

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 979**

51 Int. Cl.:

**C07D 257/04** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61P 9/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2016 PCT/CN2016/097751**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17080290**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2016 E 16863468 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3380456**

54 Título: **Complejo de antagonista de receptor de angiotensina e inhibidor de endopeptidasa neutra**

30 Prioridad:

**09.11.2015 CN 201510758232**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**24.03.2020**

73 Titular/es:

**CHENGDU EASTON BIOPHARMACEUTICALS  
CO., LTD. (100.0%)**

**8 Xiyuan Ave. Hi-tech District  
Chengdu, Sichuan 611731, CN**

72 Inventor/es:

**WANG, YING;  
HUANG, LONG;  
XIANG, YONGZHE;  
CEN, GUODONG;  
LI, JIANGUO;  
JIA, JIANJING;  
LIU, QIANGQIANG;  
LIU, YANG;  
YANG, HAITAO y  
DONG, QING**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 749 979 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Complejo de antagonista de receptor de angiotensina e inhibidor de endopeptidasa neutra

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un complejo que comprende un bloqueante del receptor de angiotensina (ARB) y un inhibidor de la endopeptidasa neutra (NEPi), en particular un complejo de [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butylcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato] de calcio y sodio, así como sus métodos de preparación y sus aplicaciones en el tratamiento de insuficiencias cardíacas crónicas.

**Antecedentes**

15 Las manifestaciones clínicas de la insuficiencia cardíaca incluyen dificultad para respirar, fatiga, y retención de líquidos (congestión pulmonar y edema periférico). Los pacientes que padecen insuficiencia cardíaca necesitan un control diario del peso corporal para detectar la retención de líquidos, de un modo tal que se puedan poner en práctica ajustes al estilo de vida y restricciones en la ingesta de sodio y líquidos lo antes posible. La reducción de la ingesta de sodio ayuda a reducir el volumen sanguíneo, el agua y el sodio en el cuerpo, y a reducir la presión arterial, lo que alivia los síntomas de la insuficiencia cardíaca.

La insuficiencia cardíaca crónica es una disfunción cardíaca que se debe principalmente a la disfunción del bombeo causada por la disminución progresiva de la contractilidad de los miocitos ventriculares. En el curso de la insuficiencia cardíaca crónica, se daña la homeostasis del calcio miocárdico, que se manifiesta como una disminución en el aumento del calcio intracelular transitorio y su disminución más lenta. Este cambio se considera la principal causa de deterioro de la contractilidad del miocardio. Por lo tanto, el aumento de la ingesta de calcio puede aliviar la presión arterial y la retención de sodio mientras que se mantiene la contractilidad normal del miocardio. Además, el ion calcio es esencial para una diversidad de actividades fisiológicas en el cuerpo, por ejemplo, el potencial biológico en ambos lados de la membrana celular, la conductividad nerviosa normal, y la contracción y relajación musculares normales.

LCZ696 (Entresto) es un inhibidor de la neprilisina (ARNi) del receptor de angiotensina que fue desarrollado por Novartis, que recibió la aprobación de la FDA en julio de 2015. Trata a pacientes con insuficiencia cardíaca crónica que tienen fracciones de eyección reducidas y puede reducir la muerte y la hospitalización debidas a insuficiencia cardíaca. LCZ696 es un complejo que contiene formas aniónicas de sacubitrilo (AHU-377) y valsartán en una proporción 1:1, cationes de sodio y moléculas de agua. El documento de Patente China n.º CN 200680001733.0 cubre el complejo y sus formas cristalinas.

LCZ696 es altamente higroscópico. Se ha descubierto que, después de diez días en condiciones de alta humedad, LCZ696 absorbe agua y se convierte en una forma líquida. Se conoce bien que la higroscopicidad causa dificultades en la granulación, disgregación, y disolución de la forma sólida durante el proceso de formulación, lo que afecta a la estabilidad y la eficacia del medicamento. Los compuestos higroscópicos también requieren excipientes, procesos de fabricación e instalaciones de almacenamiento más caros y complejos. Por lo tanto, es deseable obtener un compuesto que tenga una baja higroscopicidad, sea más estable y, en general, más eficaz.

**Sumario de la invención**

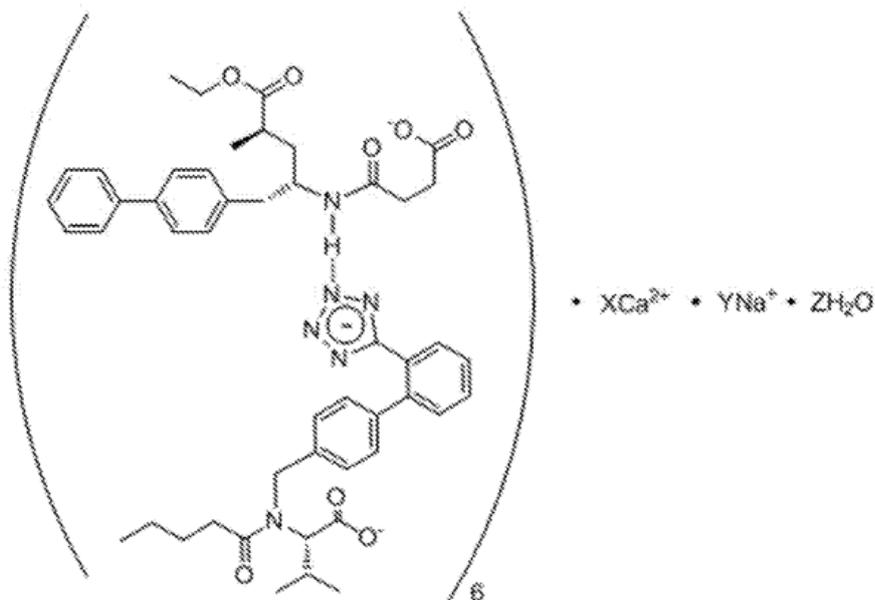
Los inventores de la solicitud llevaron a cabo una gran cantidad de experimentos en un esfuerzo por descubrir formas de sal alternativas al complejo que contiene [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butylcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato]. Por ejemplo, se investigaron sales de potasio del complejo, pero solo se obtuvo la sal de potasio de valsartán. Se investigaron complejos que contenían tanto cationes de potasio como cationes de sodio. Sin embargo, los complejos resultantes tienen un contenido de sodio similar al de LCZ696 y no se detectó ninguna cantidad de potasio, lo que indica que no contenían de forma simultánea sodio y potasio.

También se usaron bases orgánicas, tales como amonio, trietanolamina, y piperazina, etc., para conseguir un complejo cocrystalino con [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butylcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato], pero fracasaron en formar estructuras cristalinas. Además, también se investigaron sales de calcio de [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butylcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato], pero no se formó ningún complejo. No obstante, se descubrió de forma inesperada que dicha sal de calcio se puede disolver en acetona.

Después de análisis sistemático exhaustivo que implicó cationes de calcio y otros metales, se obtuvieron complejos estables que contienen [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butylcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato] así como cationes de sodio y calcio. Sus patrones de

XRPD, que tienen picos característicos, se exhibieron en algunas realizaciones, lo que indica la formación de co cristales presentada con composiciones altamente estables y controlables.

El complejo de una realización se puede expresar como  $[3-((1S,3R)-1\text{-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil})propionato-(S)-3'\text{-metil-2'-(pentanoil}\{2''\text{-}(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'\text{-ilmetil})amino}butirato)]_6 \cdot XCa^{2+} \cdot YNa^+ \cdot ZH_2O$ , en el que  $X = 1-3$ ,  $Y = 12-16$ ,  $Z = 9-18$ , y  $2X + Y = 18$ , mientras que  $X$ ,  $Y$ , y  $Z$  son preferentemente números enteros. En la presente divulgación, cuando en la fórmula del complejo en la que  $X$  y/o  $Y$  son números,  $X$  y/o  $Y$  se describen como subíndices mientras que los números de valencia para  $Ca$  y  $Na$  se omiten para mejorar la legibilidad. La estructura del complejo mencionado anteriormente se muestra a continuación.



En algunas realizaciones,  $X = 1$ ,  $Y = 16$ , y  $Z = 9-18$ . En otras realizaciones,  $X = 1$ ,  $Y = 16$ , y  $Z = 12-18$ . En otras realizaciones más,  $X = 1$ ,  $Y = 16$ , y  $Z = 12, 15$ , o  $18$ . En una realización preferente, cuando  $X = 1$  e  $Y = 16$ ,  $Z = 15$ .

Realizaciones adicionales describen complejos en los que  $X = 2$ ,  $Y = 14$ ,  $Z = 9-18$ ;  $X = 2$ ,  $Y = 14$ ,  $Z = 9-15$ ; o preferentemente cuando  $X = 2$ ,  $Y = 14$ ,  $Z = 12, 15$ , o  $9$ . En una realización preferente,  $X = 2$ ,  $Y = 14$ , y  $Z = 15$ .

Otras realizaciones adicionales describen complejos en los que  $X = 3$ ,  $Y = 12$ ,  $Z = 9-18$ ;  $X = 3$ ,  $Y = 12$ ,  $Z = 9-15$ ; preferentemente cuando  $X = 3$  e  $Y = 12$ ,  $Z = 12, 9$ , o  $15$ . En una realización preferente,  $X = 3$ ,  $Y = 12$ ,  $Z = 15$ .

Algunas realizaciones específicas también describen complejos en los que  $X = 1$ ,  $Y = 16$ ,  $Z = 9$ ;  $X = 1$ ,  $Y = 16$ ,  $Z = 12$ ;  $X = 1$ ,  $Y = 16$ ,  $Z = 15$ ;  $X = 1$ ,  $Y = 16$ ,  $Z = 18$ ; preferentemente cuando  $X = 1$  e  $Y = 16$ ,  $Z = 12, 15$  o  $18$ ; y

$X = 2$ ,  $Y = 14$ ,  $Z = 18$ ;  $X = 2$ ,  $Y = 14$ ,  $Z = 15$ ; o  $X = 2$ ,  $Y = 14$ ,  $Z = 12$ ;  $X = 2$ ,  $Y = 14$ ,  $Z = 9$ ; preferentemente cuando  $X = 2$  e  $Y = 14$ ,  $Z = 9, 12$  o  $15$ ; y

$X = 3$ ,  $Y = 12$ ,  $Z = 18$ ; o  $X = 3$ ,  $Y = 12$ ,  $Z = 15$ ; o  $X = 3$ ,  $Y = 12$ ,  $Z = 12$ ; o  $X = 3$ ,  $Y = 12$ ,  $Z = 9$ ; preferentemente cuando  $X = 3$  e  $Y = 12$ ,  $Z = 9, 12$ , o  $15$ .

Los complejos enumerados anteriormente están preferentemente en formas cristalinas.

El Complejo I es  $[3-((1S,3R)-1\text{-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil})propionato-(S)-3'\text{-metil-2'-(pentanoil}\{2''\text{-}(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'\text{-ilmetil})amino}butirato)]_6 \cdot XCa^{2+} \cdot YNa^+ \cdot ZH_2O$ , en donde  $X = 1$ ,  $Y = 16$ , y  $Z = 15$ . Preferentemente, este complejo está en una forma cristalina. Se usó difracción de rayos X de polvo (XRPD) con radiación  $Cu\ K\alpha$  para caracterizar el Complejo I. Los ángulos de difracción, los espaciados  $d$ , y las intensidades relativas de los picos en el patrón de XRPD del Complejo I se muestran en la Tabla I.

Tabla I

N.º de pico	Pos. [ $2\theta$ ]*	Espaciado $d$ [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,12	21,43	100,00

N.º de pico	Pos. [°2θ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
2	5,11	17,29	32,58
3	5,57	15,87	15,90
4	12,43	7,12	27,08
5	15,20	5,83	5,96
6	16,89	5,25	10,46
7	17,71	5,00	7,13
8	18,62	4,77	7,27
9	19,96	4,45	6,50

\*El ángulo de difracción 2θ tiene un margen de error de ± 0,2.

En realizaciones adicionales, el patrón de XRPD del Complejo I tiene los ángulos de difracción, los espaciados d, y las intensidades relativas de los picos que se muestran en la Tabla II.

5

Tabla II

N.º de pico	Pos. [°2θ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,12	21,43	100,00
2	5,11	17,29	32,58
3	5,57	15,87	15,90
4	8,72	10,14	1,29
5	10,20	8,67	2,04
6	12,43	7,12	27,08
7	13,26	6,68	2,55
8	15,20	5,83	5,96
9	16,89	5,25	10,46
10	17,71	5,00	7,13
11	18,62	4,77	7,27
12	19,96	4,45	6,50
13	22,48	3,96	4,09
14	24,89	3,58	2,88
15	26,92	3,31	2,05
16	28,97	3,08	1,57
17	33,09	2,71	0,63

\*El ángulo de difracción 2θ tiene un margen de error de ± 0,2.

10 En otras realizaciones adicionales, el Complejo I tiene un patrón de XRPD básicamente como se muestra en la Figura 1.

15 El Complejo II es [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato)]<sub>6</sub>·XCa<sup>2+</sup>·YNa<sup>+</sup>·ZH<sub>2</sub>O, en donde X = 2, Y = 14, y Z = 15. Preferentemente, este complejo está en una forma cristalina. Se usó difracción de rayos X de polvo (XRPD) con radiación Cu Kα para caracterizar el Complejo II.

Los ángulos de difracción, los espaciados d, y las intensidades relativas de los picos en el patrón de XRPD del Complejo II se muestran en la Tabla III.

Tabla III

N.º de pico	Pos. [°2θ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,05	21,81	100,00
2	5,07	17,42	30,51
3	5,54	15,94	13,11
4	9,91	8,93	1,85
5	12,31	7,19	27,24
6	15,03	5,89	4,51
7	16,85	5,26	6,57
8	17,81	4,98	4,33
9	19,85	4,47	2,94

\*El ángulo de difracción 2θ tiene un margen de error de ± 0,2.

Además, la forma cristalina del Complejo II tiene los ángulos de difracción, los espaciados d, y las intensidades relativas que se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV

N.º de pico	Pos. [°2θ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,05	21,81	100,00
2	5,07	17,42	30,51
3	5,54	15,94	13,11
4	8,60	10,29	1,30
5	9,91	8,93	1,85
6	12,31	7,19	27,24
7	13,50	6,56	1,32
8	15,03	5,89	4,51
9	16,85	5,26	6,57
10	17,81	4,98	4,33
11	19,85	4,47	2,94
12	22,88	3,89	1,54

\*El ángulo de difracción 2θ tiene un margen de error de ± 0,2.

10 En otras realizaciones adicionales, el Complejo II tiene un patrón de XRPD básicamente como se muestra en la Figura 2.

15 El Complejo III es  $[3-((1S,3R)-1\text{-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil})\text{propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil}\{2''\text{-}(tetrazol-5-ilato)\text{bifenil-4'-ilmetil}\}\text{amino})\text{butirato}]_6 \cdot XCa^{2+} \cdot YNa^+ \cdot ZH_2O$ , en la que  $X = 3$ ,  $Y = 12$ ,  $Z = 15$ . Preferentemente, este complejo está en una forma cristalina. Se usó difracción de rayos X de polvo (XRPD) con radiación Cu Kα para caracterizar el Complejo III. El patrón de XRPD del Complejo III tiene los ángulos de difracción, los espaciados d, y las intensidades relativas de los picos que se muestran en la Tabla V.

Tabla V

N.º de pico	Pos. [°2θ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,06	21,78	100,00
2	5,03	17,39	60,81
3	5,52	16,02	26,11
4	8,59	10,29	5,01

N.º de pico	Pos. [°2θ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
5	9,81	9,01	4,08
6	12,33	7,18	24,95
7	15,22	5,82	7,45
8	16,87	5,26	11,75
9	17,83	4,97	7,78

\*El ángulo de difracción 2θ tiene un margen de error de ± 0,2.

Además, la forma cristalina del Complejo III tiene los ángulos de difracción, los espaciados d, y las intensidades relativas que se muestran en la Tabla VI.

5

Tabla VI

N.º de pico	Pos. [°2θ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,06	21,78	100,00
2	5,03	17,39	60,81
3	5,52	16,02	26,11
4	8,59	10,29	5,01
5	9,81	9,01	4,08
6	12,33	7,18	24,95
7	13,48	6,57	2,97
8	15,22	5,82	7,45
9	16,87	5,26	11,75
10	17,83	4,97	7,78
11	22,81	3,90	3,26

\*El ángulo de difracción 2θ tiene un margen de error de ± 0,2.

En otras realizaciones adicionales, el Complejo III tiene un patrón de XRPD básicamente como se muestra en la Figura 3.

10

La presente divulgación también proporciona métodos de preparación de los complejos expresados como  $[[3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil\{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil\}amino)butirato]_6 \cdot XCa^{2+} \cdot YNa^+ \cdot ZH_2O$ , en los que X = 1-3, Y = 12-16, Z = 9-18, y  $2X + Y = 18$ . Tal método de preparación incluye las siguientes etapas: (1) añadir sales de calcio de AHU-377 y AHU-377 en acetona y agitar durante 30 min hasta que las sales se hayan disueltas por completo para formar una primera solución; (2) añadir valsartán o sal de sodio de valsartán a la primera solución, agitar hasta que el valsartán o la sal del valsartán se disuelvan por completo para formar una segunda solución; añadir una solución acuosa de NaOH a la segunda solución en 5 minutos, mantener la agitación a una velocidad constante, y los sólidos comienzan a precipitar en aproximadamente 20-30 minutos; (3) agitar durante más de 6 horas, filtrar la solución para obtener los sólidos, lavar el filtrado sólido tres veces con acetona, secar los sólidos a temperatura ambiente en aire.

15

20

Se seleccionan diferentes proporciones molares de  $Ca^{2+}:Na^+$  para formar los complejos de la invención con diferentes X e Y, por ejemplo, las proporciones molares de  $Ca^{2+}:Na^+$  podrían ser 1:16, 2:14, 3:12, 4:10, 5:8 o 6:6. Se ha descubierto que para las proporciones molares de  $Ca^{2+}:Na^+$  de 1:16, 2:14, y 3:12, la forma cristalina del complejo fue estable tanto en su aspecto físico como en su composición química. Los resultados fueron repetitivos. Por otra parte, cuando las proporciones molares de  $Ca^{2+}:Na^+$  fueron 4:10, 5:8, o 6:6, el complejo fue inestable. Se descubrió que cuando se preparan complejos con una proporción molar de  $Ca^{2+}:Na^+$  que excede de 3:12, se necesita introducir calcio adicional mediante la adición de una sal de calcio de valsartán o la adición de hidróxido de calcio, que no se podría disolver completamente en acetona. Los complejos resultantes son menos adecuados para la preparación de medicamentos.

25

30

La presente divulgación proporciona además un método de tratamiento de insuficiencia cardíaca crónica usando medicaciones que comprenden un complejo  $[3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil\{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil\}amino)butirato]_6 \cdot XCa^{2+} \cdot YNa^+ \cdot ZH_2O$ , en el que X = 1-3, Y = 12-16, Z = 9-18, y  $2X + Y = 18$ .

35

El complejo que se desvela en el presente documento tiene las siguientes ventajas:

1. La calidad de los complejos de muestra preparados de acuerdo con el método que se desvela en el presente documento es estable y se controla con facilidad. La muestra tiene una buena estabilidad química. Su solubilidad es similar a la muestra comparativa pero considerablemente menos higroscópica. Su proceso de preparación y almacenamiento no requiere condiciones especiales, lo que conduce a una eficacia y una estabilidad mejores.

2. En el ensayo de metabolismo de fármacos en perros Beagle, los picos de valsartán en los Ejemplos 1 y 3 eluyeron con mayor rapidez que los de la muestra comparativa, lo que indica que los Ejemplos 1 y 3 pueden llegar a tener eficacia con mayor rapidez. En los Ejemplos 1, 3, y 5, valsartán, AHU377, y LBQ657 (el metabolito de AHU377) tienen una  $C_{max}$  y AUC significativamente mayores que la muestra comparativa, lo que indica que los Ejemplos 1, 3, y 5 tienen una mayor biodisponibilidad. Por lo tanto, los Ejemplos 1, 3, y 5 se pueden absorber mejor por parte del paciente.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es el patrón de difracción de rayos X del Complejo I.  
La Figura 2 es el patrón de difracción de rayos X del Complejo II.  
La Figura 3 es el patrón de difracción de rayos X del Complejo III.

### Descripción detallada

La presente divulgación se explica con mayor detalle usando los siguientes ejemplos. Los ejemplos en el presente documento ilustran los esquemas técnicos y no limitan en modo alguno el alcance de la presente divulgación. Cualquier equivalente de los compuestos o los métodos que se desvelan en el presente documento están dentro del alcance de la presente divulgación.

Se obtuvieron los espectros de HPLC usando un cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20A. Los patrones de difracción de rayos X de polvo (XRPD) se adquirieron usando un difractómetro de polvo Dandong Haoyuan DX-2700 X. Sus parámetros se enumeran a continuación.

	Parámetros de reflexión
Parámetros de reflexión de rayos X	Cu, $K\alpha$ $K\alpha 1$ : 1,540598; $K\alpha 2$ : 1,544426 Proporción de la intensidad $K\alpha 2 / K\alpha 1$ : 0,50
Tensión	40 kV
Corriente eléctrica	30 mA
Ranura de divergencia	Automática
Modo de barrido	Continuo
Ángulo de barrido ( $2\theta$ °)	3,0 a 50,0 grados
Etapas de muestreo ( $2\theta$ °)	0,02 grados

Se adquirieron datos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un calorímetro diferencial de barrido TAQ2000, mientras que los datos de análisis termogravimétrico (TGA) se midieron usando un instrumento TAQ5000 TGA. Los parámetros de estos instrumentos se enumeran a continuación:

	DSC	TGA
Bandeja de muestra	Placa de aluminio, cubierta	Disco de platino, abierta
Temperatura	Temperatura ambiente hasta 300 °C	Temperatura ambiente hasta 350 °C
Velocidad de barrido	10 °C/min	10 °C/min
Gas protector	nitrógeno	nitrógeno

Se usó espectrometría de absorción atómica (AAS) para determinar el contenido de sodio de los complejos en la presente divulgación. Los instrumentos y los materiales que se usaron incluyen: espectrofotómetro de absorción atómica Puxi General TAS-990 (Beijing Puxi General Instrument Co., Ltd.); solución estándar de sodio: 1000  $\mu\text{g/ml}$ , GSB-04-1738-2004 (153050-2) National Non-Ferrous Metals and Electronic Materials Analysis Center. Las condiciones experimentales incluyen: se usó un atomizador de llama para atomizar la muestra; longitud de onda de 589 nm; presión de aire: 0,25 MPa; caudal de flujo: 1300 ml/min; disolvente: solución de KCl a 0,1 %, intervalo lineal en la curva estándar: 0,1  $\mu\text{g/ml}$  - 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , la concentración de la solución de ensayo: 4  $\mu\text{g/ml}$ .

El contenido de calcio en el complejo se determinó mediante valoración complejométrica con EDTA. Materiales usados: solución de valoración de EDTA (0,05 mol/l), indicador de purpurina de calcio, solución de hidróxido de sodio, microbureta de 1 ml. Métodos: pesar de forma precisa una muestra del complejo (que contiene aproximadamente 1,6 mg de calcio), añadir 50 ml de agua, a continuación añadir 50 ml de solución de hidróxido de sodio para disolver bajo tratamiento de ultrasonidos, añadir 0,1 g de purpurina de calcio con solución de valoración de EDTA (0,05 mol/l) para valorar el cambio de color de la solución de color púrpura a color azul puro. Se llevaron a cabo experimentos de blanco para la calibración. Un mililitro de la solución de valoración es el equivalente de 2 mg de calcio. En la presente divulgación, "temperatura ambiente" significa una temperatura entre 10-25 °C.

## 10 Ejemplo 1

Preparación de [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato]<sub>6</sub>CaNa<sub>16</sub>·15H<sub>2</sub>O

15 Se añadieron AHU-377 (2,4 g, 5,83 mmol) y sales de calcio de AHU-377 (1,26 g, 2,92 mmol) a 25 ml de acetona y se agitaron durante 30 min para obtener una solución transparente. Se añadió valsartán (3,81 g, 8,75 mmol) a la solución transparente y se agitó hasta que el valsartán se disolvió por completo.

20 Se preparó una solución de NaOH usando NaOH (933 mg, 23,33 mmol) en agua (2,7 ml). La solución de NaOH se añadió gota a gota a la solución obtenida anteriormente en menos de 5 minutos con agitación constante. Comenzaron a precipitar sólidos en aproximadamente 20-30 minutos. La solución se agitó de forma continua durante más de 6 horas y a continuación los sólidos se separaron a través de filtración. Los sólidos se lavaron tres veces usando acetona y a continuación se secaron en aire a temperatura ambiente. Se obtuvieron 7,4 g del complejo, lo que representa un rendimiento de un 87,5 %.

25 Usando HPLC con estándares externos, se calculó que la composición del complejo incluía un 45,35 % de valsartán y un 42,86 % de AHU-377. El contenido de sodio fue de un 6,41 %, obtenido usando espectrofotometría de absorción atómica (AAS). El contenido de calcio fue de un 0,71 %, obtenido usando valoración complejométrica con EDTA. El contenido de agua fue de un 4,66 % según se mide mediante valoración de Karl Fischer.

30 DSC de esta muestra cristalina mostró picos de adsorción característicos a aproximadamente 120 °C y 151 °C.

35 La muestra cristalina se definió como una forma cristalina del Complejo I. El patrón de difracción de rayos X de polvo con radiación Cu K $\alpha$  tiene los ángulos de difracción, los espaciados d y las intensidades relativas de los picos que se enumeran en la Tabla VII.

Tabla VII

N.º de pico	Pos. [°2 $\theta$ ]	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,12	21,43	100
2	5,11	17,29	32,58
3	5,57	15,87	15,90
4	12,43	7,12	27,08
5	15,20	5,83	5,96
6	16,89	5,25	10,46
7	17,71	5,00	7,13
8	18,62	4,77	7,27
9	19,96	4,45	6,50

40 El patrón de difracción de rayos X de polvo del Complejo I se muestra en la Figura 1.

## 40 Ejemplo 2

Preparación de [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato]<sub>6</sub>CaNa<sub>16</sub>·15H<sub>2</sub>O

45 Se añadieron AHU-377 (2,41 g, 5,85 mmol) y sales de calcio de AHU-377 (1,26 g, 2,93 mmol) a 25 ml de acetona y se agitaron durante 30 min para obtener una solución transparente. Se añadió sal de sodio de valsartán (4,21 g, 8,78 mmol) a la solución transparente. La solución se agitó hasta que la sal se disolvió por completo.

Se preparó una solución de NaOH usando NaOH (234 mg, 5,85 mmol) en agua (0,3 ml) y a continuación se añadió gota a gota a la solución obtenida anteriormente en menos de 5 minutos y se agitó constante. Comenzaron a precipitar sólidos en aproximadamente 20-30 minutos. La solución se agitó de forma continua durante más de 6 horas y a continuación los sólidos se separaron a través de filtración. Los sólidos se lavaron tres veces usando acetona y a continuación se secaron en aire a temperatura ambiente. Se obtuvieron 6,8 g del complejo, lo que representa un rendimiento de un 81,0 %.

Usando HPLC con estándares externos, se calculó que la composición del complejo incluía un 45,30 % de valsartán y un 42,89 % de AHU-377. El contenido de sodio fue de un 6,41 %, obtenido usando espectrofotometría de absorción atómica (AAS). El contenido de calcio fue de un 0,70 %, obtenido usando valoración complejométrica con EDTA. El contenido de agua fue de un 4,70 % según se mide mediante valoración de Karl Fischer.

DSC de esta muestra cristalina mostró picos de adsorción característicos a aproximadamente 121 °C y 152 °C.

La muestra cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo que es consistente con el del Ejemplo 1.

### Ejemplo 3

Preparación de [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato]<sub>6</sub>CaNa<sub>14</sub>·15H<sub>2</sub>O

Se añadieron AHU-377 (1,27 g, 3,08 mmol) y sales de calcio de AHU-377 (2,66 g, 6,17 mmol) a 25 ml de acetona y se agitaron durante 30 min para obtener una solución transparente. Se añadió valsartán (4,03 g, 9,26 mmol) a la solución transparente. La solución se agitó hasta que el valsartán se disolvió por completo.

Se preparó una solución de NaOH usando NaOH (864 mg, 21,60 mmol) en agua (0,9 son ml) y a continuación se añadió gota a gota a la solución obtenida anteriormente en menos de 5 minutos con agitación constante. Comenzaron a precipitar sólidos en aproximadamente 20-30 minutos. La solución se agitó de forma continua durante más de 6 horas y a continuación los sólidos se separaron a través de filtración. Los sólidos se lavaron tres veces usando acetona y a continuación se secaron en aire a temperatura ambiente. Se obtuvieron 7,4 g del complejo, lo que representa un rendimiento de un 83,5 %.

Usando HPLC con estándares externos, se calculó que la composición del complejo incluía un 45,47 % de valsartán y un 42,03 % de AHU-377. El contenido de sodio fue de un 5,63 %, obtenido usando espectrofotometría de absorción atómica (AAS). El contenido de calcio fue de un 1,38 %, obtenido usando valoración complejométrica con EDTA. El contenido de agua fue de un 4,76 % según se mide mediante valoración de Karl Fischer.

DSC de esta muestra cristalina mostró picos de adsorción característicos a aproximadamente 125 °C y 155 °C.

La muestra cristalina se definió como una forma cristalina del Complejo II. El patrón de difracción de rayos X de polvo con radiación Cu K $\alpha$  del Complejo II tiene los ángulos de difracción, los espaciados d y las intensidades relativas de los picos que se enumeran en la Tabla VIII.

Tabla VIII

N.º de pico	Pos. [°2 $\theta$ ]	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,05	21,81	100,00
2	5,07	17,42	30,51
3	5,54	15,94	13,11
4	9,91	8,93	1,85
5	12,31	7,19	27,24
6	15,03	5,89	4,51
7	16,85	5,26	6,57
8	17,81	4,98	4,33
9	19,85	4,47	2,94

El patrón de difracción de rayos X de polvo de la muestra cristalina se muestra en la Figura 2.

### Ejemplo 4

Preparación de [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato]<sub>6</sub>CaNa<sub>14</sub>·15H<sub>2</sub>O

5 Se añadieron AHU-377 (1,27 g, 3,08 mmol) y sales de calcio de AHU-377 (2,66 g, 6,17 mmol) a 25 ml de acetona y se agitaron durante 30 min para obtener una solución transparente. Se añadió sal de sodio de valsartán (4,44 g, 9,26 mmol) a la solución transparente. La solución se agitó hasta que la sal se disolvió por completo.

10 Se preparó una solución de NaOH usando NaOH (123 mg, 3,08 mmol) en agua (0,15 ml) y a continuación se añadió gota a gota a la solución obtenida anteriormente en menos de 5 minutos con agitación constante. Comenzaron a precipitar sólidos en aproximadamente 20-30 minutos. La agitación se continuó durante más de 6 horas y a continuación los sólidos se separaron por filtración, se lavaron tres veces usando acetona y a continuación se secaron en aire a temperatura ambiente. Se obtuvieron 7,2 g del complejo, lo que representa un rendimiento de un 81,4 %.

15 Usando HPLC con estándares externos, se calculó que la composición del complejo incluía un 45,33 % de valsartán y un 42,95 % de AHU-377. El contenido de sodio fue de un 5,64 %, obtenido usando espectrofotometría de absorción atómica (AAS). El contenido de calcio fue de un 1,38 %, obtenido usando valoración complejimétrica con EDTA. El contenido de agua fue de un 4,77 % según se mide mediante valoración de Karl Fischer.

20 DSC de esta muestra cristalina mostró picos de adsorción característicos a aproximadamente 123 °C y 154 °C.

La muestra cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo que es consistente con el del Ejemplo 3.

#### Ejemplo 5

25 Preparación de [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato]<sub>6</sub>CaNa<sub>12</sub>·15H<sub>2</sub>O

30 Se disolvieron sales de calcio de AHU-377 (2,66 g, 6,17 mmol) en 25 ml de acetona y se agitaron durante 30 min para obtener una solución transparente. Se añadió sal de sodio de valsartán (2,96 g, 6,17 mmol) a la solución transparente. La solución se agitó hasta que la sal de sodio se disolvió por completo. Después de agitar durante 30-60 min a temperatura ambiente, comenzaron a precipitar sólidos de color blanco. La agitación se continuó durante más de 8 horas y a continuación los sólidos se retiraron por filtración, se lavaron tres veces usando acetona, y se secaron en aire a temperatura ambiente. Se obtuvieron 4,6 g del complejo, lo que representa un rendimiento de un 78,0 %.

35 Usando HPLC con estándares externos, se calculó que la composición del complejo incluía un 45,61 % de valsartán y un 43,01 % de AHU-377. El contenido de sodio fue de un 4,76 %, obtenido usando espectrofotometría de absorción atómica (AAS). El contenido de calcio fue de un 2,06 %, obtenido usando valoración complejimétrica con EDTA. El contenido de agua fue de un 4,65 % según se mide mediante valoración de Karl Fischer.

40 DSC de esta muestra cristalina mostró picos de adsorción característicos a aproximadamente 117 °C y 153 °C.

45 La muestra cristalina se definió como forma cristalina del Complejo III. Su patrón de difracción de rayos X de polvo con radiación Cu K $\alpha$  tiene los ángulos de difracción, los espaciados d y las intensidades relativas que se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX

N.º de pico	Pos. [°2 $\theta$ ]	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,06	21,78	100,00
2	5,03	17,39	60,81
3	5,52	16,02	26,11
4	8,59	10,29	5,01
5	9,81	9,01	4,08
6	12,33	7,18	24,95
7	15,22	5,82	7,45
8	16,87	5,26	11,75
9	17,83	4,97	7,78

El patrón de difracción de rayos X de polvo de esta cristalina se muestra en la Figura 3.

### Ejemplo 6

- 5 Preparación de [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato]<sub>6</sub>CaNa<sub>12</sub>·15H<sub>2</sub>O

10 Se añadió sal de calcio de AHU-377 (2,66 g, 6,17 mmol) a 25 ml de acetona y se agitó durante 20 min para obtener una solución transparente. Se añadió valsartán (2,69 g, 6,17 mmol) a la solución transparente. La solución se agitó hasta que la sal se disolvió por completo.

15 Se preparó una solución de NaOH usando NaOH (494 mg, 12,34 mmol) en agua (0,5 ml) y se añadió gota a gota a la solución obtenida anteriormente en menos de 5 minutos. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30-60 min, comenzaron a precipitar sólidos de color blanco. La agitación se continuó durante más de 8 horas y los sólidos se separaron de la solución por filtración, se lavaron tres veces usando acetona y a continuación se secaron en aire a temperatura ambiente. Se obtuvieron 4,8 g del complejo, lo que representa un rendimiento de un 81,5 %.

20 Usando HPLC con estándares externos, se calculó que la composición del complejo incluía un 45,57 % de valsartán y un 42,93 % de AHU-377. El contenido de sodio fue de un 4,84 %, obtenido usando espectrofotometría de absorción atómica (AAS). El contenido de calcio fue de un 2,13 %, obtenido usando valoración complejimétrica con EDTA. El contenido de agua fue de un 4,72 % según se mide mediante valoración de Karl Fischer.

DSC de esta muestra cristalina mostró picos de adsorción característicos a aproximadamente 119 °C y 154 °C.

- 25 El patrón de difracción de rayos X de polvo de esta muestra cristalina es consistente con el del Ejemplo 5.

### Preparación del Ejemplo Comparativo LCZ696

30 El Ejemplo Comparativo LCZ696 se preparó de acuerdo con la Realización 1 del documento ZL200680001733.0, párrafos [282]-[285].

### Experimento 1: Ensayo de estabilidad térmica

35 Los ejemplos de la invención 1, 2, 3, 4, 5, 6 y el ejemplo comparativo se pusieron en sus respectivas placas de Petri para estudiar su estabilidad a alta temperatura (60 °C), alta humedad (25 °C, 90 % ± 5 % de HR), o luz potente (4500 lux ± 500 lux). En el Día 5 y el Día 10, respectivamente, se tomaron muestras de ensayo para someter a ensayo su pureza. Los resultados del ensayo se muestran en la siguiente Tabla X.

Tabla X Resultados de pureza en el ensayo de estabilidad

40

N.º de muestra	Tiempo (días)	Luz 4500 Lux		Temperatura 60 °C		Humedad 25 °C 90 % HR	
		Valsartán	AHU377	Valsartán	AHU377	Valsartán	AHU377
Ejemplo 1	0	37,11	62,89	37,11	62,89	37,11	62,89
	5	37,13	62,85	37,09	62,87	37,12	62,84
	10	37,09	62,81	37,07	62,84	37,10	62,83
Ejemplo 2	0	37,12	62,88	37,12	62,88	37,12	62,88
	5	37,11	62,84	37,11	62,89	37,11	62,86
	10	37,08	62,80	37,06	62,77	37,08	62,82
Ejemplo 3	0	37,13	62,87	37,13	62,87	37,13	62,87
	5	37,09	62,84	37,11	62,81	37,12	62,82
	10	37,07	62,8 2	37,08	62,77	37,08	62,77
Ejemplo 4	0	37,11	62,89	37,11	62,89	37,11	62,89
	5	37,08	62,86	37,07	62,82	37,10	62,87
	10	37,05	62,81	37,01	66,79	37,08	62,84
Ejemplo 5	0	37,08	62,92	37,08	62,92	37,08	62,92
	5	37,06	62,86	37,04	62,83	36,99	62,86

N.º de muestra	Tiempo (días)	Luz 4500 Lux		Temperatura 60 °C		Humedad 25 °C 90 % HR	
		Valsartán	AHU377	Valsartán	AHU377	Valsartán	AHU377
	10	36,98	62,79	36,97	62,72	37,01	62,82
Ejemplo 6	0	37,10	62,90	37,10	62,90	37,10	62,90
	5	37,04	62,81	37,01	62,82	37,03	62,83
	10	36,96	62,73	36,95	62,77	36,96	62,78
Ejemplo Comparativo	0	37,09	62,91	37,09	62,91	37,09	62,91
	5	37,04	62,84	37,03	62,81	37,05	62,89
	10	36,99	62,81	36,98	62,76	37,01	62,91

Los resultados del ensayo de estabilidad muestran que, después de la exposición durante 10 días a alta temperatura (60 °C), alta humedad (25 °C, 90 % ± 5 % de HR), o luz potente (4500 lux ± 500 lux), los ejemplos de la invención 1, 2, 3, 4, 5, 6 así como el ejemplo comparativo exhibieron solo ligeras disminuciones en la pureza determinada usando HPLC, lo que indica que todos estos complejos cristalinos tienen una buena estabilidad.

### Experimento 2: Ensayo de solubilidad en equilibrio

Con el fin de investigar la solubilidad de los ejemplos de la invención 1, 2, 3, 4, 5, 6 y el ejemplo comparativo, su solubilidad se sometió a ensayo a 37 °C en ácido clorhídrico a pH = 1,0 (0,1 mol/l), en una solución tampón de acetato de amonio/amoniaco a pH = 3,5, y en una solución tampón de dihidrogenofosfato de potasio-hidróxido de sodio a pH = 6,8 y agua, respectivamente. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla XI:

Tabla XI Resultados de ensayo de solubilidad en equilibrio

Muestra	pH 1.0 (mg/ml)	pH 3,5 (mg/ml)	pH 6,8 (mg/ml)	Agua (mg/ml)
Ejemplo 1	0,07	0,49	16,00	5,78
Ejemplo 2	0,06	0,51	16,10	5,75
Ejemplo 3	0,06	0,48	16,42	4,73
Ejemplo 4	0,07	0,49	16,45	4,68
Ejemplo 5	0,07	0,46	16,20	3,77
Ejemplo 6	0,07	0,45	16,23	3,74
Ejemplo Comparativo	0,05	0,50	>50	>25

Los resultados del ensayo muestran que la solubilidad de los ejemplos de la invención en la solución tampón a pH 3,5 o en el ácido clorhídrico a pH 1,0 es similar pero no tan alta como la del ejemplo comparativo.

### Experimento 3: Ensayo de higroscopicidad

Los ejemplos de la invención 1, 2, 3, 4, 5, 6 y el ejemplo comparativo se pusieron en una botella de pesada limpia y abierta a 25 ± 1 °C a 80 % ± 2 % de HR durante 24 horas para evaluar el aumento de peso debido a la absorción de agua. Los resultados se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII Resultados del ensayo de higroscopicidad

Muestras	Aumento de peso	Aspecto en la hora cero	Aspecto a las veinticuatro horas
Ejemplo 1	6,95 %	Polvo de color blanquecino	Polvo de color blanquecino
Ejemplo 2	6,98 %	Polvo de color blanquecino	Polvo de color blanquecino
Ejemplo 3	4,55 %	Polvo de color blanquecino	Polvo de color blanquecino
Ejemplo 4	4,51 %	Polvo de color blanquecino	Polvo de color blanquecino
Ejemplo 5	2,12 %	Polvo de color blanquecino	Polvo de color blanquecino
Ejemplo 6	2,09 %	Polvo de color blanquecino	Polvo de color blanquecino

Muestras	Aumento de peso	Aspecto en la hora cero	Aspecto a las veinticuatro horas
Ejemplo Comparativo	22,34 %	Polvo de color blanquecino	Casi líquido

Los resultados del ensayo de higroscopicidad anteriores muestran que después de 24 horas a una humedad elevada, la totalidad de los ejemplos de la invención 1-6 tuvieron un aumento de peso de menos de un 7 %. El Ejemplo 6 solo tuvo un aumento de peso de un 2,09 % y mantuvo su aspecto. Por el contrario, el ejemplo comparativo tuvo un aumento de peso de más de un 15 % debido a la absorción de agua y casi se volvió líquido después de 24 horas. Este resultado muestra que el ejemplo comparativo fue altamente higroscópico y requeriría condiciones más restrictivas en el procesamiento posterior y el almacenamiento. Debido a esto, con respecto al ejemplo comparativo, los ejemplos de la invención se pueden procesar y almacenar en condiciones habituales menos exigentes.

#### Experimento 4: Estudios farmacocinéticos *in vivo* en perros Beagle

##### 1. Objetivos

Descubrir, después de una dosis individual a través de administración oral de la misma dosificación molar de los Ejemplos de la invención 1, 3, 5, y el Ejemplo Comparativo, las concentraciones de valsartán, AHU377 y el metabolito de AHU377- LBQ657, así como las características farmacocinéticas básicas, y comparar los parámetros principales, incluyendo  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $AUC_{final}$ , etc.

##### 2. Materiales y métodos

###### 2.1 Medicaciones que se someten a ensayo

Ejemplo 1 en cápsulas: cápsulas que contienen Ejemplo 1, proporcionadas por el Departamento de Formulaciones de fármacos de Chengdu Eastern Pharma Co., con una dosificación de 312  $\mu\text{mol}$ /cápsula, Lote: 150901; Ejemplo 3 en cápsulas: cápsulas que contienen Ejemplo 3, proporcionadas por el Departamento de Formulaciones de fármacos de Chengdu Eastern Pharma Co., con una dosificación de 312  $\mu\text{mol}$ /cápsula, Lote: 150901; Ejemplo 5 en cápsulas: cápsulas que contienen Ejemplo 5, proporcionadas por el Departamento de Formulaciones de fármacos de Chengdu Eastern Pharma Co., con una dosificación de 312  $\mu\text{mol}$ /cápsula, Lote: 150901; Ejemplo Comparativo LCZ696 en cápsulas: LCZ696 en cápsulas, proporcionadas por el Departamento de Formulaciones de fármacos de Chengdu Eastern Pharma Co., con una dosificación de 312  $\mu\text{mol}$ /cápsula, Lote: 150831;

###### 2.2 Sujeto de los experimentos

Cuatro perros Beagle macho, con un peso corporal de  $8 \pm 2$  kg, una edad de 10-12 meses, adquiridos en Chengdu Dashuo Biological Technology Co., Ltd., Certificado de conformidad: SCXK (Sichuan) 2013 -24.

###### 2.3 Diseño del experimento

Período de administración de fármaco: usando perros Beagle en un estudio piloto cruzado 4 x 4. Hay un total de 4 ciclos de ensayo. En cada ciclo, se administraron 4 perros con 4 cápsulas de fármaco diferentes. Después de cada ciclo, se realizó una pausa de dos días para permitir que las medicaciones se metabolizaran por completo antes de comenzar el siguiente ciclo experimental. Los detalles se muestran en la siguiente Tabla XIII.

Tabla XIII Estudios farmacocinéticos en perros Beagle

ID de animal	Fármacos sometidos a ensayo			
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
MD1	Ejemplo Comparativo	Ejemplo 1	Ejemplo 3	Ejemplo 5
MD2	Ejemplo 1	Ejemplo Comparativo	Ejemplo 5	Ejemplo 3
MD3	Ejemplo 3	Ejemplo 5	Ejemplo Comparativo	Ejemplo 1
MD4	Ejemplo 5	Ejemplo 3	Ejemplo 1	Ejemplo Comparativo

Nota: MD = perro macho.

###### 2.4 Recogida de muestras

En cada ciclo, se recogió una muestra de sangre de 1 ml en tubos EDTA-K2, 5 min, 15 min, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h, 36 h, 48 h antes y después de administrar la dosis individual en las venas de las extremidades anteriores o las extremidades inferiores y centrifugar durante 10 minutos a 3000 r/min. El plasma se separó y se mantuvo en un congelador a -70 °C.

5

## 2.5 Análisis de las muestras biológicas por LC/MS/MS

Mezclar de forma uniforme 50 µl de plasma con 5 µl de una solución de trabajo o un diluyente de blanco, añadir 150 µl del agente de precipitación acetonitrilo que contiene un estándar interno, mezclar de forma vorticial durante 2 minutos, y centrifugar durante 5 minutos a 12000 rpm. Se mezclaron 100 µl de sobrenadante con 100 µl de agua pura. El tamaño de muestra de inyección fue de 10 µl.

10

## 2.6 Métodos estadísticos

Se usó SPSS para el análisis estadístico y los datos experimentales se expresaron como el valor medio más o menos la desviación estándar. La comparación entre los múltiples conjuntos de datos usó análisis de varianza (ANOVA), mientras que se empleó ensayo de diferencia mínima significativa (LSD) para comparar dos puntos de datos.

15

## 2.7 Resultados experimentales

Tabla XIV Parámetros farmacocinéticos obtenidos en el estudio

Programas de tratamiento	T <sub>max</sub> , h	C <sub>max</sub> , ng/ml	AUC <sub>0-Final</sub> , ng*h/ml
Valsartán			
Cápsula del Ejemplo 1	0,56 ± 0,31*	6765 ± 1724 *	23166 ± 3467 *
Cápsula del Ejemplo 3	0,75 ± 0,29	7034 ± 1672 *	24784 ± 4979 *
Cápsula del Ejemplo 5	2,00 ± 1,40	6584 ± 1533 *	21713 ± 1667 *
Cápsula del Exp. Compar.	2,25 ± 1,25	3937 ± 1748	17628 ± 2834
AHU377			
Cápsula del Ejemplo 1	0,56 ± 0,31	1278 ± 222 *	2499 ± 320 *
Cápsula del Ejemplo 3	0,63 ± 0,25	1377 ± 331 *	2541 ± 383 *
Cápsula del Ejemplo 5	0,44 ± 0,12	1320 ± 285 *	3249 ± 603 *
Cápsula del Exp. Compar.	0,63 ± 0,25	758 ± 352	1829 ± 415
LBQ657			
Cápsula del Ejemplo 1	1,13 ± 0,63	1486 ± 346*	5693 ± 548 *
Cápsula del Ejemplo 3	1,50 ± 0,58	1474 ± 362 *	5818 ± 722 *
Cápsula del Ejemplo 5	1,75 ± 0,50	1574 ± 421 *	5899 ± 796 *
Cápsula del Exp. Compar.	1,63 ± 0,75	869 ± 334	4579 ± 698

\*\*P": en comparación con el ejemplo comparativo,  $P < 0,05$ ;

Después de una administración oral de la cápsula de fármaco, T<sub>MAX</sub> del valsartán para los Ejemplos 1 y 3 se movió considerablemente antes. En especial, T<sub>MAX</sub> del valsartán para el Ejemplo 1 mostró significación estadística en comparación con el ejemplo comparativo (\* $P < 0,05$ ). En los Ejemplos 1, 3, y 5, valsartán, AHU377, y LBQ657 (el metabolito de AHU377) mostraron valores de C<sub>MAX</sub> y AUC claramente mayores que los del ejemplo comparativo (\* $P < 0,05$ ), lo que proporciona una evidencia de que valsartán y AHU377 se han absorbido mejor que el ejemplo comparativo en los perros Beagle.

25

## Conclusión

Los ensayos de metabolismo en perros Beagle muestran que los Ejemplos 1 y 3 llegaron a un valor de pico en el valsartán más rápido que en los ejemplos comparativos, lo que indica que los Ejemplos 1 y 3 se muestran eficaces más rápido. Los Ejemplos 1, 3 y 5 exhibieron de forma clara mayores valores de C<sub>max</sub> y AUC en valsartán, AHU377, y LBQ657 (el metabolito de AHU377) que los del ejemplo comparativo, lo que indica una mayor biodisponibilidad. Es decir, en las condiciones de este conjunto de experimentos, los Ejemplos 1, 3 y 5 demostraron mejores absorciones que el ejemplo comparativo.

30

35

40

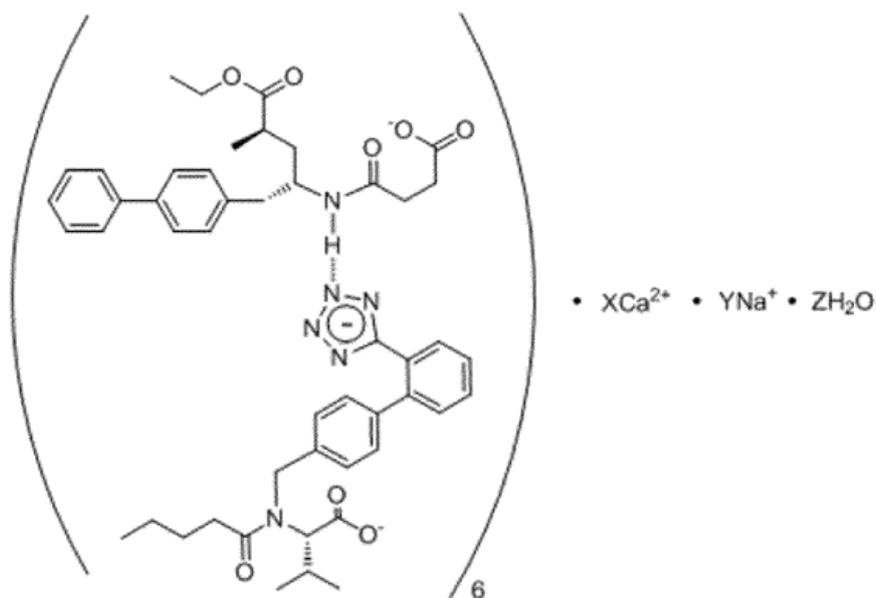
De acuerdo con los resultados anteriores, los ejemplos de la invención que se desvelan en el presente documento tienen una mejor biodisponibilidad y pueden ser más eficaces en la prevención de insuficiencia cardíaca. Los expertos habituales en la materia pueden modificar o variar el complejo, la forma cristalina, y el método de preparación en una diversidad de formas, siempre que las modificaciones o variaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones.

5

## REIVINDICACIONES

1. Un complejo de [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato] de calcio y sodio.

5 2. El complejo de la reivindicación 1 que tiene una fórmula de [3-((1S,3R)-1-bifenil-4-ilmetil-3-etoxicarbonil-1-butilcarbamoil)propionato-(S)-3'-metil-2'-(pentanoil{2''-(tetrazol-5-ilato)bifenil-4'-ilmetil}amino)butirato]<sub>6</sub>·XCa<sup>2+</sup>·YNa<sup>+</sup>·ZH<sub>2</sub>O, en la que X = 1-3, Y = 12-16, Z = 9-18, y 2X + Y = 18, y está representado por



- 10 3. El complejo de la reivindicación 2, en el que X = 1, Y = 16, Z = 12-18.
- 15 4. El complejo de la reivindicación 2, en el que X = 1, Y = 16, Z = 12, 15 o 18.
5. El complejo de la reivindicación 2, en el que X = 2, Y = 14, y Z = 9-15.
6. El complejo de las reivindicaciones 2 o 5, en el que X = 2, Y = 14, Z = 12, 15 o 9.
- 20 7. El complejo de la reivindicación 2, en el que X = 3, Y = 12, y Z = 9-15.
8. El complejo de la reivindicación 2, en el que X = 3, Y = 12, Z = 12, 15 o 9.
- 25 9. El complejo de la reivindicación 1, en forma cristalina.
10. El complejo de la reivindicación 4, en forma cristalina, en el que X = 1, Y = 16, Z = 15, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo con los ángulos de difracción, espaciados d e intensidades relativas de pico enumerados en la siguiente tabla

N.º de pico	Pos. [°2θ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,12	21,43	100,00
2	5,11	17,29	32,58
3	5,57	15,87	15,90
4	12,43	7,12	27,08
5	15,20	5,83	5,96
6	16,89	5,25	10,46
7	17,71	5,00	7,13

N.º de pico	Pos. [ $^{\circ}2\theta$ ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
8	18,62	4,77	7,27
9	19,96	4,45	6,50

en la que el ángulo de difracción tiene un margen de error de  $\pm 0,2$ .

5 11. El complejo de la reivindicación 10 que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo que se muestra en la Figura 1.

10 12. El complejo de la reivindicación 6 en forma cristalina, en el que  $X = 2$ ,  $Y = 14$ ,  $Z = 15$ , que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo con los ángulos de difracción, espaciados d e intensidades relativas de pico enumerados en la siguiente tabla:

N.º de pico	Pos. [ $^{\circ}2\theta$ ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,05	21,81	100,00
2	5,07	17,42	30,51
3	5,54	15,94	13,11
4	9,91	8,93	1,85
5	12,31	7,19	27,24
6	15,03	5,89	4,51
7	16,85	5,26	6,57
8	17,81	4,98	4,33
9	19,85	4,47	2,94

en la que el ángulo de difracción tiene un margen de error de  $\pm 0,2$ .

15 13. El complejo de acuerdo con la reivindicación 12 que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo que se muestra en la Figura 2.

20 14. El complejo de la reivindicación 8 en forma cristalina, en el que  $X = 3$ ,  $Y = 12$ ,  $Z = 15$ , que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo con los ángulos de difracción, espaciados d e intensidades relativas de pico enumerados en la siguiente tabla:

N.º de pico	Pos. [ $^{\circ}2\theta$ ]*	Espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
1	4,06	21,78	100,00
2	5,03	17,39	60,81
3	5,52	16,02	26,11
4	8,59	10,29	5,01
5	9,81	9,01	4,08
6	12,33	7,18	24,95
7	15,22	5,82	7,45
8	16,87	5,26	11,75
9	17,83	4,97	7,78

en la que el ángulo de difracción tiene un margen de error de  $\pm 0,2$ .

25 15. El complejo de acuerdo con la reivindicación 14 que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo que se muestra en la Figura 3.

16. Un método para preparar el complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende las siguientes etapas:

disolver AHU-377 y/o una sal de calcio del mismo en acetona para formar una primera solución;  
disolver valsartán y/o su sal de sodio en la primera solución para formar una segunda solución;  
añadir una solución de NaOH a la segunda solución;

formar un precipitante sólido en la segunda solución con agitación constante;

5 separar el sólido de la segunda solución;

lavar el sólido con acetona; y

secar el sólido en aire ambiente para obtener el complejo.

10 17. El complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso en el tratamiento de insuficiencia cardiaca crónica.

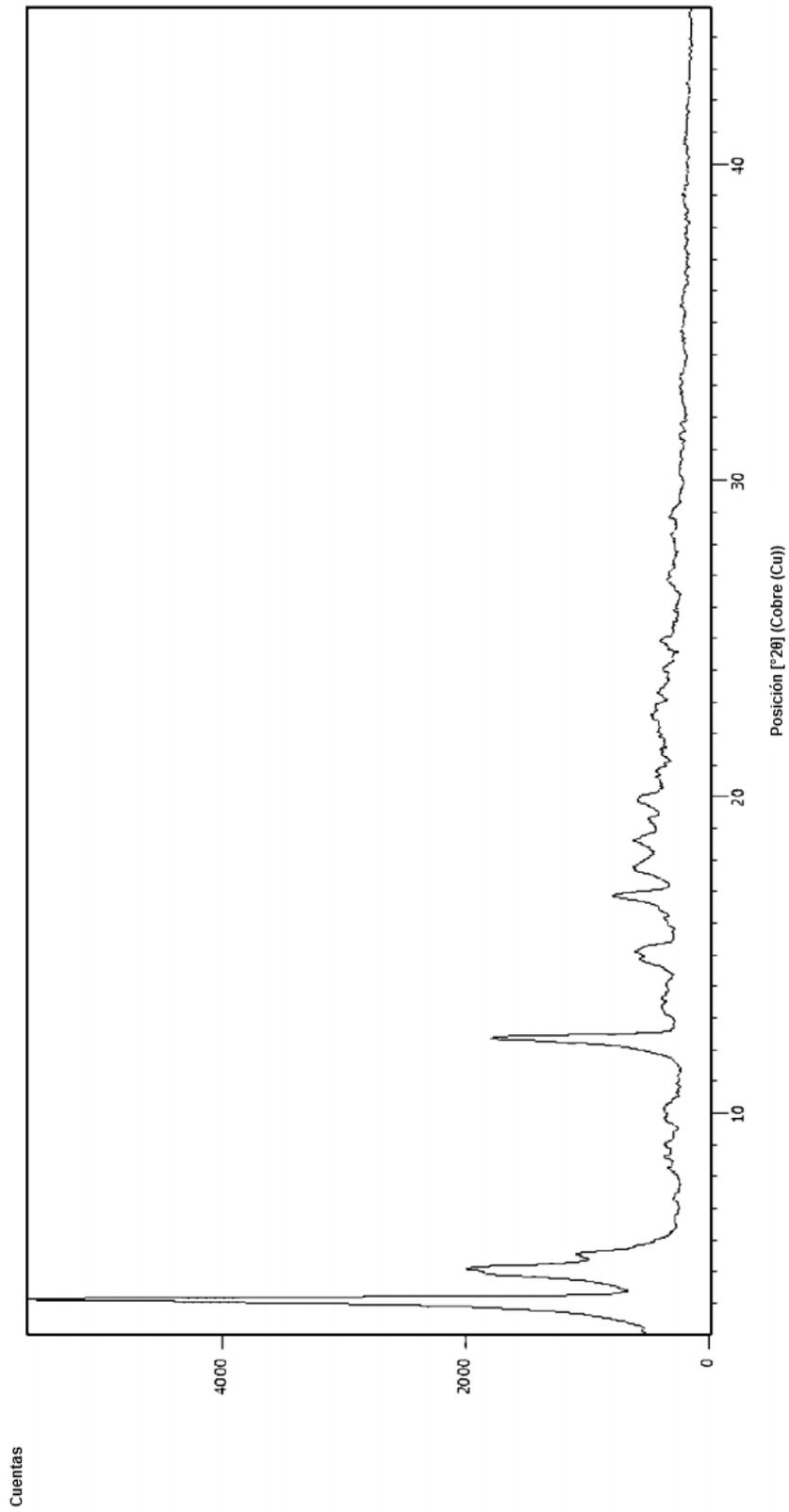


Figura 1

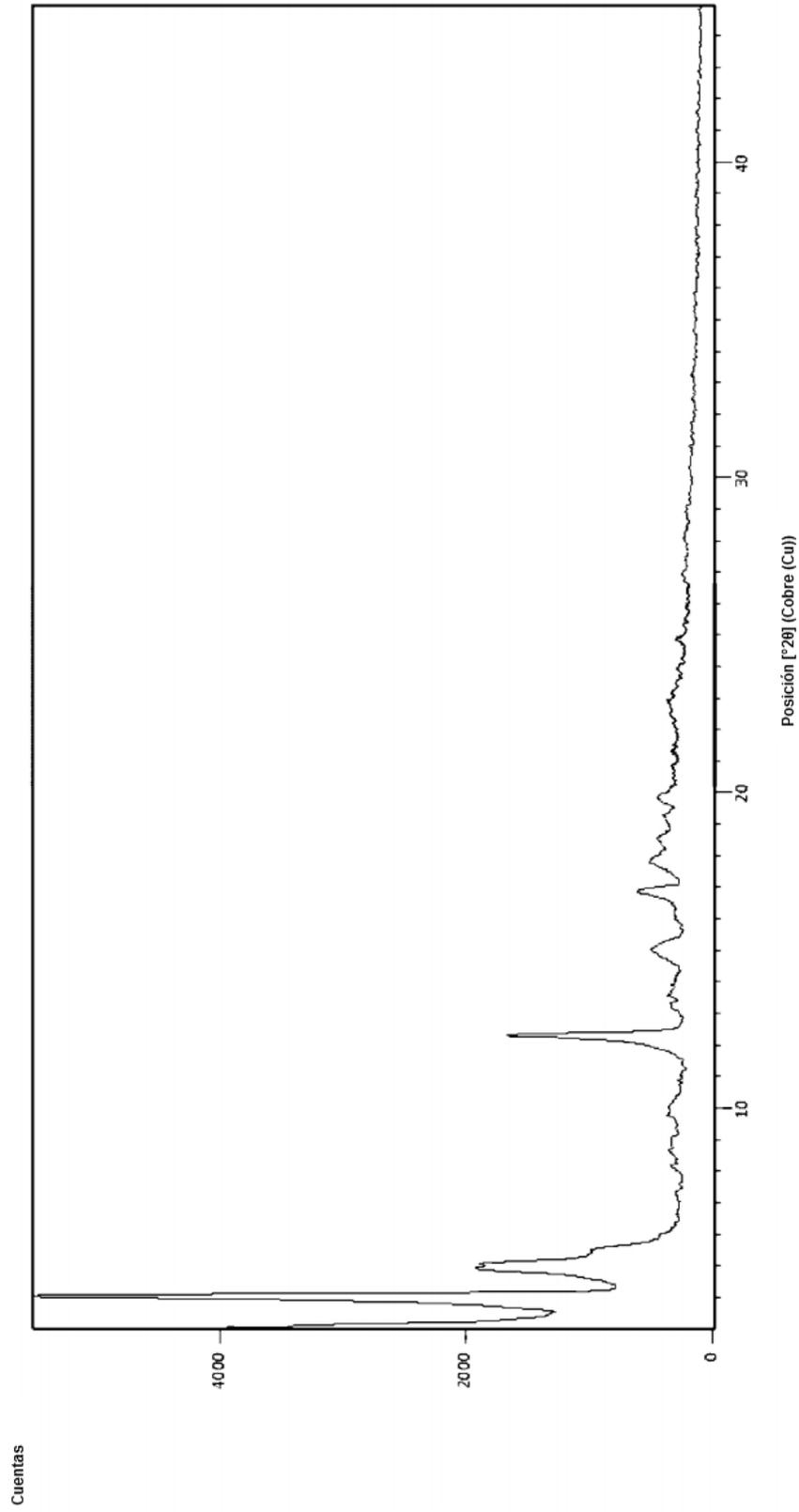


Figura 2

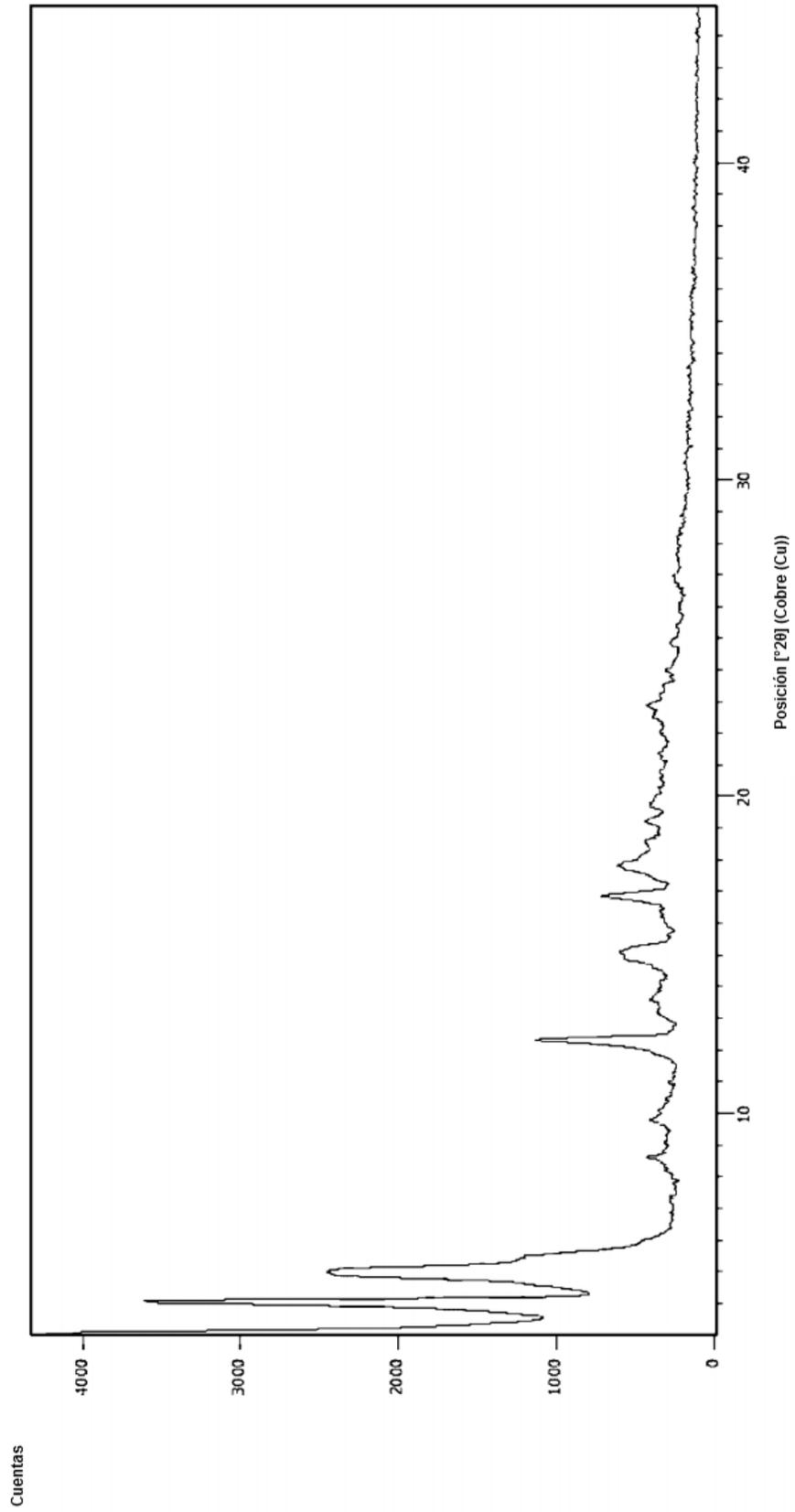


Figura 3