Un complejo de metabolito antagonista del receptor de angiotensina II e inhibidor de NEP en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca

Campo técnico

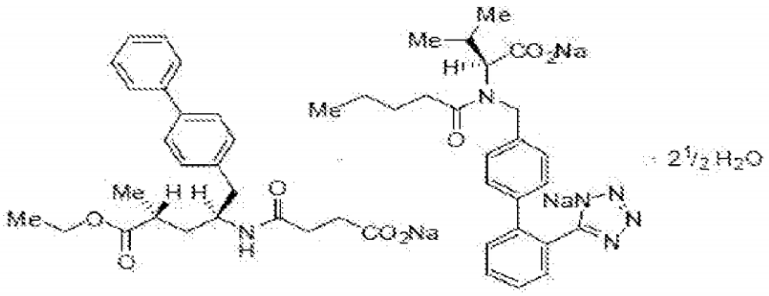
La invención pertenece al campo técnico de las ciencias de la vida y se refiere a un complejo de un metabolito antagonista del receptor de angiotensina II y un inhibidor de NEP para la insuficiencia cardíaca, específicamente al complejo en la preparación de un medicamento para la insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida.

Antecedentes

La insuficiencia cardíaca es una manifestación grave o una etapa tardía de diversas cardiopatías, con altas tasas de muerte y rehospitalización. En los países desarrollados, la prevalencia de insuficiencia cardíaca es del 1.5 % al 2.0 % y ≥10 % en los grupos de población mayores de 70 años. Una encuesta epidemiológica realizada en 2003 mostró que la prevalencia de insuficiencia cardíaca era del 0.9 % entre los adultos de 35 a 74 años en China. Con el envejecimiento de la población en China, está en aumento la incidencia de enfermedades crónicas como la cardiopatía, la hipertensión, la diabetes y la obesidad. Las técnicas médicas mejoradas han prolongado el período de supervivencia de los pacientes con cardiopatías, lo que ha dado lugar a un aumento continuo de la prevalencia de insuficiencia cardíaca en China. Una encuesta de 10 714 pacientes hospitalizados con insuficiencia cardíaca en China mostró que las tasas de mortalidad de pacientes con insuficiencia cardíaca fueron del 15.4 %, 12.3 % y 6.2 % durante la hospitalización en 1980, 1990 y 2000, respectivamente, y que las principales causas de muerte fueron insuficiencia ventricular izquierda (59 %), arritmia (13 %) y muerte súbita de origen cardíaco (13 %). El estudio China-HF mostró que la tasa de mortalidad fue del 4.1 % en pacientes hospitalizados con insuficiencia cardíaca.

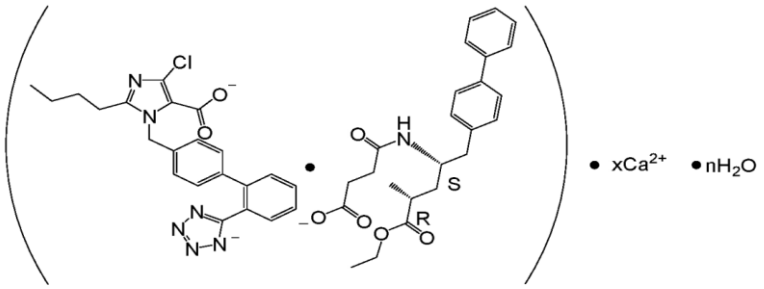
En WO2007056546A1 se describe un complejo de sal sódica de valsartan-sacubitril (LCZ696) y su método de preparación. En 2017, fue aprobado para su comercialización en China con el nombre comercial de Entresto® para la insuficiencia cardíaca.

Sus unidades de estructura molecular son las siguientes:



Además, en WO2017125031A1 se describe una serie de complejos de un metabolito antagonista del receptor de angiotensina (EXP3174) y un inhibidor de NEP (sacubitril) que presentan determinados efectos sobre la insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión conservada (HFpEF) y tienen las

unidades estructurales moleculares siguientes:



Puede observarse que es fundamental hallar un fármaco dirigido que tenga un buen efecto terapéutico para la insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida.

Descripción de la invención

En vista de los problemas técnicos existentes en el estado de la técnica, la invención proporciona un complejo de un metabolito antagonista del receptor de angiotensina II y un inhibidor de NEP (o "un complejo supramolecular") en la preparación de un medicamento para la insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida. El complejo tiene las unidades estructurales siguientes:

(a EXP3174·bAHU377)·× Ca·nA

Específicamente, la insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida se refiere a HFrEF según se define en la Tabla 1 de *Chinese Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Heart Failure 2018:* clasificación y criterios diagnósticos de insuficiencia cardíaca.

Como una solución técnica preferida de la invención, el medicamento se utiliza en pacientes que padecen insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida. Como se infiere de los resultados experimentales de la invención y la dosis de profármaco utilizado, una forma de dosis única del medicamento contiene de 60 mg a 500 mg del complejo calculado por la masa total de (aEXP3174 • bAHU377), que incluye, entre otros, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg, 210 mg, 220 mg, 230 mg, 240 mg, 250 mg, 260 mg, 270 mg, 280 mg, 290 mg, 300 mg, 310 mg, 320 mg, 330 mg, 340 mg, 350 mg, 360 mg, 370 mg, 380 mg, 390 mg, 400 mg, 410 mg, 420 mg, 430 mg, 440 mg, 450 mg, 460 mg, 470 mg, 480 mg, 490 mg y 500 mg.

Como una solución técnica más preferida de la invención, una forma de dosis única del medicamento contiene 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 mg del complejo. En una modalidad, una forma de dosis única se refiere a la forma farmacéutica diaria. Se administra a los pacientes un contenido de 60 mg/d a 500 mg/d del complejo, y las frecuencias de dosificación incluyen, entre otras, una vez al día, dos veces al día, 3 veces al día, 4 veces al día, etc. La dosis se refiere a la dosis inicial o dosis de mantenimiento del del fármaco. En la hipertensión, la dosis inicial suele ser menor que la dosis de mantenimiento. La dosis puede aumentarse adecuadamente en pacientes con hipertensión resistente en condiciones especiales.

Específicamente, el método de cálculo incluye calcular de acuerdo con la dosis diaria de

profármaco. EXP3174 es el metabolito de allisartan isoproxilo en el organismo que ha estado en el mercado con el nombre genérico Allisartan Isoproxil Tablets y el nombre comercial Xinlitan, y se administra a 240 mg al día.

El allisartan isoproxilo tiene la fórmula molecular $C_{27}H_{29}ClN_6O_5$ y el peso molecular de 553.0; EXP3174 tiene la fórmula molecular $C_{22}H_{21}ClN_6O_2$ y el peso molecular de aproximadamente 436.9; AHU377 tiene la fórmula molecular $C_{24}H_{29}NO_5$ y el peso molecular de aproximadamente 411.5. La dosis diaria del complejo debe ser equivalente a la de allisartan isoproxilo. Por lo tanto, la forma de dosis única del complejo mencionado anteriormente se obtiene mediante cálculo.

Con base en los datos del modelo de insuficiencia cardíaca canina con fracción de expulsión disminuida, se infiere que la dosis eficaz es de 100 mg/d en seres humanos con un rango de dosis de 60 mg/d a 500 mg/d.

El medicamento es una preparación sólida para administración oral, preferentemente un comprimido o cápsula oral, que se puede administrar en múltiples comprimidos y múltiples cápsulas con una dosis total de 60 mg a 500 mg.

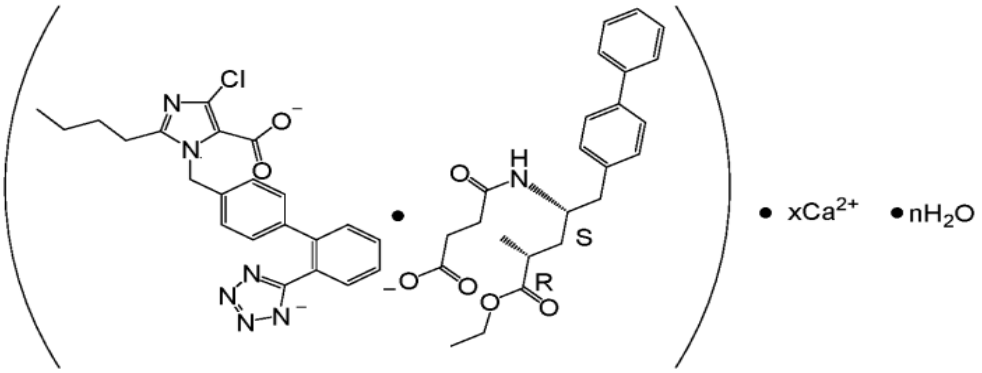
El complejo del medicamento puede obtenerse mediante un método conocido en el estado de la técnica, en donde el complejo y su método de preparación descritos en WO2017125031A1 se incorporan a la invención.

Como una solución técnica más preferida de la invención, el valor de a:b se selecciona de 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5 y 1:4.

Como una solución técnica más preferida de la invención, el complejo tiene las unidades estructurales siguientes:

$$(EXP3174 \cdot AHU377) \cdot \times Ca \cdot nH_2O$$

o



donde x es un valor entre 0.5 y 2, y n es un valor entre 0 y 3.

Como una solución técnica más preferida de la invención, x se selecciona de 0.5, 1, 1.5 y 2.

Como una solución técnica más preferida de la invención, el complejo tiene las unidades estructurales siguientes:

$$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 1.5Ca \bullet nH_2O$$

o

$$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 2Ca \bullet nH_2O$$

donde n es cualquier valor entre 1 y 3.

Como una solución técnica más preferida de la invención, n se selecciona de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3.

Como una solución técnica más preferida de la invención, el complejo se selecciona de los siguientes:

$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 1.5Ca \bullet 1H_2O$;
$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 1.5Ca \bullet 1.5H_2O$;
$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 1.5Ca \bullet 2H_2O$;
$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 1.5Ca \bullet 2.5H_2O$;
$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 1.5Ca \bullet 3H_2O$;
$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 2Ca \bullet 1H_2O$;
$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 2Ca \bullet 1.5H_2O$;
$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 2Ca \bullet 2H_2O$;
$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 2Ca \bullet 2.5H_2O$;
$(EXP3174 \bullet AHU377) \bullet 2Ca \bullet 3H_2O$。

Los expertos en la técnica pueden comprender que en la celda unitaria de un complejo supramolecular, el metabolito allisartan isoproxilo (EXP3174), AHU377, ion calcio (Ca^{2+}) y moléculas de disolvente se llenarán en esta en forma de una pluralidad de unidades estructurales. El complejo supramolecular de la invención es diferente de una mezcla obtenida mediante mezcla física simple de dos principios activos. El espectro XRD del complejo supramolecular obtenido es claramente diferente del de EXP3174 y la sal de calcio de AHU377, y su solubilidad también es significativamente diferente en diversos disolventes (como agua, etanol, etanol-agua, etc.). También existen diferencias significativas en otras propiedades físicas y químicas como la higroscopicidad, el punto de fusión, el espectro infrarrojo, etc.

En comparación con el estado de la técnica, la invención presenta las ventajas y efectos beneficiosos siguientes:

1. La invención proporciona una serie de complejos supramoleculares con dobles efectos del metabolito allisartan isoproxilo (EXP3174) y el inhibidor de encefalinasa (AHU377) en insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida, que tienen un efecto significativamente mejor que LCZ696 a la misma dosis;

2. El complejo de la invención en un modelo canino con fracción de expulsión reducida tiene un efecto mejor que el de un modelo canino con fracción de expulsión conservada. Puede observarse que la composición farmacéutica de la invención tiene una selectividad específica para la insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida, lo que es difícil de predecir basándose en el estado de la técnica.

3. El complejo de la invención tiene un mejor efecto que la mezcla física de EXP3174+AHU377, lo que demuestra completamente que el complejo tiene ventajas significativas sobre una combinación física de fármacos.

Descripción de los dibujos

Figura 1 *Chinese Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Heart Failure 2018:* tabla de

clasificación y criterios diagnósticos de insuficiencia cardíaca.

Modalidades específicas

La invención se describirá ahora con más detalle con referencia a ejemplos y dibujos, pero las modalidades de la invención no se limitan a estos.

En los ejemplos siguientes:

Se usó un difractómetro de rayos X Empyrean para la detección de difracción de rayos X en polvo. Las condiciones de detección: Cu se dirige a rayo Kα, tensión de 40 KV, corriente de 40 mA, ranura de emisión de 1/32°, ranura antidispersión de 1/16°, ranura antidispersión de 7.5 mm, rango 2θ de 3° a 60°, longitud de paso 0.02°, y tiempo de permanencia por paso 40 s.

Se usó el calorímetro diferencial de barrido DSC204F1 de NETZSCH, Alemania para detectar espectros de calorimetría diferencial de barrido. Condiciones de detección: atmósfera: N_2, 20 ml/min; procedimiento de barrido: registrar la curva de calentamiento al aumentar la temperatura de la temperatura ambiente a 10 ℃/min a 250 ℃.

Se usó el analizador termogravimétrico TG209 de NETZSCH, Alemania para detectar el contenido de humedad. Condiciones de detección: atmósfera: N_2, 20 ml/min; procedimiento de barrido: temperatura ambiente a 700 °C, velocidad de calentamiento: 10 °C/min. El EXP3174 utilizado en los ejemplos fue de fabricación propia por parte de la empresa, con una pureza del 98.3 %.

La sal de calcio de AHU377 utilizada en los ejemplos fue de fabricación propia por parte de la empresa, con una pureza del 99.4 %.

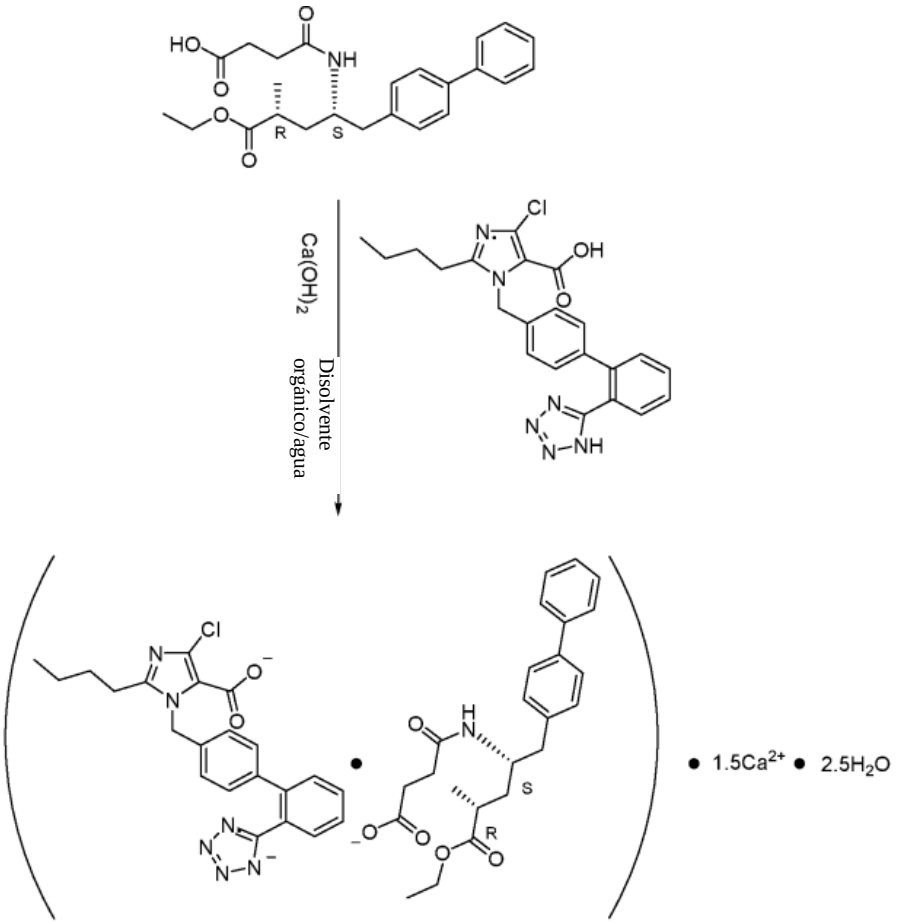
Ejemplo 1

Preparación de ácido libre de AHU377:

A un matraz de una sola boca de 250 ml se le añadieron 2.1 g de sal de calcio de AHU377 y 40 ml de acetato de isopropilo, y después se le añadieron 4.5 ml de ácido clorhídrico de 2 mol/l a temperatura ambiente y se agitó para su disolución. Los líquidos se separaron para recoger la capa orgánica que se hizo pasar dos veces por 20 ml de agua; después de precipitar a presión reducida a 35 °C, proporcionó ácido libre de AHU377.

Ejemplo 2

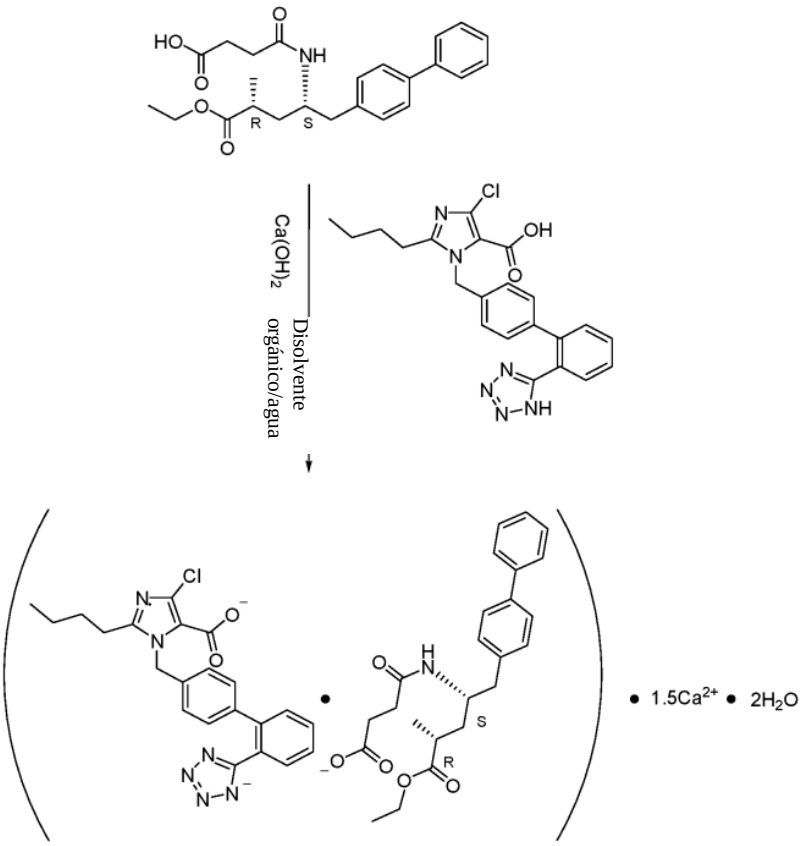
Preparación del complejo: (preparado de acuerdo con el Ejemplo 2 de la patente WO2017125031A1)



A temperatura ambiente, se añadieron 2.36 g de ácido libre de AHU377, 2 g de EXP3174 y 40 ml de acetona obtenida de acuerdo con el método del Ejemplo 1 en un matraz de tres bocas de 250 ml y se disolvieron; se añadieron 1.3 equivalentes de sólido de hidróxido de calcio a AHU377 y 1 ml de agua a temperatura ambiente, se agitó a temperatura ambiente durante 10 h y se le añadieron 40 ml más de acetona para hacerlos reaccionar durante otras 8 horas. Bajo protección de nitrógeno, se filtró mediante un embudo Buchner. El sólido se pasó por acetona para proporcionar un sólido blanco que se secó al vacío a 35 °C durante 8 h y se secó para proporcionar 3.5 g de sólido $(EXP3174 \cdot AHU377)^{3-} \cdot 1.5Ca^{2+} \cdot 2.5H_2O$, con una pureza del 99 % determinada por HPLC. La prueba se repitió para obtener dosis suficientes para experimentos farmacodinámicos.

Ejemplo 3

Preparación del complejo: (preparado de acuerdo con el Ejemplo 3 de la patente WO2017125031A1)



A temperatura ambiente, se añadieron 2.36 g de ácido libre de AHU377, 2 g de EXP3174 y 40 ml de acetona obtenida de acuerdo con el método del Ejemplo 1 en un matraz de tres bocas de 250 ml y se disolvieron; se añadieron 1.6 equivalentes de sólido de hidróxido de calcio a AHU377 y 0.6 ml de agua a temperatura ambiente, se agitó durante 6 h a 35 °C y se le añadieron 40 ml más de acetona para hacerlos reaccionar durante otras 8 horas. Bajo protección de nitrógeno, se filtró mediante un embudo Buchner. El sólido se pasó por acetona para proporcionar un sólido blanco que se secó al vacío a 50 °C durante 8 h y se secó para proporcionar 3.1 g de sólido $(EXP3174 \bullet AHU377)^{3-} \bullet 1.5Ca^{2+} \bullet 2H_2O$. La prueba se repitió para obtener dosis suficientes para experimentos farmacodinámicos.

Ejemplo 4

Un estudio farmacodinámico sobre el complejo en el modelo canino de insuficiencia cardíaca crónica, fracción de expulsión reducida

4.1 Métodos: Una vez que los animales llegaron a la instalación, estaban sometidos a alimentación adaptativa y fueron asignados aleatoriamente después de ecocardiografía y ECG, y después se inició el experimento. El día de la operación, se anestesió a los animales mediante inyección intramuscular de Zoletil (5 mg/kg). Se conectó la tráquea de los perros anestesiados al respirador, y después se les fijó en decúbito supino, se les abrió el tórax entre la tercera y cuarta costillas, se ligó la

arteria coronaria descendente anterior izquierda para cerrar la cavidad torácica, y después se suturó la piel. Después de que los animales se recuperaron durante 3 días después de la operación, se les administraron fármacos por sonda, una vez al día durante cuatro semanas consecutivas. Durante el experimento, se observaron las condiciones de vida de los animales todos los días y se registraron las condiciones anormales. Después de 42 días de administración, se realizó ecocardiografía.

4.2 Modelado: El día anterior a la operación, los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche. El día de la operación, se inyectó a los animales por vía intramuscular Zoletil (dosis: 5 mg/kg) para inducir la anestesia, y también se les administró por vía intramuscular una inyección de sulfato de atropina (dosis: 0.5 mg/perro). Después de anestesiar a los animales, se les afeitó el pelo del hemitórax izquierdo. La intubación traqueal se realizó rápidamente para conectarlos al respirador para proporcionarles respiración artificial y proporcionarles gas isoflurano al 1.5 % para mantener el estado de anestesia, y también se utilizó un monitor para controlar la saturación de oxígeno en sangre, frecuencia cardíaca, electrocardiograma, temperatura corporal y frecuencia respiratoria, etc. Después de desinfectar la piel de las extremidades anteriores con alcohol al 70 %, se hallaron las venas cefálicas para la intubación intravenosa y permanecieron intravenosamente como acceso de administración. Se utilizó yodóforo y alcohol al 70 % para esterilizar la piel del hemitórax izquierdo como tratamiento aséptico. Se extendió una gasa quirúrgica estéril con orificios. Se utilizó un bisturí estéril para cortar la piel a lo largo del cuarto y quinto espacio intercostal, y después de la hemostasia, se utilizó un bisturí eléctrico para abrir los tejidos subcutáneos capa por capa y capas musculares, y la hemorragia se detuvo de manera oportuna. La membrana pleural se abrió con cuidado para exponer los tejidos pulmonares, lo que evitó dañar los tejidos pulmonares; el campo de visión quirúrgico se expandió gradualmente de 20 a 25 cm a lo largo del borde inferior de la cuarta costilla y se utilizó un extensor de tórax para expandir el margen quirúrgico. Se utilizó una gasa estéril empapada en solución salina normal tibia para empujar y proteger los tejidos pulmonares. Se utilizó una gasa estéril empapada en solución salina normal tibia para empujar la orejuela izquierda y exponerla entre el ventrículo izquierdo y la aurícula izquierda, y se utilizó una pinza roma en ángulo recto para separar la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Se utilizó un hilo de seda núm. 4 para atravesar la arteria, y evitar tirar de la arteria durante la separación y el enhebrado. Se utilizó un hilo de seda para ligar la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Durante la ligadura, se observó de cerca a los animales para determinar la saturación de oxígeno en sangre, frecuencia cardíaca, electrocardiograma, temperatura corporal y frecuencia respiratoria. Si un animal presentara anomalías como fibrilación ventricular, la operación se detendría inmediatamente y la inyección de lidocaína (10 mg/kg) se administraría rápidamente a través de las venas cefálicas para el tratamiento. Después de que se confirmó que no había hemorragia en la cavidad torácica, se retiró la gasa protectora. Se utilizó una sutura núm. 7 para pasar a través de la cuarta y quinta costillas para suturar la cavidad torácica. Se utilizó el método de compresión manual para el reclutamiento pulmonar. El tejido y la piel se suturaron capa por capa. Después de la operación, se mantuvo calientes a los animales y se les repuso adecuadamente la solución salina fisiológica, y se observaron de cerca la saturación de oxígeno en sangre, la frecuencia

cardíaca, el electrocardiograma, la temperatura corporal y los cambios respiratorios; se apagó la máquina de anestesia con gas y se retiró la intubación traqueal hasta que los animales recuperaron completamente la respiración espontánea. Después de la operación, se les inyectó por vía intramuscular un analgésico (meloxicam, 0.67 mg/kg) para aliviar el dolor, y se les inyectó por vía intramuscular ampicilina sódica de 20 mg/kg para combatir la infección.

4.3 Grupos y administración: Antes de agruparlos, se realizó ecocardiografía y monitoreo ECG a cada perro. De acuerdo con la fracción de expulsión, los perros se asignaron aleatoriamente en 5 grupos (4-6 animales en cada grupo). Tres días después del modelado animal, los perros de cada grupo recibieron los fármacos correspondientes por sonda una vez al día durante 6 semanas. Todas las operaciones se realizaron en 6 lotes para el experimento, con 4-5 animales en cada lote y 0-1 animal en cada grupo. La información sobre cada grupo se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1, grupo núm.	Grupo	Número de animales	Dosis administrada	Frecuencia de administración	Duración
1	Grupo quirúrgico de referencia	4	-	por vía oral cada día	3 d después del modelado durante 6 semanas
2	Modelo	5	-	por vía oral cada día	3 d después del modelado durante 6 semanas
3	Fármaco positivo (LCZ696)	6	100 mg/kg	por vía oral cada día	3 d después del modelado durante 6 semanas
4	EXP3174 + mezcla física de sal cálcica de sacubitril	6	EXP3174 52 mpk+ Sacubitril 48 mpk	por vía oral cada día	3 d después del modelado durante 6 semanas
5	Complejo de la invención	6	100 mg/kg	por vía oral cada día	3 d después del modelado durante 6 semanas

Nota: Todas las dosis se administran con base en ácido libre anhidro y el compuesto obtenido en el Ejemplo 3 se utiliza como el complejo de la invención.

4.4 Resultados experimentales: Una manifestación importante de la insuficiencia cardíaca crónica es la reducción de la función sistólica del ventrículo izquierdo, que es el criterio de valoración principal para la detección clínica de la insuficiencia cardíaca crónica. La ecocardiografía mostró que la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (LVEF) se redujo significativamente (<40 %) en los perros del grupo

modelo después del modelado, con un valor de P menor que 0.001 en comparación con el grupo quirúrgico de referencia, que podría simular mejor la insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión clínica reducida. La Tabla 2 mostró que el criterio de valoración de LVEF de los perros fue del 46.45 % en el grupo LCZ696, que fue significativamente mayor que en el grupo modelo (P<0.001). La LVEF podría aumentarse tanto por el complejo de la invención como por la mezcla física, que fue estadísticamente significativa en comparación con la del grupo modelo (P<0.001). Además, los 100 mpk (mg/kg) del complejo de la invención y la dosis equimolar de LCZ696 tuvieron mejores efectos sobre la LVEF. Los detalles se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 2 Efectos de los compuestos sobre el criterio de valoración de la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo en perros con insuficiencia cardíaca (Media±DE)

Grupo	Número	LVEF (%)
Grupo quirúrgico de referencia	4	66.20±2.83
Modelo	5	35.82±2.02###
LCZ696, 100 mpk	6	46.45±3.39***
EXP3174 + mezcla física de sal cálcica de sacubitril	6	46.34±2.59***
Complejo de la invención, 100 mpk	6	51.87±1.01***@$

Entre ellos, el modelo de LVEF es del 35.82 % (<40 %), lo que indica que la fracción de expulsión se reduce y el modelado es exitoso, como se muestra en la Figura 1.

###P<0.001, en comparación con el grupo quirúrgico de referencia; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, en comparación con el grupo modelo; @ P<0.05, en comparación con la mezcla física; $P<0.05, en comparación con el grupo quirúrgico de referencia LCZ696.

Nota: El compuesto obtenido en el Ejemplo 3 se utiliza como complejo de la invención.

Se puede observar a partir de los resultados anteriores que los complejos supramoleculares con dobles efectos proporcionados por la invención se utilizan como medicamento para insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida, que tienen un efecto significativamente mejor a la misma dosis que 100 mpk de LCZ696 100 mpk;

El complejo de la invención tiene un mejor efecto que la mezcla física de EXP3174+AHU377, lo que demuestra completamente que el complejo tiene ventajas significativas sobre una combinación física de fármacos.

Ejemplo 5

Un estudio farmacodinámico sobre el complejo en el modelo canino de insuficiencia cardíaca crónica, fracción de expulsión conservada

5.1 Métodos: Una vez que los animales llegaron a la instalación, estaban sometidos a alimentación adaptativa y fueron asignados aleatoriamente después de ecocardiografía y ECG, y después se inició el experimento. El día de la operación, se anestesió a los animales mediante inyección

intramuscular de Zoletil (5 mg/kg). Se conectaron las tráqueas de los perros anestesiados al respirador, y después se les fijó en decúbito supino, se les abrió el tórax entre la tercera y cuarta costillas, se ligó la arteria coronaria descendente anterior izquierda para cerrar la cavidad torácica, y después se suturó la piel. Después de que los animales se recuperaron durante 3 días después de la operación, se les administraron fármacos por sonda, una vez al día durante dos semanas consecutivas. Durante el experimento, se observaron las condiciones de vida de los animales todos los días y se registraron las condiciones anormales. Después de 14 días de administración, se realizó una ecocardiografía.

5.2 Modelado: El día anterior a la operación, los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche. El día de la operación, se inyectó a los animales por vía intramuscular Zoletil (dosis: 5 mg/kg) para inducir la anestesia, y también se les administró por vía intramuscular una inyección de sulfato de atropina (dosis: 0.5 mg/perro). Después de anestesiar a los animales, se les afeitó el pelo del hemitórax izquierdo. La intubación traqueal se realizó rápidamente para conectarlos al respirador para proporcionarles respiración artificial y proporcionarles gas isoflurano al 1.5 % para mantener el estado de anestesia, y también se utilizó un monitor para controlar la saturación de oxígeno en sangre, frecuencia cardíaca, electrocardiograma, temperatura corporal y frecuencia respiratoria, etc. Después de desinfectar la piel de las extremidades anteriores con alcohol al 70 %, se hallaron las venas cefálicas para la intubación intravenosa y permanecieron intravenosamente como acceso de administración. Se utilizó yodóforo y alcohol al 70 % para esterilizar la piel del hemitórax izquierdo como tratamiento aséptico. Se extendió una gasa quirúrgica estéril con orificios. Se utilizó un bisturí estéril para cortar la piel a lo largo del cuarto y quinto espacio intercostal, y después de la hemostasia, se utilizó un bisturí eléctrico para abrir los tejidos subcutáneos capa por capa y capas musculares, y la hemorragia se detuvo de manera oportuna. La membrana pleural se abrió con cuidado para exponer los tejidos pulmonares, lo que evitó dañar los tejidos pulmonares; el campo de visión quirúrgico se expandió gradualmente a 20-25 cm a lo largo del borde inferior de la cuarta costilla y se utilizó un extensor de tórax para expandir el margen quirúrgico. Se utilizó una gasa estéril empapada en solución salina normal tibia para empujar y proteger los tejidos pulmonares. Se utilizó una gasa estéril empapada en solución salina normal tibia para empujar la orejuela izquierda y exponerla entre el ventrículo izquierdo y la aurícula izquierda, y se utilizó una pinza roma en ángulo recto para separar la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Se utilizó un hilo de seda núm. 4 para atravesar la arteria, y evitar tirar de la arteria durante la separación y el enhebrado. Se utilizó un hilo de seda para ligar la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Durante la ligadura, se observó de cerca a los animales para determinar la saturación de oxígeno en sangre, frecuencia cardíaca, electrocardiograma, temperatura corporal y frecuencia respiratoria. Si un animal presentara anomalías como fibrilación ventricular, la operación se detendría inmediatamente y la inyección de lidocaína (10 mg/kg) se administraría rápidamente a través de las venas cefálicas para el tratamiento. Después de que se confirmó que no había hemorragia en la cavidad torácica, se retiró la gasa protectora. Se utilizó una sutura núm. 7 para pasar a través de la cuarta y quinta costillas para suturar la cavidad torácica. Se utilizó el método de compresión manual para el reclutamiento pulmonar. El tejido y la piel se suturaron capa por

capa. Después de la operación, se mantuvo calientes a los animales y se les repuso adecuadamente la solución salina fisiológica, y se observaron de cerca la saturación de oxígeno en sangre, la frecuencia cardíaca, el electrocardiograma, la temperatura corporal y los cambios respiratorios; se apagó la máquina de anestesia con gas y se retiró la intubación traqueal hasta que los animales recuperaron completamente la respiración espontánea. Después de la operación, se les inyectó por vía intramuscular un analgésico (meloxicam, 0.67 mg/kg) para aliviar el dolor, y se les inyectó por vía intramuscular ampicilina sódica de 20 mg/kg para combatir la infección.

5.3 Grupos y administración: Antes de agruparlos, se realizó ecocardiografía y monitoreo ECG a cada perro. De acuerdo con la fracción de expulsión, los perros se asignaron aleatoriamente en 5 grupos (5-6 animales en cada grupo). Tres días después del modelado animal, los perros de cada grupo recibieron los fármacos correspondientes por sonda una vez al día durante 2 semanas. Todas las operaciones se realizaron en 6 lotes para el experimento, con 4-5 animales en cada lote y 0-1 animal en cada grupo. La información sobre cada grupo se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3, grupo núm.	Grupo	Número de animales	Dosis administrada	Frecuencia de administración	Duración
1	Grupo quirúrgico de referencia	5	-	por vía oral cada día	3 d después del modelado durante 2 semanas
2	Modelo	5	-	por vía oral cada día	3 d después del modelado durante 2 semanas
3	Fármaco positivo (LCZ696)	6	100 mpk	por vía oral cada día	3 d después del modelado durante 2 semanas
4	EXP3174 + mezcla física de sal cálcica de sacubitril	6	EXP3174 52 mpk + sacubitril 48 mpk	por vía oral cada día	3 d después del modelado durante 2 semanas
5	Complejo de la invención	6	100 mpk	por vía oral cada día	3 d después del modelado durante 2 semanas

Nota: Todas las dosis se administran con base en ácido libre anhidro y el compuesto obtenido en el Ejemplo 3 se utiliza como el complejo de la invención.

5.4 Resultados experimentales: Una manifestación importante de la insuficiencia cardíaca crónica es la reducción de la función sistólica del ventrículo izquierdo, que es el criterio de valoración principal para

la detección clínica de la insuficiencia cardíaca crónica. La ecocardiografía mostró que la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (LVEF) se redujo significativamente, pero incluso más del 50 %, en los perros del grupo modelo después del modelado, con un valor de P menor que 0.001 en comparación con el grupo quirúrgico de referencia, que podría simular mejor la insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión clínica conservada. La Tabla 4 mostró que el criterio de valoración de LVEF de los perros fue del 57.98 % en el grupo LCZ696, que fue significativamente mayor que en el grupo modelo (P<0.001). La LVEF podría aumentarse tanto por el complejo de la invención como por la mezcla física, que fue estadísticamente significativa en comparación con la del grupo modelo (P<0.05). Además, los 100 mg/kg del complejo de la invención y la dosis equimolar de LCZ696 tuvieron mejores efectos sobre la LVEF y efectos significativamente mejores que los del grupo de mezcla física. Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 Efectos de los compuestos sobre el criterio de valoración de la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo en perros con insuficiencia cardíaca

(Media±DE)

Grupo	Número	LVEF (%)
Grupo quirúrgico de referencia	4	68.15±1.89
Modelo	5	51.80±0.80###
LCZ696, 100 mpk	6	57.98±2.64***
EXP3174 + mezcla física de sal cálcica de sacubitril	6	55.18±2.96*
Complejo de la invención, 100 mpk	6	58.04±1.29***@

Entre ellos, el modelo de LVEF es del 51.80 % (≥50 %), lo que indica que la fracción de expulsión se conserva y el modelado es exitoso, como se muestra en la Figura 1.

###P<0.001, en comparación con el grupo quirúrgico de referencia; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, en comparación con el grupo modelo; @ P<0.05, en comparación con la mezcla física

Nota: El compuesto obtenido en el Ejemplo 3 se utiliza como complejo de la invención. Los resultados anteriores muestran que el complejo de la invención en un modelo canino con fracción de expulsión reducida tiene un efecto mejor que el de un modelo canino con fracción de expulsión conservada. Puede observarse que la composición farmacéutica de la invención tiene una selectividad específica para la insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida, lo que es difícil de predecir basándose en el estado de la técnica.

Los ejemplos mencionados anteriormente son las modalidades preferidas de la invención, pero las modalidades de la invención no están limitadas por las modalidades mencionadas anteriormente. Cualquier otro cambio, modificación, sustitución, combinación y simplificación que se realice sin apartarse del espíritu y principio de la invención serán métodos de sustitución equivalentes y estarán dentro del alcance abarcado por la invención.

Reivindicaciones

1. Un complejo de un metabolito antagonista del receptor de angiotensina II y un inhibidor de NEP en la preparación de un fármaco o medicamento para la insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida, en donde el complejo tiene las unidades estructurales siguientes:

(aEXP3174·bAHU377)·× Ca·nA

donde a:b=1:0.25-4; x es un valor entre 0.5 y 3; A se refiere a agua, metanol, etanol, 2-propanol, acetona, acetato de etilo, metil-tert-butil éter, acetonitrilo, tolueno y diclorometano; y n es un valor entre 0 y 3.

2. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que una forma de dosis única del medicamento contiene de 60 mg a 500 mg del complejo.

3. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que una forma de dosis única del medicamento contiene 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 mg del complejo.

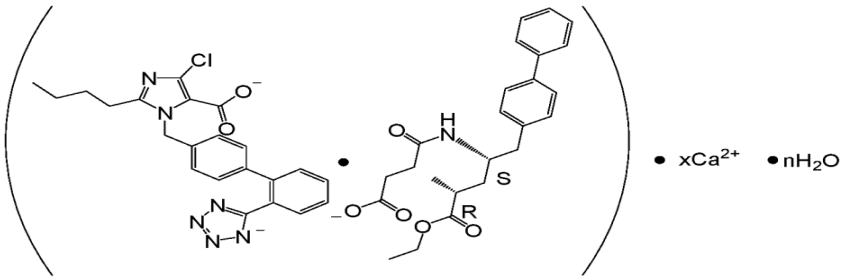
4. El complejo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el medicamento es una preparación sólida para administración oral, preferentemente un comprimido o cápsula oral.

5. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el valor de a:b se selecciona de 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5 y 1:4.

6. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que tiene las unidades estructurales siguientes:

(EXP3174·AHU377)·× Ca·nH_2O

o



donde x es un valor entre 0.5 y 2; y n es un valor entre 0 y 3.

7. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que x se selecciona de 0.5, 1, 1.5 y 2.

8. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por tiene las unidades estructurales siguientes:

(EXP3174•AHU377) • 1.5Ca•nH_2O

o

(EXP3174•AHU377) • 2Ca•nH_2O

donde n es cualquier valor entre 1 y 3.

9. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que n se selecciona de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3.

10. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el

complejo se selecciona de:

（EXP3174 • AHU377）• 1.5Ca • 1H_2O；
（EXP3174 • AHU377）• 1.5Ca • 1.5H_2O；
（EXP3174 • AHU377）• 1.5Ca • 2H_2O；
（EXP3174 • AHU377）• 1.5Ca • 2.5H_2O；
（EXP3174 • AHU377）• 1.5Ca • 3H_2O；
（EXP3174 • AHU377）• 2Ca • 1H_2O；
（EXP3174 • AHU377）• 2Ca • 1.5H_2O；
（EXP3174 • AHU377）• 2Ca • 2H_2O；
（EXP3174 • AHU377）• 2Ca • 2.5H_2O；
（EXP3174 • AHU377）• 2Ca • 3H_2O。

Resumen

Un complejo de un metabolito antagonista del receptor de angiotensina II y un inhibidor de NEP para la insuficiencia cardíaca, se relacionan específicamente los complejos en la preparación de un medicamento para la insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida (HFrEF).

Tabla 1 Clasificación y criterios diagnósticos de insuficiencia cardíaca

Criterios diagnósticos	HFrEF	HFmrEF	HFpEF
1	Síntomas y/o signos	Síntomas y/o signos	Síntomas y/o signos
2	LVEF<40 %	LVEF 40 %-49 %	LVEF≥50 %
3		Péptido natriurético elevado y que cumple con al menos uno de los siguientes: (I) hipertrofia del ventrículo izquierdo y/o crecimiento de la aurícula izquierda, (2) función diastólica anormal	Péptido natriurético elevado y que cumple con al menos uno de los siguientes: (I) hipertrofia del ventrículo izquierdo y/o crecimiento de la aurícula izquierda, (2) función diastólica anormal
Observaciones	Los ensayos clínicos aleatorizados incluyen principalmente a tales pacientes y se han confirmado tratamientos eficaces.	Las características clínicas, la fisiopatología, el tratamiento y el pronóstico de tales pacientes siguen sin estar claros. El listado de este grupo por separado facilitará el desarrolllo de estudios relacionados.	Es necesario excluir los síntomas del paciente que sean causados por enfermedades que no son cardíacas. El tratamiento eficaz sigue sin estar claro.

Nota: HFrEF es insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida, HFmrEF es insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión de rango medio, HFpEF es insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión conservada y LVEF es la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo; péptido natriurético elevado se define como un péptido natriurético de tipo B (BNP)> 35 ng/l y/o péptido natriurético de tipo pro-B N-terminal (NT-proBNP) >125 ng/l; para conocer las medidas de función diastólica anormal, consulte la sección Ecocardiograma transtorácico sobre el diagnóstico y la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

Figura 1