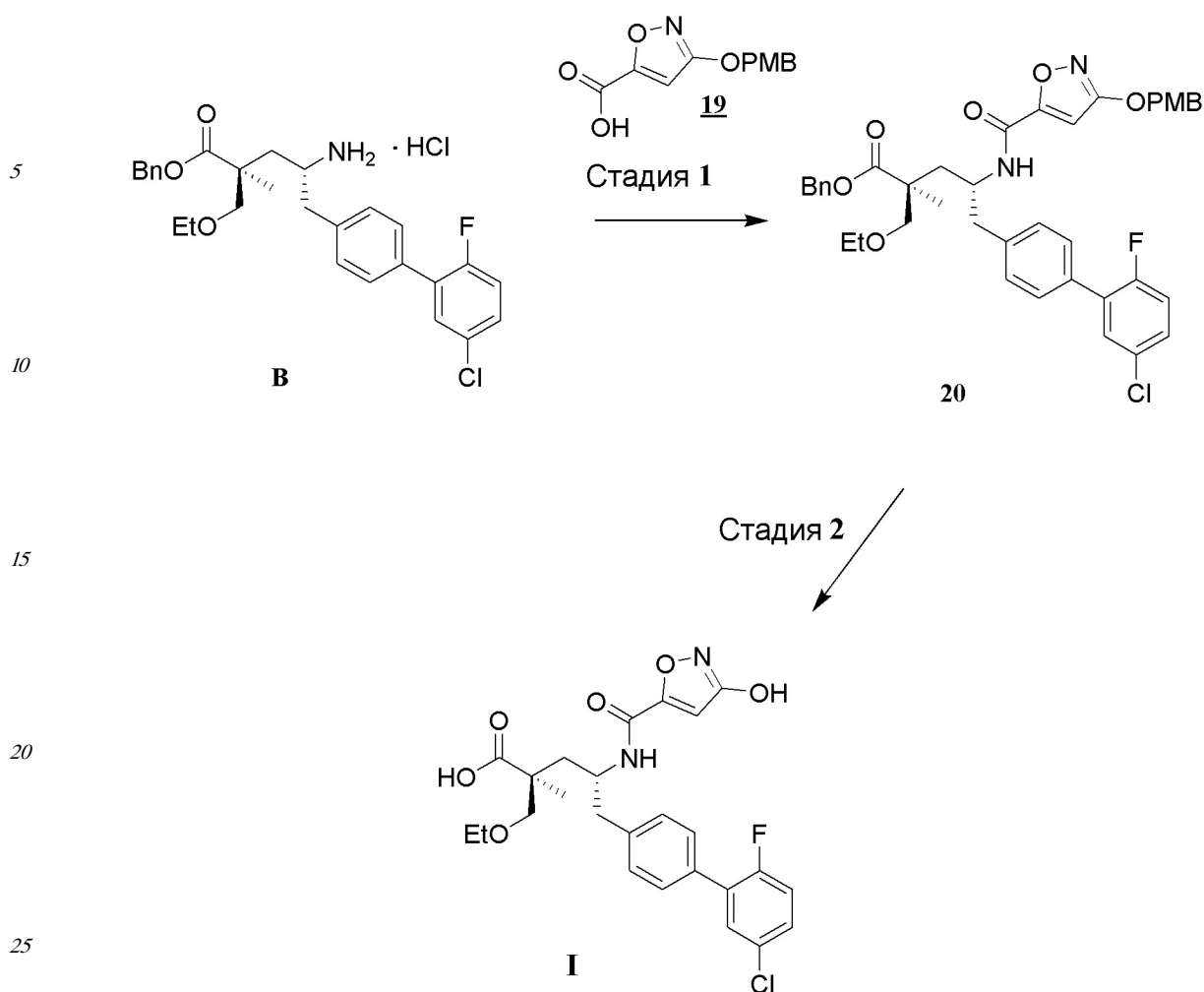
Литий (2*S*,4*R*)-4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-2-метилпентаноат (17) (194,0 г, 393 ммоль) и ~650 мл DMF помещали в 2-л круглодонную колбу с получением бесцветного раствора. Добавляли K₂CO₃ (81 г, 589 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли бензилбромид (56,1 мл, 471 ммоль) одной порцией и реакционную смесь перемешивали при приблизительно 22°C в течение ночи. Полная конверсия достигалась через 20 часов, как показал анализ ЖХМС или ТСХ. Добавляли приблизительно 3900 мл NH₄Cl и приблизительно 650 мл EtOAc и перемешивали в течение 15 минут и фазы разделяли. Органический слой промывали при помощи ~3900 мл насыщенного солевого раствора, слои разделяли снова и органический слой сушили над сульфатом натрия с последующим удалением растворителя. Неочищенный продукт очищали на SiO₂ 0-25% EtOAc/гексан и объединенные очищенные фракции давали (2*S*,4*R*)-бензил 4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-2-метилпентаноат (18) (190 г, 322 ммоль, выход 82%). MS *m/z* {M+H}⁺ рассчитано для C₃₃H₃₉ClFNO₅, 584,118; найдено 584,12.

Стадия В-8:

(2*S*,4*R*)-Бензил 4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-2-метилпентаноат (18) загружали в 3-л круглодонную колбу (190,0 г, 325 ммоль). Добавляли 3М HCl в CPME (1084 мл, 3253 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 50 часов с получением суспензии при >99% конверсии. Добавляли приблизительно 1084 мл свежего CPME и полученную суспензию перемешивали в течение 3 часов перед фильтрованием. Твердые вещества промывали при помощи ~250 мл холодного (0°C) CPME. Твердые вещества затем сушили под потоком газобразного N₂ с получением (2*S*,4*R*)-бензил 4-амино-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-2-метилпентаноата (В), HCl (150 г, 288 ммоль, выход 89%, чистота 99,5%) в виде белого твердого вещества. MS *m/z* [M+H]⁺ рассчитано для C₂₈H₃₁ClFNO₃, 484,00; найдено 520,46 (HCl соль).

ПРИМЕР 3:

(2*S*,4*R*)-5-(5'-Хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановая кислота (Соединение I)



Стадия 1:

30 Бензил (2*S*,4*R*)-4-амино-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-2-метилпентаноат гидрохлорид (**B**) (2,95 кг, 5668 ммоль) подвергали взаимодействию с 3-((4-метоксибензил)окси)изоксазол-5-карбоновой кислотой (**19**) (1,48 кг, 5939 ммоль) с использованием НСТУ (2,71 кг, 6551 ммоль) и DIPEA (0,28 кг, 2180 ммоль) в THF (26,64 кг). Смесь охлаждали до <10°C. Затем к смеси добавляли DIPEA (2,24 кг, 17,332 ммоль) при температуре ниже 10°C и смесь доводили до температуры 20°C ± 10°C и перемешивали по меньшей мере в течение 1 часа до завершения реакции. Затем к смеси

35 добавляли EtOAc (26,55 кг) с последующим добавлением USP воды (29,5 кг) при температуре ниже 30°C. Смесь затем взбалтывали по меньшей мере в течение 30 минут при температуре 20°C ± 10°C и оставляли для осаждения по меньшей мере в течение 30 минут. Нижний водный слой распределяли в контейнеры. К смеси добавляли раствор 5% масс./масс. NaHCO₃ (30,4 кг) при температуре ниже 30°C, снова взбалтывали по

40 меньшей мере в течение 30 минут при температуре 20°C ± 10°C и осаждали по меньшей мере в течение 30 минут. Нижний водный слой распределяли в контейнеры. NaHCO₃ стадию повторяли еще два раза и затем брали пробу смеси для определения содержания 6-хлор-1-гидроксibenзотриазола. К смеси добавляли 10% масс./об. раствор NaCl (31,6 кг) при температуре ниже 30°C, взбалтывали по меньшей мере в течение 30 минут при температуре 20°C ± 10°C и затем осаждали по меньшей мере в течение 30 минут. Нижний водный слой распределяли в контейнеры. Оставшийся слой подвергали дистилляции до около 9 л, поддерживая при этом температуру смеси ниже 30°C. Затем к смеси

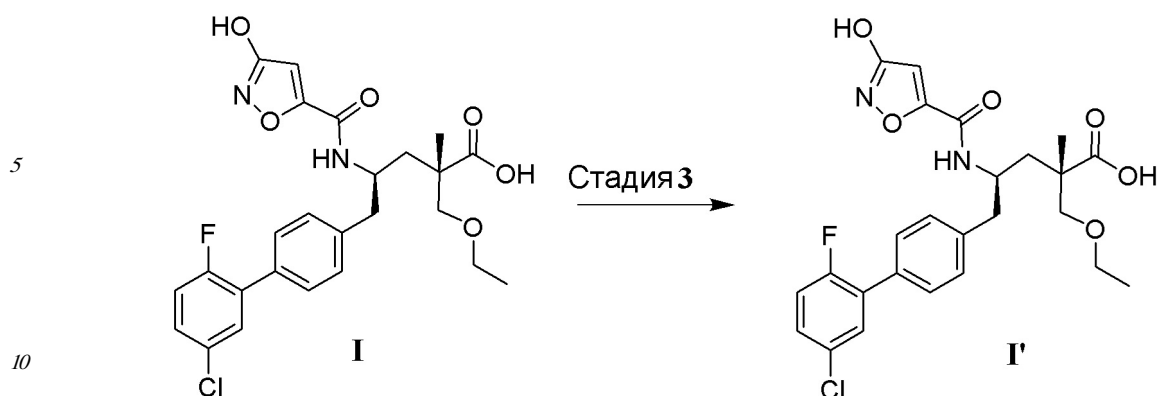
добавляли EtOAc (39,8 кг) и использовали вакуум-дистилляцию для уменьшения объема смеси до около 9 л, поддерживая при этом температуру смеси ниже 30°C. К смеси снова добавляли EtOAc (10,3 кг) и смесь перемешивали по меньшей мере в течение 10 минут. Смесь в первом реакционном сосуде затем переносили через встроенный фильтр во второй реакционный сосуд. EtOAc (5,6 кг) использовали для промывки первого реакционного сосуда и переносили через встроенный фильтр во второй реакционный сосуд. Продукт, бензил (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-((4-метоксибензил)окси)изоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентаноат (20) (4,05 кг; 5663 ммоль), во втором реакционном сосуде смешивали по меньшей мере в течение 10 минут и сливали в стерильные Nalgene контейнеры и хранили при 0-10°C до следующей переработки.

Стадия 2:

Pd/C, 10% масс/масс (0,42 кг), загружали в первый реакционный сосуд вместе с бензил (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-((4-метоксибензил)окси)изоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентаноатом (20) (4,05 кг; 5663 ммоль). Затем в первый реакционный сосуд добавляли денатурированный этанол (27,5 кг) и компоненты смешивали при 20-30°C по меньшей мере в течение 5 минут. Скруббер, содержащий NaOH, использовали для очистки HCl газа, выделяемого на этой стадии. 6М HCl (3,1 кг) добавляли к реакционной смеси, поддерживая при этом температуру < 30°C, и смешивали по меньшей мере в течение 5 минут. Смесь дегазировали, прилагая вакуум и одновременно подавая азот. Температуру смеси затем доводили до 20-30°C и реакционный сосуд вакуумировали. H₂ (5,0 сверхвысокой чистоты) барботировали через смесь до завершения реакции. Подачу водорода прекращали, смесь продували азотом и переносили через встроенный фильтр во второй реакционный сосуд. Денатурированный этанол (6,5 кг) загружали в первый реакционный сосуд в качестве промывки и переносили через встроенный фильтр во второй реакционный сосуд. Смесь во втором реакционном сосуде затем подвергали дистилляции с использованием вакуума до около 41 л, поддерживая при этом температуру ниже 30°C. Температуру доводили до 20-30°C и к смеси во втором реакционном сосуде добавляли 30% масс./масс. раствор H₂O₂ (0,36 кг), поддерживая при этом температуру < 25°C. Смесь перемешивали по меньшей мере в течение 16 часов при 20-30°C до завершения реакции. Смесь во втором реакционном сосуде подвергали дистилляции с использованием вакуума до около 12 л, поддерживая при этом температуру ниже 30°C. Затем к этой смеси добавляли ACN (40,1 кг) и смесь подвергали дистилляции с использованием вакуума до около 12 л, поддерживая при этом температуру ниже 30°C (эту стадию повторяли). Затем к смеси во втором реакционном сосуде снова добавляли ACN (3,2 кг) и нагревали до 40-50°C по меньшей мере в течение 1 часа. Смесь охлаждали до 15-25°C в течение по меньшей мере 1,5 часа и поддерживали при этой температуре по меньшей мере еще в течение 2 часов, затем фильтровали в центрифуге. Затем в первый реакционный сосуд добавляли ACN (13,0 кг) и использовали для промывки центрифугированных твердых веществ. Центрифугированные твердые вещества затем сушили в вакууме при 20-30°C по меньшей мере в течение 16 часов с получением (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты (4,218 ммоль; 2,13 кг; выход 74,5%; чистота 97,5%).

ПРИМЕР 4:

Получение кристаллической (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты (Соединение I')



Стадия 3:

Соединение I (2,0 кг; 3961 ммоль), EtOAc (36,0 кг) и USP воду (20 кг) добавляли в реакционный сосуд А и полученную смесь перемешивали по меньшей мере в течение 30 минут при $20 \pm 10^\circ\text{C}$. Смесь затем осаждали по меньшей мере еще в течение 30 минут. Нижний водный слой отделяли и хранили в контейнерах, тогда как оставшуюся неводную фазу переносили через встроенный фильтр в реакционный сосуд В. В реакционный сосуд А добавляли EtOAc (3,6 кг) для промывки и переносили через встроенный фильтр в смесь в реакционном сосуде В. Смесь в реакционном сосуде В затем подвергали вакуум-дистилляции для уменьшения объема (6 л). В реакционный сосуд А добавляли дополнительное количество EtOAc (25,2 кг) и переносили через встроенный фильтр в смесь в реакционном сосуде В. Смесь в реакционном сосуде В затем нагревали до температуры $75 \pm 5^\circ\text{C}$ и взбалтывали по меньшей мере в течение 5 минут до растворения твердых веществ. Эту смесь затем охлаждали до $-10 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение по меньшей мере 6 часов и дополнительно взбалтывали по меньшей мере в течение 12 часов при $-10 \pm 5^\circ\text{C}$ перед фильтрованием на фильтре С. Дополнительное количество EtOAc (5,4 кг) загружали в реакционный сосуд А, затем переносили через встроенный фильтр в реакционный сосуд В и охлаждали до $-10 \pm 10^\circ\text{C}$. Этот растворитель затем использовали для промывки фильтрата на фильтре С. Фильтрат и промывки затем собирали в контейнеры. Фильтрат или мокрую фильтровальную лепешку сушили в вакууме при $40^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ по меньшей мере в течение 16 часов и затем брали пробы для определения чистоты. Соединение I' имело чистоту $\geq 98,0\%$, как показал анализ ВЭЖХ, и EtOAc присутствовал при $\leq 2,5\%$ масс/масс, как показала газовая хроматография. Выход Соединения I' после кристаллизации составил (1,05 кг; 2079 ммоль; выход 52,5%; чистота 98,5%).

ПРИМЕР 5:

Альтернативное получение кристаллической (2S,4R)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамида)-2-метилпентановой кислоты (Соединение I')

Соединение I (4,9 кг; 9705 ммоль), SiliaMetS[®] Thiol (1,62 кг) и EtOH (100 градусов, 54,9 кг) добавляли в реакционный сосуд А и полученную смесь перемешивали по меньшей мере в течение 1 часа при температуре около 25°C - 35°C . Смесь затем фильтровали через целит и промывали при помощи EtOH (100 градусов, 7,8 кг) и переносили в реакционный сосуд В с использованием встроенного 0,22 мкм фильтра и промывали при помощи EtOH (100 градусов, 7,8 кг). Смесь в сосуде В затем подвергали вакуум-дистилляции до около 10% исходного объема при температуре около 40°C - 60°C . Сосуд, содержащий оставшуюся смесь, доводили до $> 50^\circ\text{C}$ перед добавлением отфильтрованной (0,22 мкм) USP очищенной воды (49 кг). Смесь затем нагревали до

температуры около 75°C-85°C при перемешивании до полного растворения продукта. Смесь охлаждали до температуры между около -5°C и 5°C в течение по меньшей мере 4 часов и перемешивали по меньшей мере еще в течение 16 часов при этой же температуре. Полученную смесь затем фильтровали и промывали предварительно охлажденной смесью EtOH (100 градусов, 9,8 кг) и USP воды (12,3 кг). Температуру предварительно охлажденной смеси растворителей доводили до около 0°C-10°C. Оставшийся фильтрат сушили в вакууме при температуре около 40°C-60°C по меньшей мере в течение 16 часов и затем брали пробы для определения растворителя и чистоты при помощи ВЭЖХ. Выход Соединения I' после кристаллизации составил 90% (4,6 кг; 9110 ммоль; чистота $\geq 97,0\%$).

ПРИМЕР 6:

Испытание стабильности кристаллической (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты (I')

Одна сложная задача при разработке лекарственных средств состоит в том, чтобы найти стабильную кристаллическую форму лекарственного средства с достаточно высокой температурой плавления. Одной проблемой настоящего изобретения было то, что трудно было получить небольшие кристаллы свободной кислоты соединения I с выгодными физическими свойствами, указанными выше. После того, как это было достигнуто, небольшие кристаллы плавилась около 216°C, и испытание ускоренной стабильности соединения I осуществляли при температурах и % относительной влажности (RH), указанных ниже.

Время (месяцы)	25°C, 60% RH			40°C, 75% RH ^a		
	Анализ ^b	Общее количество примесей/деградан- тов (% площади)	Содержание воды (% масс/масс)	Анализ ^b	Общее количество примесей/деградан- тов (% площади)	Содержание воды (% масс/масс)
0	98,6	0,87	< LOQ (LOQ= 0,2%)	98,6	0,87	< LOQ (LOQ= 0,2%)
1	nt ^b	nt	nt	98,5	0,86	nt
3	98,5	0,86	nt	98,6	0,87	< LOQ (LOQ= 0,22%)
6	99,2	0,87	< LOQ (LOQ= 0,19%)	99,0	0,87	< LOQ (LOQ= 0,19%)
9	99,0	0,87	nt	nt	nt	nt
12	99,2	0,87	< LOQ (LOQ= 0,19%)	nt	nt	nt
18	99,1	0,87	nt	nt	nt	nt

RH=относительная влажность; nt=не испытывали; LOQ=предел количественного определения

^aУскоренные условия хранения, измеренные для 6-месячного срока и общепринятые как эквивалентные 2-годичному сроку при 25°C, 60% относительной влажности.

^bАнализ=(масса вещества/общая масса)*100=% (масс/масс).

Эти данные демонстрируют, что Соединение I' остается стабильным по меньшей мере в течение 18 месяцев при 25°C, 60% RH, и по меньшей мере в течение 2 лет, как измерено в ускоренных условиях 40°C, 75% RH. Эти данные также показывают, что никакого определяемого количества воды не было найдено через 12 месяцев, таким образом, показывая, что кристаллы остаются негигроскопичными в течение этого периода времени. Кроме того, эти данные показывают, что общее количество примесей/деградантов составляет не более чем 1% через 18 месяцев (25°C, 60% RH) или 2 года

(ускоренные условия 40°C, 75% RH).

АНАЛИЗЫ

Анализ 1: Фармакокинетическое(РК) испытание на крысах, собаках и обезьянах при внутривенном и пероральном введении

5 Для каждой крысы, собаки или обезьяны РК испытание начинали с формулирования испытываемого соединения. Подходящую массу каждого испытываемого соединения добавляли в объем носителя (например, 5% раствор бикарбоната натрия, 5% раствор декстрозы в H₂O) так, чтобы конечная концентрация каждого соединения была

10 подходящей для дозирования. Хотя гомогенная суспензия была приемлемой для перорального введения, растворы для внутривенного введения стерильно фильтровали (0,2 мкм) перед введением, чтобы убедиться, что никакие мелкие частицы не вводятся.

В испытании на крысах: предварительно канюлированных самцов Sprague-Dawley крыс (по 3 на путь введения) получали от Harlan Laboratories или Charles Rivers Laboratories. Крысы получали либо пероральную дозу, доставляемую в желудок, с

15 использованием шприца и желудочного зонда, либо внутривенную (через латеральную хвостовую вену) дозу вводимого раствора. Конечная доза составляла 0,5 мг/кг. Серийные образцы крови собирали через канюлю, имплантированную в яремную вену, через 3 минуты, 15 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часов, 4 часов, 6 часов и 24 часа после

20 введения дозы. Взятие образцов осуществляли либо вручную, либо с использованием автоматического устройства для взятия крови. Образцы собирали в microtainer пробирки, содержащие EDTA в качестве антикоагулянта, и обрабатывали для получения плазмы при помощи рефрижераторной центрифуги.

В испытании на собаках: самцы «не-наивных» собак бигль (по 3 на путь введения), размещенных в Agilux Laboratories (Worcester, MA) и весивших 9-14 кг, получали либо

25 пероральную, либо внутривенную дозу. Пероральные дозы доставлялись в желудок с использованием шприца и желудочного зонда, с последующим промыванием водой приблизительно 10 мл. Пероральные дозы вводили при объеме 2 мл/кг. Внутривенные дозы вводили через чрескожный катетер, помещенный в подкожную вену, с последующим промыванием физиологическим раствором приблизительно 3 мл.

30 Внутривенные дозы вводили в объеме 0,5 мл/кг. Конечная доза для в/в или п/о составляла 0,1 мг/кг. Серийные образцы крови собирали через прямую венопункцию через 3 минуты, 15 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 8 часов, 12 часов и 24 часа после введения дозы. Все образцы собирали вручную в microtainer пробирки, содержащие EDTA в качестве антикоагулянта, и обрабатывали для получения плазмы

35 при помощи рефрижераторной центрифуги.

РК испытание на обезьянах осуществляли с использованием подходящей массы Соединения I в объеме носителя (например, 5% раствора бикарбоната натрия, 5% раствора декстрозы в H₂O, pH 7,4, для перорального и в/в введения, и фильтровали

40 через 0,22 м PDVF шприц для в/в) таким, чтобы вводить конечную концентрацию при 1,0 мг/мл и для в/в и для п/о.

Самцы обезьян cynomolgus (по 3 на путь введения), размещенные в Xenometrics (Stilwell, KS), получали в/в или п/о дозу Соединения I при 1 или 2 мг/кг. Внутривенные дозы Соединения I вводили через постоянный катетер в головную вену с последующим

45 промыванием физиологическим раствором приблизительно 3 мл. Внутривенные дозы вводили в объеме 1 мл/кг. Пероральные дозы доставлялись в желудок с использованием шприца и желудочного зонда с последующим промыванием водой приблизительно 10 мл. Пероральные дозы вводили в объеме 2 мл/кг. Образцы крови собирали у каждого животного в каждой точке времени (перед введением дозы, через 0,083 часа, 0,25 часа,

0,5 часа, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 8 часов, 12 часов и 24 часа) через головную, бедренную или подкожную вену на протяжении 48 часов. Все образцы собирали в K₂EDTA пробирки и помещали на лед. Образцы обрабатывали для получения плазмы путем центрифугирования (3200 об/мин, 10 минут, 5°C) и подкисляли с использованием конечной концентрации 2% уксусной кислоты. Аликвоты плазмы переносили в пробирки 96-луночного планшета и хранили замороженными (-70°C) до биоанализа.

Концентрации в плазме Соединения I определяли при помощи LC/MS/MS.

Исследуемые образцы плазмы перемешивали вихревым способом и помещали в 96-луночный планшет. Образцы экстрагировали с использованием 200 мкл ацетонитрила с внутренним стандартом. Экстракт центрифугировали в течение 10 минут при 2809 об/мин и 50 мл супернатанта смешивали с 200 мл 0,2% муравьиной кислоты в воде. Образцы (10-15 мкл) вводили в колонку ThermoFisher HyPURITY™ (C18 50×2,1мм) со скоростью потока 0,35 мл/мин. Подвижная фаза А состояла из воды:ацетонитрила: муравьиной кислоты (95:5:0,1, об:об:об), а подвижная фаза В состояла из метанола:ацетонитрила:муравьиной кислоты (50:50:0,1, об:об:об) (собака). Подвижная фаза А состояла из 0,2% муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В состояла из 0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле (крыса и обезьяна). Фармакокинетические параметры Соединения I определяли при помощи не-компарментного анализа (Model 201 и Model 200 для в/в и п/о введения, соответственно) с использованием Phoenix WinNonlin Version 6.3 (Certara, Sunnyvale, CA) и с использованием индивидуальных профилей зависимости концентрации в плазме от времени 3 животных на группу лечения.

Плазменный клиренс определяли на основании данных группы внутривенного введения, и он представляет собой скорость, при которой плазма очищается от лекарственного средства. Он равен дозе, деленной на площадь под кривой концентрация в плазме-время. Помимо плазменного клиренса, также существенно важно для перорально вводимого лекарственного средства, чтобы достигались эффективные системные уровни после пероральной доставки. Пероральная биодоступность представляет собой измеренное содержание вещества в плазме после перорального введения по сравнению с содержанием после внутривенного введения.

Фармакокинетические данные

Испытание	Путь	AUC _{last} ^a (мкг*час/мл) Среднее значение	CL _{last} ^b (л/час/кг) Среднее значение	Пероральная биодоступность (%) ^c Среднее значение
Крыса (0,5 мг/кг)	в/в	0,39	1,22	-
	п/о	0,13	3,01	33% ± 10,3%
Собака (0,1 мг/кг)	в/в	0,21	-	-
	п/о	0,0349	2,83	16,5% ± 4,2%
Обезьяна (IV: 1 мг/кг PO: 2 мг/кг)	в/в	2,29	0,38	-
	п/о	1,91	1,31	41,8% ± 22,7%

^a AUC_{last} означает площадь под кривой концентрация в плазме против времени от точки времени 0 до точки времени после введения, в которой наблюдали последнюю определяемую концентрацию, определенную линейным методом трапеций

^b CL_{last} означает дозу, деленную на AUC_{last}

^c пероральную биодоступность рассчитывали как значение AUC_{last} после перорального введения, деленное на AUC_{last} после внутривенного введения, нормализованное для какой-либо разницы во водимых дозах, выраженное в процентах

Эти данные для крыс показывают, что Соединение I имеет пероральную биодоступность приблизительно 33% при дозе 0,5 мг/кг. При более высоких дозах (30-1000 мг/кг) средняя биодоступность варьировалась в пределах 49-79% у крыс (данные не показаны). Соединение I также вводили с азилсартаном крысам (данные не показаны).

5 Эти данные для собак показывают, что Соединение I имеет ограниченную пероральную биодоступность приблизительно 17%. При более высоких дозах (100-300 мг/кг) средняя биодоступность варьировалась в пределах 7-13% (данные не показаны). Данные для обезьян показывают, что Соединение I имеет пероральную биодоступность приблизительно 42%. При более высоких дозах (30 и 100 мг/кг) средняя биодоступность
10 для трех разных композиций варьировалась в пределах 55-83% (данные не показаны).

Анализ 2: Почечная экскреция Соединения I у крыс, собак и обезьян

Важным фактором для обеспечения подходящего длительного введения лекарственного средства и нужных стационарных концентраций лекарственного средства у пациентов является клиренс лекарственного средства. Как правило, пониженный
15 клиренс лекарственного средства приводит к более высоким концентрациям лекарственного средства и более высоким эффектам лекарственного средства. Для понимания почечного клиренса Соединения I, процент введенной дозы, выделенный в моче после одной в/в дозы, определяли у трех видов животных. Осуществляли три отдельных испытания на самцах крыс Sprague Dawley, самцах собак бигль и самцах
20 обезьян cynomolgus, соответственно, и процедура и результаты экспериментов описаны ниже.

Самцы крыс Sprague Dawley (N=6, две группы по 3) с массой тела 297-316 г и 294-311 г получали в/в дозу Соединения I при 0,5 мг/кг (Группа I) и 3,0 мг/кг (Группа II) в виде части дозирующей кассеты. Соединение I растворяли в 5% NaHCO₃ в D5W (5% раствор
25 декстрозы в воде, pH 7,8) при концентрации 0,25 мг/мл с получением конечной общей концентрации 1,0 мг/мл для доставки 0,5 мг/кг внутривенной дозы. Кроме того, Соединение I растворяли в 5% NaHCO₃ в D5W (5% раствор декстрозы в воде, pH 7,4) при концентрации 1,5 мг/мл для доставки 3 мг/кг внутривенной дозы. Обе композиции
30 стерильно фильтровали перед внутривенным введением. Крысы имели доступ к пище в соответствии с их типичным режимом питания до и после введения Соединения I. Для когорты, принимающей 0,5 мг/кг Соединения I, мочу собирали на сухом льду. После 24-часового периода сбора мочи образцы мочи оттаивали, объем регистрировали и образцы смешивали перед взятием аликвоты (~700 мл) для биоанализа. Для когорты,
35 принимающей 3,0 мг/кг Соединения I, мочу собирали как указано выше, но добавляли ледяную уксусную кислоту к собираемым аликвотам мочи с получением конечной концентрации 2% уксусной кислоты. Все образцы хранили замороженными (-70°C) до биоанализа.

Концентрации Соединения I в моче крыс определяли при помощи LC/MS/MS. Образцы мочи оттаивали и разбавляли 5-кратно в K₂EDTA плазме крыс. 50 мкл аликвоту
40 разбавленной мочи переносили в 96-луночный планшет и экстрагировали при помощи 200 мкл ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт. 96-луночный планшет центрифугировали в течение 10 минут при 2809 об/мин и супернатант разбавляли пятикратно 0,2% раствором муравьиной кислоты в воде и переносили в новый 96-
45 луночный планшет. Супернатант разбавляли 0,2% раствором муравьиной кислоты в воде. Образцы (10-15 мкл) вводили в колонку Thermo Hypurity (C18 50x2,1 мм) со скоростью потока 0,30 или 0,35 мл/мин. Подвижная фаза А состояла из 0,2% раствора муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В состояла из 0,2% раствора муравьиной

кислоты в ацетонитриле. Было определено, что концентрация Соединения I составляет 0,0125-25 мкг/мл (0,5 мг/кг когорта) и 0,0058-25 мкг/мл (3,0 мг/кг когорта).

5 Самцы «не-наивных» собак бигль (N=6, две группы по 3), с массой тела 9,00-11,1 кг и 10,6-13,4 кг, получали в/в дозу Соединения I при 0,1 мг/кг (Группа I) и 1,0 мг/кг (Группа II) в виде части дозирующей кассеты. Соединение I растворяли в ПЭГ-200:этанол:воде (40:10:50) либо при концентрации 0,2 мг/мл для введения при 0,1 мг/кг, либо при концентрации 2 мг/мл для внутривенного введения при 1 мг/кг, и стерильно фильтровали перед введением. Собаки имели доступ к пище в их типичном режиме питания до и после введения Соединения I. Образцы мочи собирали на мокром льду или холодными помещали в предварительно взвешенные контейнеры, которые заранее были заполнены ледяной уксусной кислотой. Образцы взвешивали снова и добавляли дополнительное количество ледяной уксусной кислоты, при необходимости, до конечной концентрации 2%. Образцы замораживали и хранили (-80°C) до биоанализа.

Концентрации Соединения I в моче собак определяли при помощи LC/MS/MS. Исследуемые образцы мочи (разбавляли в K₂EDTA плазме собак бигль, Biochemed, Winchester, VA) оттаивали и перемешивали вихревым способом и либо 10, либо 20 мкл помещали в 96-луночный планшет. Образцы экстрагировали с использованием 6-кратно большего объема ацетонитрила (60 или 120 мкл) с внутренним стандартом хризинном или глибуридом. Экстракт центрифугировали в течение 5 минут при 3000 об/мин и ~70% супернатанта (50 или 100 мкл) переносили в новый 96-луночный планшет и объединяли с равным объемом воды. Образцы вводили в колонку либо Mac Mod Ace C18 (2,1×50 мм, 3 мкм), либо Waters Acquity UPLC BEH C18 (50×2,1 мм, 1,7 мкм) со скоростью потока либо 0,8, либо 0,9 мл/мин. Подвижная фаза А состояла из 95:5:0,1 (об:об:об) воды: ацетонитрила:муравьиной кислоты, а подвижная фаза В состояла из 50:50:0,1 (об:об: об) метанола:ацетонитрила:муравьиной кислоты. Было определено, что концентрация Соединения I в моче составляет 0,0002-1,00 мкг/мл.

Самцы «не-наивных» обезьян *cynomolgus* (N=3), с массой тела 2,87-3,61 кг, получали в/в дозу Соединения I при 1 мг/кг. Соединение I растворяли в 5% NaHCO₃ в D5W (pH 7,4) и фильтровали через 0,22 мкм поливинилиденфторидный (PVDF) шприцевой фильтр (Millipore Millex-GV, SLGV033RB) перед введением. Композиции получали за день перед введением и хранили при -70°C в течение ночи и оттаивали перед введением. Внутривенные дозы Соединения I вводили через постоянный катетер в головную вену с последующим промыванием физиологическим раствором приблизительно 3 мл. Внутривенные дозы вводили при объеме 1 мл/кг. Образцы мочи собирали на мокром льду или холодными помещали в пробирки, содержащие ледяную уксусную кислоту, для стабилизации каких-либо потенциальных глюкуронидных конъюгатов. Общий объем собранной мочи оценивали гравиметрически и аликвоты получали и замораживали (-70°C) до биоанализа.

Концентрации Соединения I в моче обезьян определяли при помощи LC/MS/MS. Образцы мочи оттаивали и разбавляли 5-кратно в K₂EDTA плазме обезьян (Bioreclamation, Westbury, NY). Образцы перемешивали вихревым способом и 50 мл переносили в 96-луночный планшет. Образцы затем экстрагировали с использованием 200 мкл ацетонитрила с внутренним стандартом. Экстракт центрифугировали в течение 10 минут при 2809 об/мин и 50 мл супернатанта добавляли в 200 мл 0,2% раствора муравьиной кислоты в воде. Образцы (10-15 мкл) вносили в колонку ThermoFisher H₂ypurity™ (C18 50×2,1 мм) со скоростью потока 0,35 мл/мин. Подвижная фаза А состояла из 0,2% раствора муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В состояла из 0,2%

раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле. Как было определено в анализе, концентрация Соединения I была в диапазоне 0,00125-5 мкг/мл.

Среднее количество выводимой мочи в течение 24-часового периода сбора и примерный % введенной дозы, выводимый с мочой, представлены в таблице ниже.

Вид	Количество в/в введения (мг/кг)	Выведение с мочой (% введенной дозы, выводимый с мочой) Среднее значение ^a ($\pm$ SD ^b)
Крыса	0,5	< 0,03 (NA)
Крыса	3,0	< 0,02 (NA)
Собака	0,1	< 0,02 (NA)
Собака	1,0	< 0,001 (NA)
Обезьяна	1,0	0,670 (0,593)

^aСреднее от трех определений

^bСтандартное отклонение

Почечная экскреция Соединения I у крыс была меньше чем 0,02% или меньше чем 0,03% от введенной дозы, у собак была меньше чем 0,02% или меньше чем 0,001% от введенной дозы, а у обезьян приблизительно 0,670% $\pm$ 0,593% от введенной дозы. Эти данные показывают, что Соединение I имеет низкую почечную экскрецию у этих трех исследуемых видов.

Анализ 3: Фаза 1 исследования действия однократных нарастающих доз (SAD)

Фазу 1 клинического испытания действия однократных нарастающих доз (SAD) Соединения I' (Форма I), которое преобразуется или растворяется в организме с образованием растворимой формы Соединения I, осуществляли для оценки ингибирования неприлизина для лечения ряда сердечно-сосудистых и почечных заболеваний, включая, например, хроническую болезнь почек, диабетическую нефропатию, острую и хроническую сердечную недостаточность, сердечную недостаточность с уменьшенной фракцией выброса, сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса, асимптоматическую дисфункцию левого желудочка после инфаркта миокарда (пост-МІ асимптоматическую LVD), субострую сердечную недостаточность и резистентную и изолированную систолическую гипертензию. Испытывали безопасность и переносимость, фармакокинетику (подтверждение для QD/BID введения и не-почечной экскреции), фармакодинамику (испытание на связывание с мишенью биомаркеров cGMP и ANP), эффект питания и абсолютную пероральную биодоступность и выведение почками с использованием внутривенной микродозы радиоактивного ¹⁴C, *inter alia*.

Фаза 1 испытания представляла собой двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование действия однократных нарастающих доз у здоровых добровольцев мужчин и женщин, рандомизированных в 4:1 соотношении. В испытании участвовали 56 здоровых добровольцев в течение нескольких недель, в течение которых наращивали дозу, которые включали когорты (n=10/когорта из 8 - активное средство и 2 - плацебо), которым вводили однократные нарастающие дозы 50 мг, 100 мг, 200 мг, 400 мг и 600 мг. Шестой когорте (n=6) вводили в/в микродозу меченого вещества и пероральные дозы 10 мг и 100 мг, соответственно. Данные SAD клинического испытания показали, в том числе, что Соединение I было хорошо переносимым после разовых доз до 600 мг.

Анализ 3.1: Активность в отношении NEP у человека (cGMP)

Одной целью этого испытания было определение механизма/продолжительности действия Соединения I после введения человеку. Для этого уровни cGMP, биомаркера

связывания с мишенью-неприлизином, измеряли после введения Соединения I' для получения доказательства биологического эффекта Соединения I. Например, повышение уровней сGMP в плазме через 24 часа после введения указывает на продолжительность фармакологического эффекта, аналогично значениям плазменного клиренса для демонстрации фармакокинетической устойчивости.

Фиг. 6 иллюстрирует изменение средней концентрации сGMP в плазме (нМ) от исходного уровня при испытываемых дозах против времени. Эти данные показывают, что Соединение I обеспечивает устойчивое повышение средней концентрации сGMP в плазме в течение 24 часов после однократной дозы, при максимальных уровнях сGMP, наблюдаемых в интервале 8-24 часов, при этом окно 8-12 часов показывает наивысшие уровни сGMP. Кроме того, кривая доза-ответ, показывающая уровни сGMP в плазме, демонстрирует близкий к максимальному эффект при нижнем пределе диапазона доз, т.е. при уровнях доз ≥ 100 мг (см. Фиг. 7).

Анализ 3.2 РК Профиль, пероральная биодоступность и почечная экскреция Соединения I' у человека

Фармакокинетический профиль Соединения I был доза-пропорциональным (см. Фиг. 8), и было показано, что Соединение I обладает высокой пероральной биодоступностью (около 80%). Данные SAD клинического испытания также предполагают низкие уровни выведения почками, т.е. меньше чем 1% от общей введенной дозы Соединения I' выводилось через почки, как было подтверждено в испытании с использованием внутривенных микродоз меченого вещества.

Интересно, что РК профиль (например, $C_{\max}$ Соединения I) и PD профиль (например, сGMP_{max}) показали максимальные значения в разных временных окнах. Данные SAD клинических испытаний говорят о том, что дозозависимые повышения уровней сGMP в плазме и устойчивые повышения уровней сGMP в течение 24 часов как в плазме, так и в моче, подтверждают применение Соединения I или Соединения I' для введения раз в день.

Анализ 3.3: Отличие от стандартного лечения

В настоящее время сакубитрил, используемый в комбинации с валсартаном, показан для уменьшения риска смерти от сердечно-сосудистых заболеваний и госпитализации из-за сердечной недостаточности у пациентов с хронической сердечной недостаточностью и уменьшенной фракцией выброса. Сравнение сакубитрила (ингибитор неприлизина) и Соединения I демонстрирует ключевое отличие в выведении почками и 24-часовом связывании с мишенью. Например, сакубитрил большей частью выводится через почки (60% выведения почками), тогда как Соединение I нет (< 1% выведения почками) (см. Фиг. 9). Это может иметь важное значение для лечения пациентов с нарушением функции почек с или без сердечного заболевания. Кроме того, уровни сGMP (т.е. связывание с мишенью) не повышены через 24 часа после введения сакубитрила, тогда как после введения Соединения I' уровни сGMP повышены. Это обеспечивает возможность потенциального введения раз в день Соединения I или Соединения I', что нельзя сказать о сакубитриле в комбинации с валсартаном, которые вводят в режиме два раза в день.

Анализ 4: Фаза 1 испытания многократных нарастающих доз

Фазу 1 клинического испытания многократных нарастающих доз (MAD) Соединения I' (Форма I) осуществляли для дальнейшей оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики Соединения I и его метаболита, фармакодинамики Соединения I, эффекта питания, абсолютной пероральной биодоступности и выведения почками многократных нарастающих пероральных доз Соединения I' у здоровых взрослых и

пожилых субъектов. Как обсуждается ниже, представленные данные подтверждают результаты, полученные в SAD клиническом испытании.

Фаза 1 испытания представляла собой двойное слепое, рандомизированное плацебо-контролируемое исследование действия многократных нарастающих доз (MAD) у 5 здоровых добровольцев мужчин и женщин, рандомизированных в 4:1 соотношении. В испытании участвовали 50 здоровых добровольцев (возраст 19-55 лет) и пожилых (возраст 65-80 лет) в течение нескольких недель, в течение которых наращивали дозу, которые включали когорты (n=10/когорты из 8 - активное средство и 2 - плацебо), которым вводили (1) нарастающие дозы 50 мг, 100 мг и 200 мг, (2) дозу 10 мг исследовали 10 параллельно с 200 мг для PK/PK, и (3) дозу 100 мг для одной когорты пожилых субъектов. Данные MAD клинического испытания показали, в том числе, что Соединение I было хорошо переносимым после многократных пероральных доз до 14 дней. Кроме того, выведения почками Соединения I было незначительным после введения многократных доз, например, < 1% наблюдали в день 1 и день 14 для всех субъектов.

Анализ 4.1: Активность в отношении NEP у человека (сGMP) и отличие от стандартного лечения

Часть MAD клинических испытаний была направлена на определение механизма/продолжительности действия Соединения I после введения человеку. Для этого измеряли уровни сGMP, биомаркера связывания с мишенью-неприлизин, после введения 20 Соединения I для получения доказательства биологического эффекта Соединения I. Например, повышение уровней сGMP в плазме через 24 часа после введения указывает на устойчивый продолжительный фармакологический эффект, аналогично значениям плазменного клиренса для демонстрации фармакокинетической устойчивости.

Фиг. 10 иллюстрирует изменение средней концентрации сGMP в плазме (нМ) от 25 исходного уровня при испытываемых дозах против времени. Эти данные показывают, что Соединение I обеспечивает устойчивое повышение средней концентрации сGMP в плазме в течение 24 часов. Важный результат показан на Фиг. 10. Эти данные иллюстрирует, что в день 14 клинического испытания наблюдали связывание с мишенью для всех доз в точке (0 часов), а также всех доз, измеренных вплоть до 24 часов, 30 Соединения I, вводимого раз в день. Это отличается от стандартного лечения, где имеет место незначительное или вообще отсутствие связывания с мишенью в низшей точке и в точке времени 24 часа при использовании режима введения два раза в день (см. стр. 411 Gu *et al.*, J. Clin. Pharmacol., 2010, Vol. 50, Issue 4, pp. 401-414).

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные аспекты или 35 варианты его осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что возможны различные изменения или эквивалентные замены без отступления от истинной сущности и объема изобретения. Кроме того, в объеме, разрешенном применимыми патентными уставами и правилами, все публикации, патенты и патентные заявки, приведенные в настоящей заявке, включены в настоящую заявку посредством 40 ссылки во всей их полноте в той же степени, как если бы каждый документ был включен отдельно посредством ссылки.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения кристаллической формы (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамида)-2-метилпентановой 45 кислоты, включающий:

(а) образование раствора, включающего (2*S*,4*R*)-5-(5'-хлор-2'-фтор-[1,1'-бифенил]-4-ил)-2-(этоксиметил)-4-(3-гидроксиизоксазол-5-карбоксамида)-2-метилпентановую

кислоту и смесь этилацетата и воды, этилацетат или этанол при повышенной температуре;

(b) охлаждение раствора до температуры между около -20°C и 5°C ; и

(c) выделение полученных твердых веществ с получением кристаллической формы.

5 2. Способ по п. 1, где температура на стадии (a) находится между около 60°C и 95°C .

3. Способ по п. 2, где температура находится между около 70°C и 85°C .

4. Способ по п. 1, где выделение твердых веществ на стадии (c) включает фильтрование, промывку одним или несколькими растворителями, сушку на воздухе или в вакууме или комбинацию этих стадий.

10 5. Способ по п. 4, где растворитель представляет собой этилацетат и воду, этилацетат или этанол.

6. Способ по п. 4, где сушку в вакууме осуществляют при температуре между 25°C и 70°C .

15 7. Способ по п. 1, где раствор со стадии (a) дополнительно содержит акцептор металлов, такой как SiliaMetS® Thiol.

20

25

30

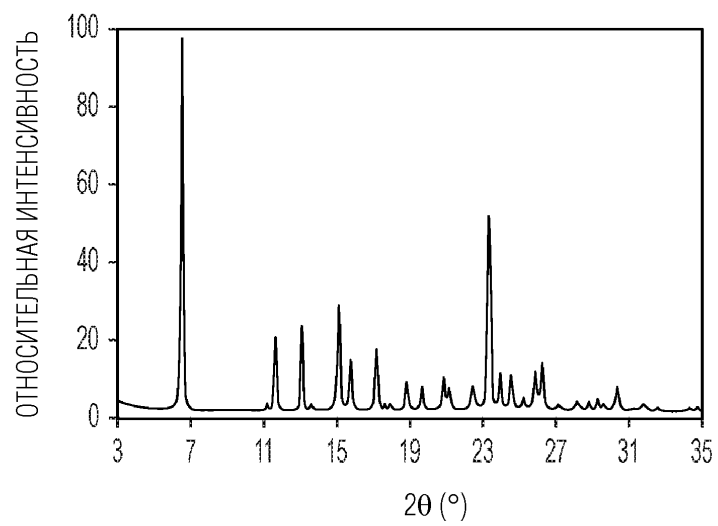
35

40

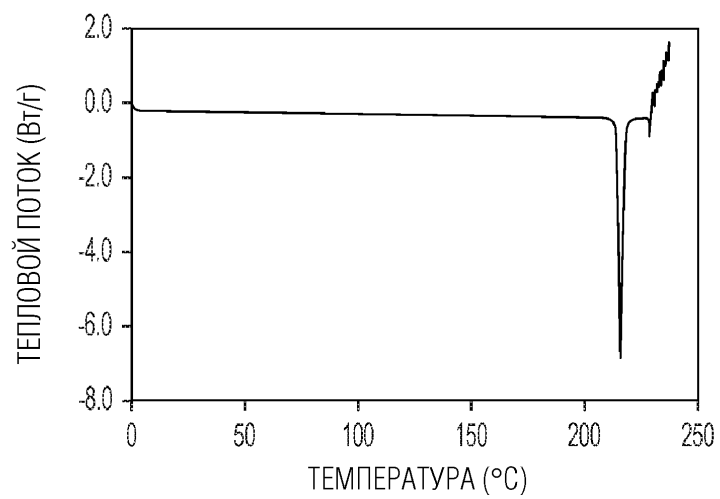
45

1

1/6



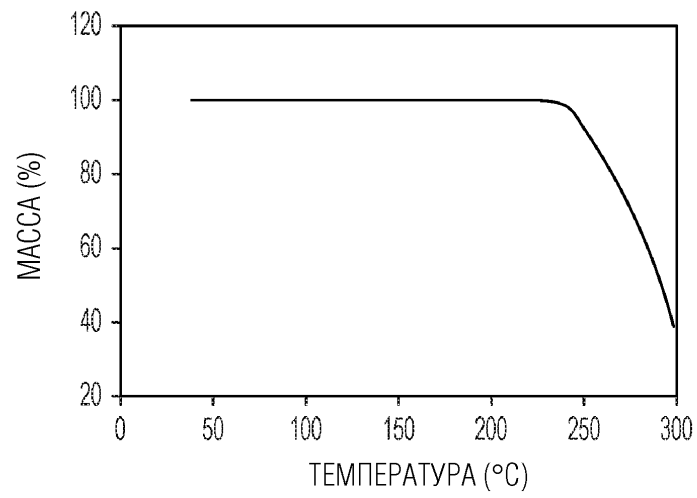
ФИГ.1



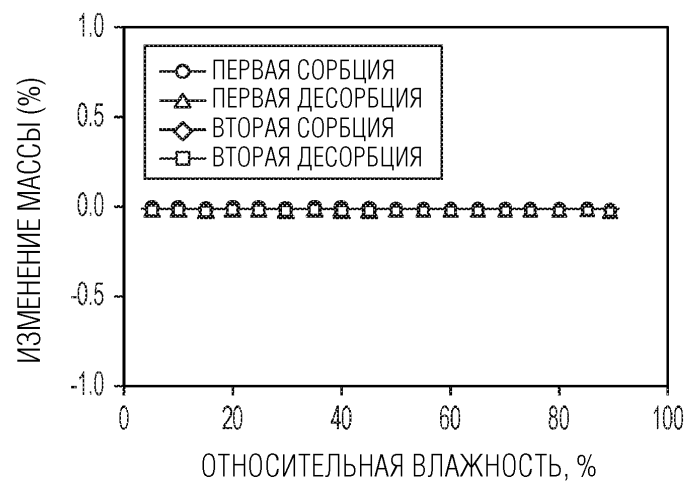
ФИГ.2

2

2/6

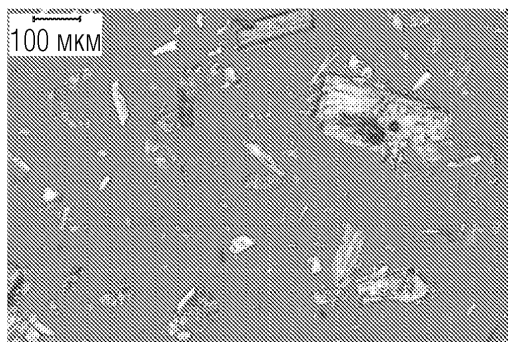


ФИГ.3

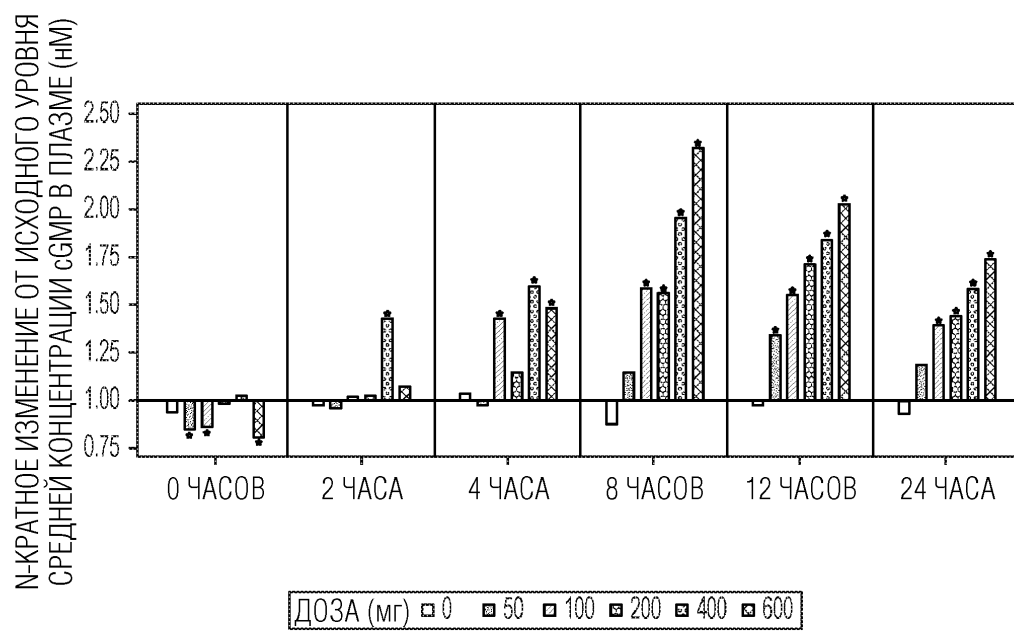


ФИГ.4

3/6

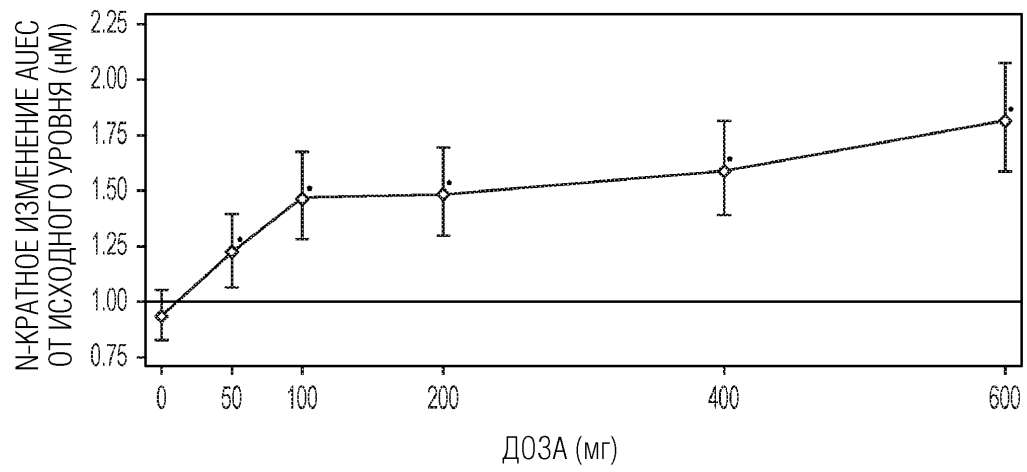


ФИГ.5



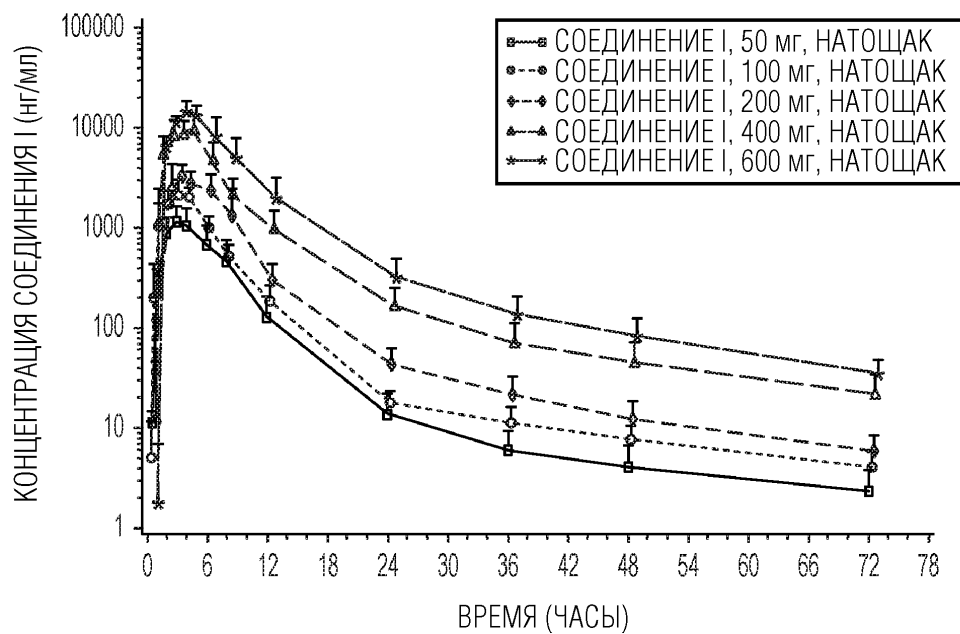
ФИГ.6

4/6

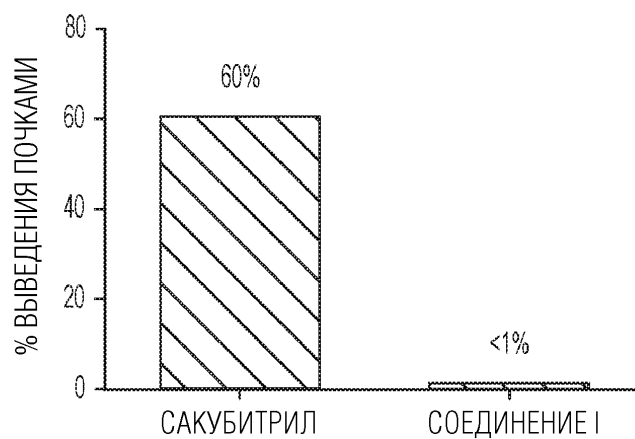


ФИГ.7

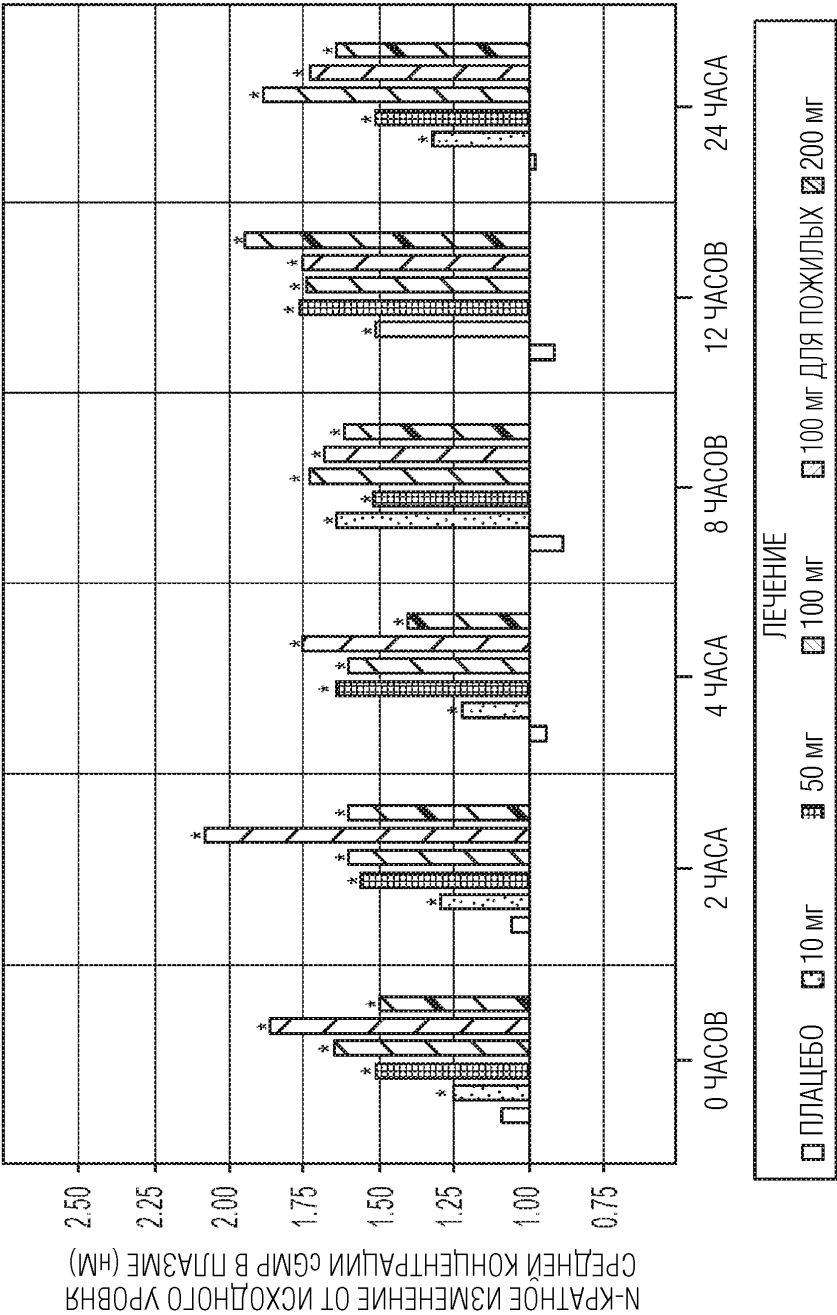
5/6



ФИГ.8



ФИГ.9



ФИГ.10