

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910203885.4

[51] Int. Cl.

C07D 223/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 1 月 13 日

[11] 公开号 CN 101624372A

[22] 申请日 2001.11.2

[21] 申请号 200910203885.4

分案原申请号 01818996.2

[30] 优先权

[32] 2000.11.17 [33] US [31] 60/249656

[71] 申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72] 发明人 T·M·柯尼 J·E·奥迪亚

D·米切尔 S·L·麦克丹尼尔

L·A·布茨利 G·L·恩格尔

J·A·埃金斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 段晓玲 付磊

权利要求书 1 页 说明书 40 页

[54] 发明名称

内酰胺化合物

[57] 摘要

本发明涉及内酰胺化合物, 尤其提供了(N) - ((S) - 2 - 羟基 - 3 - 甲基 - 丁酰基) - 1 - (L - 丙氨酰基) - (S) - 1 - 氨基 - 3 - 甲基 - 2, 3, 4, 5 - 四氢 - 1H - 3 - 苯并氮杂草 - 2 - 酮, 其使用方法以及制备所述化合物的方法。

1. (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮。

内酰胺化合物

本申请是申请号为01818996.2、申请日为2001年11月02日、最早优先权日为2000年11月17日的标题为“内酰胺化合物”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

本发明涉及药物和有机化学领域，并涉及抑制 β -淀粉状蛋白肽 (β -amyloid peptide) 释放和/或其合成的化合物。

发明背景

PCT 申请 PCT/US97/22986 中描述了一些内酰胺化合物，这些化合物可抑制 β -淀粉状蛋白肽释放和/或其合成，并因此可用于治疗阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)。

本发明提供了新的结晶 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物、其组合物、使用该结晶二水合物的方法、制备该结晶二水合物的方法以及制备其中间体的方法。本发明结晶二水合物可用于抑制 β -淀粉状蛋白肽释放和/或其合成，并因此可用于治疗阿尔茨海默氏病。

因为 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮可用于治疗阿尔茨海默氏病，所以需要以纯的、稳定的结晶形式制得该化合物以满足严格的药物要求和规范。本发明新的结晶二水合物具有适于方便地以商业规模配制例如口服片剂的性质。

制备 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮的方法也需要是便于以工业规模操作的方法。此外，产物应当呈易于过滤、易于干燥和便于贮存的形式。此外，本发明结晶二水合物具有合适的加工和贮存性质。

已经发现，(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮可以以具有有利性质的二水合物形式制得，并且该新形式的制备方法实现了上述所需特征。

发明概述

本发明提供了(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物。

在另一个实施方案中,本发明提供了药物组合物,其中包含(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物和可药用稀释剂。

在一个本发明方法方面中,本发明涉及抑制 β -淀粉状蛋白肽释放和/或其合成的方法,包括给有此需要的患者施用有效量的(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物。在一个特别的方法实施方案中,本发明提供了治疗阿尔茨海默氏病的方法,包括给有此需要的患者施用有效量的(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物。本发明还提供了预防或抑制阿尔茨海默氏病进行的方法,包括给有此需要的患者施用有效量的(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物。

也就是说,本发明提供了(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物在制备用于抑制 β -淀粉状蛋白肽释放和/或其合成,包括用于治疗阿尔茨海默氏病的药物中的应用。

在另一个实施方案中,本发明提供了制备(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物的方法。

在另一个实施方案中,本发明提供了制备内酰胺化合物,包括(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮的方法以及制备其中间体的方法。

发明详述

本文所用术语具有下述含义:

适于“ee”或“对映体过量”是指一种对映体 E_1 在两种对映体的混合物 ($E_1 + E_2$) 中的过量百分比,并且是通过公式 $((E_1 - E_2) \div (E_1 + E_2)) \times 100\% = ee$ 计算的。如本领域众所周知的,对映体过量可通过化合物或其衍生物的毛细管电泳和手性 HPLC 来测定。

在本文中,使用关于甘油醛的异构体立体化学的 (R)-和 (S)-的 Cahn-Prelog-Ingold 命名和 L-和 D-命名来描述具体异构体。

本发明提供了 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物,特别是结晶 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物。

可采用多种方法来确定结晶形式的有机化合物的特征。例如,这些方法包括差示扫描量热法、固态 NMR 光谱测定法、红外光谱法和 X-射线粉末衍射。在这些方法当中,X-射线粉末衍射和固态 NMR 光谱法在鉴定和区别晶形方面非常有用。

X-射线粉末衍射分析是如下所述进行的。用玛瑙研钵和研杵将样本轻微研磨或不研磨,将样本装载到用于 X-射线粉末衍射测定的样本固定器上。X-射线粉末衍射图样是用装配有 $\text{CuK}\alpha$ 源 ($\lambda = 1.54056\text{\AA}$) 的 Siemens D5000 X-射线粉末衍射仪测定的,其中该衍射仪在 50 kV 和 40 mA 运转,并且使用 1 mm 的发散狭缝尺寸、1 mm 的接收狭缝和 0.1 mm 的检测器狭缝。每个样本以 0.02° 的步长和 3 秒/步的最大扫描速度在 $4^\circ - 35^\circ$ (2θ) 之间扫描。使用 Kevex 固态硅锂检测器收集数据。最理想地,常规运行硅标准物来检查该装置准线。

晶体学领域众所周知的是,对于给定晶形,衍射峰的相对强度和峰宽可能会由于多种因素,包括择优取向和/或粒径效应而变化。当存在择优取向和/或粒径效应时,峰强度可能会改变,但是多晶型物的特征峰位置不变。参见例如 The United States Pharmacopoeia #24, National Formulary # 19, p.1843-1844, 2000。

使用研磨来将本文公开的某些衍射图的峰强度的强度差异减到最少。然而,如果研磨显著改变衍射图或改变样本的晶态,则应当使用未研磨样本的衍射图。研磨用小的玛瑙研钵和研杵。在研磨期间,将玛瑙研钵固定,并给研杵施加轻微压力。

峰位置是以 2θ 值获得的, 并且对于大多数显著特征(大于 20% 的相对强度), 峰强度是用双衍射峰挑选法测定的。

因此, 本发明涉及结晶 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物, 其特征在于表 1 所示的 X-射线粉末衍射图样, 表 1 列出了 2θ 值和大于 20% 的相对强度 (I_0/I_{100}), 其中测定的是未研磨样本以及研磨 5 和 10 分钟后的样本, 并且是使用上述方法和 $\text{CuK}\alpha$ 照射测定的。

表 1

未研磨		研磨5分钟		研磨10分钟	
2θ ($^\circ$)	I_0/I_{100} (%)	2θ ($^\circ$)	I_0/I_{100} (%)	2θ ($^\circ$)	I_0/I_{100} (%)
8.361	100	8.349	87.6	8.367	88.7
12.433	51.4	12.429	78.5	12.424	91.6
		13.24	27.9	13.254	30.4
15.344	49.8	15.336	100	15.352	100
		16.858	28.5	16.88	28.3
19.224	27.9	19.233	47.8	19.24	52
20.495	27.5	20.48	44.4		
20.63	38.8	20.644	43	20.601	48.9
		22.254	19.5	22.045	21.6
		22.63	27.6	22.654	34.9
		24.388	26.4	23.388	19.7
				24.387	28.2
				27.744	19
				22.237	21.2

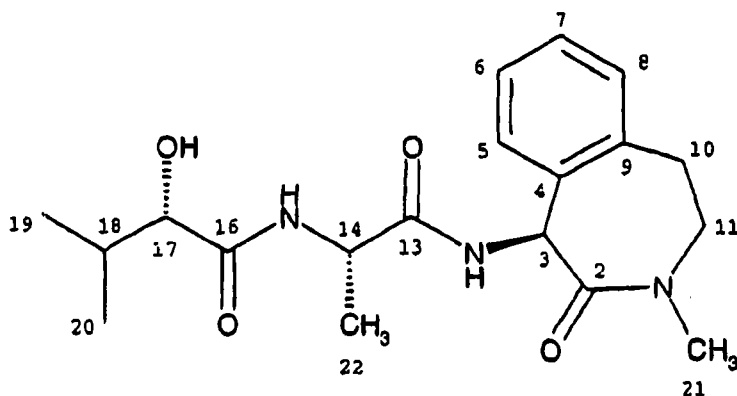
为了将择优取向和/或粒径效应减至最小, 研磨 5 和 10 分钟的样本的强度更代表衍射图样。还应当注意, 该表中列出的是计算机生成的、未舍入的数字。

因此, 适当制得的结晶 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物的特征可在于: 使用 $\text{CuK}\alpha$ 照射的以 2θ 值表示的 X-射线衍射图样具有在表 1 中所述的峰, 特别具有在 8.36、12.43、15.34、19.22、20.50 或 20.63 的峰; 更特别具有在 8.36、12.43 或 15.34 的峰; 在 8.36 和 12.43; 8.36 和 15.34; 8.36、12.43 和 15.34; 或者在 8.36、12.43、15.34、19.22、20.50 和 20.63 的峰。

结晶 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物还可以通过固态 NMR 光谱法来确定特征。固态 ^{13}C 化学位移不仅反映了晶体中分子的分子结构, 还反映了晶体中分子的电子环境。

固态 NMR (^{13}C) 分析可使用 ^{13}C 交叉极化/幻角自旋 (CP/MAS) 来进行。NMR (固态 NMR 或 SSNMR) 光谱是用在 100.580 MHz 碳频运转的、装配有全固体辅助部件和 Varian 7 mm VT CP/MAS 探针的 Varian Unity 400 MHz 光谱仪获得的。获得参数如下: 90° 质子 r.f. 脉冲宽度 $4.0\ \mu\text{s}$, 接触时间 1.0 ms, 脉冲重复时间 5 s, MAS 频率 7.0 kHz, 谱宽 50 kHz, 和取数时间 50 ms。化学位移是相对于外标六甲基苯的甲基 ($\delta = 17.3\ \text{ppm}$) 而言的, 也就是用六甲基苯置换样本。

(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物的化学位移数据(根据下述峰分配)如表 2 所示。



位点	在DMSO中的溶液	二水合物(固体)
2, 13, 16	169.27, 171.73, 172.89	169.9*, 174.1*, 176.7*
3, 11, 14	51.45, 47.05, 47.72	46.9, 51.3
4	134.14	134.8*
5, 6	124.18, 125.99	124.0
7	127.19	127.9, 128.9
8	130.38	132.1
9	135.32	136.9*
10, 18	30.73, 31.29	31.1
17	75.01	75.6
19, 20, 22	15.99, 18.66, 19.13	16.6*, 21.4*
21	34.18	35.3*

星号(*)是指在中断的去耦光谱中显示的峰。

因此, 结晶 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物的特征可在于具有下列化学位移 (ppm) 的固态 ^{13}C 核磁共振: 16.6; 176.7、174.1、169.9、136.9、134.8、132.1、127.9、128.9、124.0、

75.6、51.3、46.9、35.3、31.1、21.4或16.6；更特别是75.6、35.3、21.4或16.6；75.6、35.3、21.4和16.6当中的任何两个；75.6、35.3、21.4和16.6；或176.7、174.1、169.9、136.9、134.8、132.1、127.9、128.9、124.0、75.6、51.3、46.9、35.3、31.1、21.4和16.6。

本发明另一个实施方案提供了制备(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物的方法，包括将(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮从含水溶剂中在生成(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物的条件下结晶。

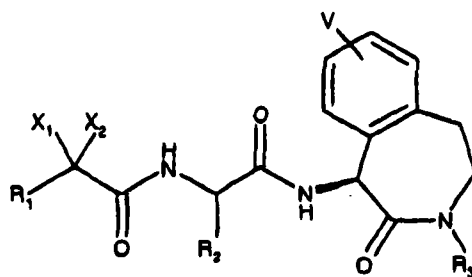
形成(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物的精确条件可凭经验确定，并且仅可能给出已发现在实践中合适的多种方法。

因此，例如(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物可通过在控制的条件下结晶来制得。从溶液中结晶和浆化技术在本发明范围内。特别是，本发明二水合物可通过从含水溶剂中结晶来制得。合适的溶剂是能够在所用浓度下含有足够的水以形成本发明二水合物的溶剂。优选的溶剂是可与水混溶的溶剂，例如丙酮、低级醇（例如甲醇、乙醇和异丙醇）、乙酸和乙腈。在实践中已经发现，含水丙酮是优选的。对于给定的含水溶剂，所用的水的量取决于与在水中相比(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮在溶剂中的相对溶解度以及采用的是结晶技术还是浆化技术。

结晶一般是这样进行的：将(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮溶解在含水溶剂中，然后将该溶液冷却，再加入或不再加入水，以生成固体。结晶一般是在约40℃至所选含水溶剂的回流温度的初始温度下进行。然后将该混合物冷却以生成结晶二水合物。有利起见可加入晶种。优选将结晶溶液缓慢地冷却。最适宜的是，将结晶混合物冷却至环境温度-约-20℃的温度。

在另一个实施方案中，本发明提供了制备内酰胺化合物，包括(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮的方法以及制备其中间体的方法。

更具体来说，在一个方法实施方案中，本发明提供了制备式 I 内酰胺化合物的方法



式 I

其中

R_1 是烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、取代的烷基、取代的链烯基、取代的炔基、取代的环烷基、取代的环烯基、芳基、杂芳基和杂环基；

R_2 是烷基、取代的烷基、链烯基、取代的链烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基；

R_3 是烷基，

X_1 是氢、羟基或氟，

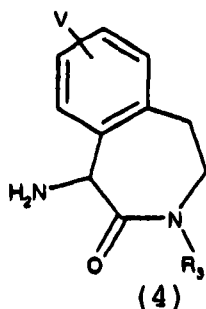
X_2 是氢、羟基或氟，或者

X_1 和 X_2 一起形成氧代基；且

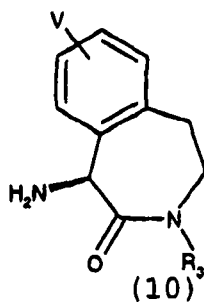
V 是独立地选自下列的 1-3 个基团：氢、羟基、酰基、酰氧基、烷基、取代的烷基、烷氧基、取代的烷氧基、链烯基、取代的链烯基、炔基、取代的炔基、氨基、氨基酰基、烷芳基、芳基、芳氧基、羧基、羧基烷基、氰基、卤素、硝基、杂芳基、硫代烷氧基 (thioalkoxy)、取代的硫代烷氧基和三卤代甲基；

包括：

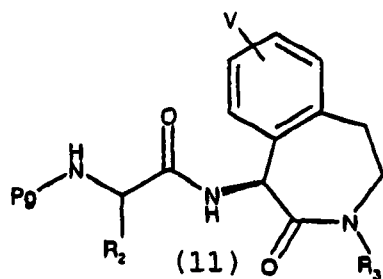
(a1) 通过其分级结晶来拆分式 (4) 内酰胺



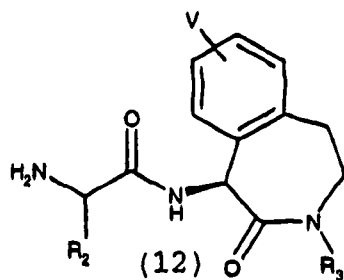
其中 R_3 和 V 的定义同式 I 化合物所述，
其分级结晶是通过将其二苯甲酰基酒石酸盐 (dibenzolytartarates)、
(R)-(-)-10-樟脑磺酸盐和 (D)-(-)-扁桃酸盐分级结晶来进行的，
以获得式 (10) 化合物；



(b) 与式 $PgNH-CHR_2-C(O)-A$ 所示适当的氨基保护的氨基酸偶联，
其中 R_2 的定义同式 I 化合物所述， A 是活化基团例如 $-OH$ 、 $-Br$ 或 $-Cl$ ，
且 Pg 是氨基保护基，
以生成式 (11) 化合物；



(c) 将式 (11) 化合物脱保护，以生成式 (12) 化合物；和



(d) 将式(12)化合物与式 $R_1CX_1X_2-C(O)A_1$ 适当化合物偶联, 其中 R_1 、 X_1 和 X_2 的定义同式 I 化合物, 且 A_1 是活化基团例如 -OH、-Br 或 -Cl; 或者

(a2) 将式(10)化合物与式 $R_1CX_1X_2-C(O)NH-CHR_2-C(O)-A$ 化合物偶联, 其中 R_1 、 R_2 、 X_1 和 X_2 的定义同式 I 化合物, 且 A 是活化基团例如 -OH、-Br 或 -Cl。

本文所用的下列术语具有下述含义:

“烷基”是指优选具有 1-10 个碳原子的、更优选具有 1-6 个碳原子的一价烷基。该术语的实例有甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、正己基等。

术语“ C_1 - C_4 烷基”是指优选具有 1-4 个碳原子的一价烷基。该术语的实例有甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。

“取代的烷基”是指具有 1-5 个、优选 1-3 个选自下列的取代基的优选具有 1-10 个碳原子的烷基: 烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氰基、卤素、羟基、羧基、酮基、硫代酮基、羧基烷基、巯基(thiol)、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、杂环基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-取代的烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-杂芳基、一烷基氨基、二烷基氨基、一(取代的烷基)氨基、二(取代的烷基)氨基、一芳基氨基、二芳基氨基、一杂芳基氨基、二杂芳基氨基、一杂环基氨基、二杂环基氨基, 和具有选自下列的不同取代基的不对称二取代的胺: 烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基和杂环基。

“亚烷基”是指优选具有 1-10 个碳原子、更优选具有 1-6 个碳

原子的二价亚烷基。该术语的实例有亚甲基($-\text{CH}_2-$)、亚乙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、亚丙基异构体(例如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$)等。

“取代的亚烷基”是指具有1-3个选自下列的取代基的优选具有1-10个碳原子的亚烷基：烷氧基、取代的烷氧基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氰基、卤素、羟基、羧基、酮基、硫代酮基、羧基烷基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、杂芳基、杂环基、硝基、一烷基氨基、二烷基氨基、一(取代的烷基)氨基、二(取代的烷基)氨基、一芳基氨基、二芳基氨基、一杂芳基氨基、二杂芳基氨基、一杂环基氨基、二杂环基氨基，和具有选自下列的不同取代基的不对称二取代的胺：烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基和杂环基。此外，这样的取代的亚烷基包括其中亚烷基上的2个取代基稠合以形成与该亚烷基稠合的一个或多个环烷基、芳基、杂环基或杂芳基的那些。这样的稠合的环烷基优选含有1-3个稠合的环结构。

“亚链烯基”是指优选具有2-10个碳原子、更优选具有2-6个碳原子的二价亚链烯基。该术语的实例有亚乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}-$)、亚丙烯基异构体(例如 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ 和 $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-$)等。

“取代的亚链烯基”是指具有1-3个选自下列的取代基的优选具有2-10个碳原子的亚链烯基：烷氧基、取代的烷氧基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氰基、卤素、羟基、羧基、酮基、硫代酮基、羧基烷基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、杂芳基、杂环基、硝基、一烷基氨基、二烷基氨基、一(取代的烷基)氨基、二(取代的烷基)氨基、一芳基氨基、二芳基氨基、一杂芳基氨基、二杂芳基氨基、一杂环基氨基、二杂环基氨基，和具有选自下列的不同取代基的不对称二取代的胺：烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基和杂环基。此外，这样的取代的亚烷基包括其中亚烷基上的2个取代基稠合以形成与该亚烷基稠合的一个或多个环烷基、芳基、杂环基或杂芳基的那些。

“烷芳基”是指在亚烷基部分中优选具有1-8个碳原子、并且在芳基部分中优选具有6-10个碳原子的-亚烷基-芳基。这样的烷芳基的实例有苄基、苄乙基等。

“烷氧基”是指基团“烷基-O-”。优选的烷氧基包括例如甲氧基、

乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、正戊氧基、正己氧基、1,2-二甲基丁氧基等。

“取代的烷氧基是指基团“取代的烷基-O-”，其中取代的烷基如上所定义。

“烷基烷氧基”是指基团“-亚烷基-O-烷基”，其包括例如亚甲基甲氧基($-\text{CH}_2\text{OCH}_3$)、亚乙基甲氧基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$)、亚正丙基异丙氧基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$)、亚甲基叔丁氧基($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$)等。

“烷基硫代烷氧基”是指基团“-亚烷基-S-烷基”，其包括例如亚甲基硫代甲氧基($-\text{CH}_2\text{SCH}_3$)、亚乙基硫代甲氧基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$)、亚正丙基硫代异丙氧基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}(\text{CH}_3)_2$)、亚甲基硫代叔丁氧基($-\text{CH}_2-\text{SC}(\text{CH}_3)_3$)等。

“链烯基”是指优选具有2-10个碳原子、更优选具有2-6个碳原子，并具有至少一个、优选1-2个烯基不饱和部位的链烯基。优选的链烯基包括乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、正丙烯基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、异丙烯基($-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$)等。

“取代的链烯基”是指具有1-3个选自下列的取代基的如上所定义的链烯基：烷氧基、取代的烷氧基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氰基、卤素、羟基、羧基、酮基、硫代酮基、羧基烷基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、杂芳基、杂环基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-取代的烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-杂芳基、一烷基氨基、二烷基氨基、一(取代的烷基)氨基、二(取代的烷基)氨基、一芳基氨基、二芳基氨基、一杂芳基氨基、二杂芳基氨基、一杂环基氨基、二杂环基氨基，和具有选自下列的不同取代基的不对称二取代的胺：烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基和杂环基。

“炔基”是指优选具有2-10个碳原子、更优选具有2-6个碳原子，并具有至少一个、优选1-2个炔基不饱和部位的炔基。优选的炔基包括乙炔基($-\text{CH}\equiv\text{CH}_2$)、炔丙基($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$)等。

“取代的炔基”是指具有1-3个选自下列的取代基的如上所定义的炔基：烷氧基、取代的烷氧基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氰基、卤素、羟基、羧基、酮基、硫代酮基、羧基烷基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、杂芳基、

杂环基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-取代的烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-杂芳基、一烷基氨基、二烷基氨基、一(取代的烷基)氨基、二(取代的烷基)氨基、一芳基氨基、二芳基氨基、一杂芳基氨基、二杂芳基氨基、一杂环基氨基、二杂环基氨基，和具有选自下列的不同取代基的不对称二取代的胺：烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基和杂环基。

“酰基”是指基团烷基-C(0)-、取代的烷基-C(0)-、环烷基-C(0)-、取代的环烷基-C(0)-、芳基-C(0)-、杂芳基-C(0)-和杂环基-C(0)-，其中烷基、取代的烷基、环烷基、取代的环烷基、芳基、杂芳基和杂环基如本文所定义。

“酰基氨基”是指基团-C(0)NRR，其中每个R独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基或杂环基，其中烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基或杂环基如本文所定义。

“氨基酰基”是指基团-NRC(0)R，其中每个R独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基或杂环基，其中烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基或杂环基如本文所定义。

“氨基酰氧基”是指基团-NRC(0)OR，其中每个R独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基或杂环基，其中烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基或杂环基如本文所定义。

“酰氧基”是指基团烷基-C(0)O-、取代的烷基-C(0)O-、环烷基-C(0)O-、芳基-C(0)O-、杂芳基-C(0)O-和杂环基-C(0)O-，其中烷基、取代的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基如本文所定义。

“芳基”是指具有6-14个碳原子的不饱和芳族碳环基，其具有一个环(例如苯基)或多个缩合(稠合)环(例如萘基或蒽基)。优选的芳基包括苯基、萘基等。

除非对芳基取代基的定义另有限制，否则这样的芳基可任选被1-5个选自酰氧基的取代基、1-5个(优选1-3个)选自下列的取代基取代：羟基、酰基、烷基、烷氧基、链烯基、炔基、取代的烷基、取代的烷氧基、取代的链烯基、取代的炔基、氨基、氨基酰基、酰基氨基、烷芳基、芳基、芳氧基、叠氮基、羧基、羧基烷基、氰基、卤素、硝基、杂芳基、杂环基、氨基酰氧基、氧基酰基氨基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、-SO-烷基、-SO-取

代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-取代的烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-杂芳基、三卤代甲基、一烷基氨基、二烷基氨基、一(取代的烷基)氨基、二(取代的烷基)氨基、一芳基氨基、二芳基氨基、一杂芳基氨基、二杂芳基氨基、一杂环基氨基、二杂环基氨基,和具有选自下列的不同取代基的不对称二取代的胺:烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基和杂环基等。优选的取代基包括烷基、烷氧基、卤素、氰基、硝基、三卤代甲基和硫代烷氧基。

“芳氧基”是指基团芳基-O-,其中芳基如上所定义,并包括如上所定义的任选被取代的芳基。

“羧基烷基”是指基团“-C(O)O 烷基”,其中烷基如上所定义。

“环烷基”是指具有 3-12 个碳原子的环状烷基,其具有一个环或多个稠合环,包括稠合的、桥连的和螺合的二环或多环化合物。这样的环烷基包括例如单环结构如环丙基、环丁基、环戊基、环辛基等,或多环结构例如金刚烷基等。

“取代的环烷基”是指具有 1-5 个(优选 1-3 个)选自下列的取代基的环烷基:羟基、酰基、酰氧基、烷基、取代的烷基、烷氧基、取代的烷氧基、链烯基、取代的链烯基、炔基、取代的炔基、氨基、氨基酰基、烷芳基、芳基、芳氧基、酮基、硫代酮基、羧基、羧基烷基、氰基、卤素、硝基、杂芳基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、三卤代甲基等。

“环烯基”是指具有一个单环和至少一个内不饱和位点的 4-8 个碳原子的环状烯基。合适的环烯基的实例包括例如环丁-2-烯基、环戊-3-烯基、环辛-3-烯基等。

“取代的环烯基”是指具有 1-5 个选自下列的取代基的环烯基:羟基、酰基、酰氧基、烷基、取代的烷基、烷氧基、取代的烷氧基、链烯基、取代的链烯基、炔基、取代的炔基、氨基、氨基酰基、烷芳基、芳基、芳氧基、羧基、酮基、硫代酮基、羧基烷基、氰基、卤素、硝基、杂芳基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、三卤代甲基等。

“卤素”是指氟、氯、溴和碘,优选为氟或氯。

“杂芳基”是指具有 1-15 个碳原子和在至少一个环(如果有一个以上的环)内具有 1-4 个选自氧、氮和硫的杂原子的芳族碳环基。

除非对杂芳基取代基的定义另有限制,否则这样的杂芳基可任选

被 1-5 个选自下列的取代基取代：烷基、取代的烷基、烷氧基、取代的烷氧基、芳基、芳氧基、卤素、硝基、杂芳基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、硫代芳氧基、三卤代甲基等。这样的杂芳基可具有一个单环（例如吡啶基或呋喃基）或多个稠合环（例如中氮茛基或苯并噻吩基），包括稠合的、桥连的和螺合的二环或多环化合物。优选的杂芳基包括吡啶基、吡咯基和呋喃基。

“杂环”或“杂环基”是指具有单环或多个稠合环，包括稠合的、桥连的和螺合的二环或多环化合物，在环内具有 1-15 个碳原子和 1-4 个选自氮、硫或氧的杂原子的一价饱和或不饱和基团。

除非对杂环取代基的定义另有限制，否则这样的杂环基可任选被 1-5 个选自下列的取代基取代：烷基、取代的烷基、烷氧基、取代的烷氧基、芳基、芳氧基、卤素、硝基、杂芳基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、硫代芳氧基、三卤代甲基等。这样的杂环基可具有一个环或多个稠合环。优选的杂环基包括吗啉代、哌啶基等。

含氮杂环和杂芳基的实例包括但不限于吡咯、咪唑、吡唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪、中氮茛、异吲哚、吲哚、吲唑、嘌呤、喹啉、异喹啉、喹啉、酞嗪、萘基吡啶、喹喔啉、喹唑啉、噌啉、蝶啶、卞唑、卞啉、菲啶、吡啶、菲咯啉、异噻唑、吩嗪、异噻唑、吩噻嗪、吩噻嗪、咪唑烷、咪唑啉、哌啶、哌嗪、二氢吲哚、吗啉代、哌啶基、四氢呋喃基等，以及 N-烷氧基含氮杂环。

“氧基酰基氨基”是指基团 $-OC(O)NRR$ ，其中每个 R 独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基或杂环基，其中烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基或杂环基如本文所定义。

“巯基”是指基团 $-SH$ 。

“硫代烷氧基”是指基团 $-S-$ 烷基。

“取代的硫代烷氧基”是指基团 $-S-$ 取代的烷基。

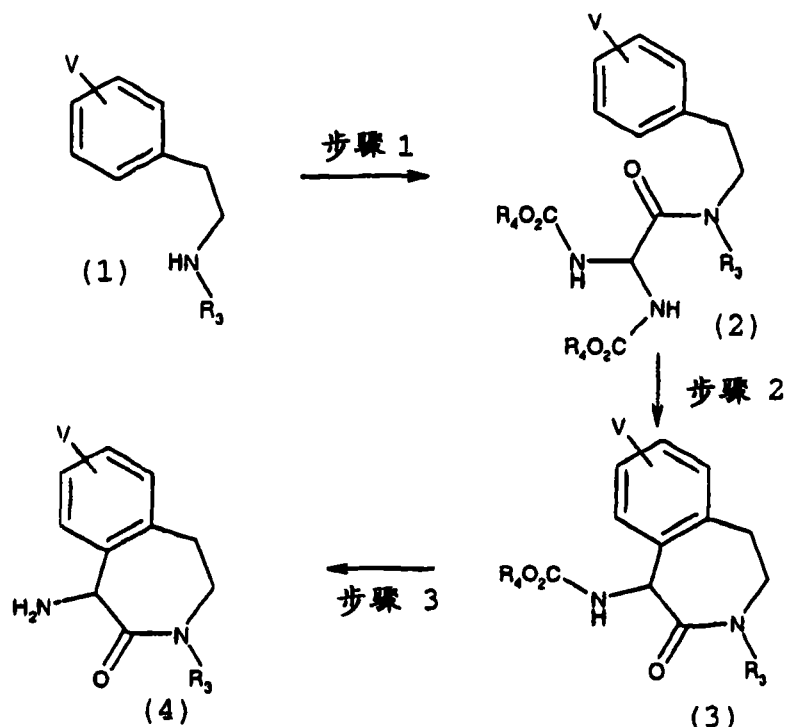
“硫代芳氧基”是指基团芳基 $-S-$ ，其中芳基如上所定义，并包括如上所定义的任选被取代的芳基。

“杂芳氧基”是指基团杂芳基 $-O-$ ，其中杂芳基如上所定义，并包括如上所定义的任选被取代的杂芳基。

在特别的方法实施方案中，本发明提供了如反应方案 1 和 2 所述的制备式 (4) 化合物的方法。在下述反应方案中，除非另有说明，否则

所有取代基都如前所定义，并且所有试剂都是本领域众所周知且理解的。

反应方案 1



在反应方案 1 步骤 1 中，用合适的二烷氧基羰基乙酸酯转移试剂将适当的式 (1) N-烷基苯乙基胺酰化，以生成式 (2) 化合物。合适的式 (1) N-烷基苯乙基胺是其中 V 和 R₃ 是式 I 终产物中所需基团的化合物。这样的 N-烷基苯乙基胺可通过在本领域技术人员众所周知且理解的条件下将 2-溴或 2-氯乙基苯与式 H₂N-R₃ 胺反应来容易地制得。合适的二烷氧基羰基乙酸酯转移试剂是其中 R₄ 是 C₁-C₄ 烷基，且将二烷氧基羰基乙酰基转移到式 (1) 化合物上的试剂，例如二烷氧基羰基乙酸和二烷氧基羰基乙酰氯 (参见 Ben-Ishai, Tetrahedron, 43, 439-450 (1987))。

例如，将适当的式 (1) N-烷基苯乙基胺与合适的二烷氧基羰基乙酸接触以生成式 (2) 化合物。这样的偶联反应是肽合成中的常规反应，并且可采用其中所使用的合成方法。例如，可使用众所周知的偶联试剂例如碳二亚胺来促进该酰化，同时使用或不使用众所周知的添加剂例如 N-羟基琥珀酰亚胺、1-羟基苯并三唑等。这样的偶联反应经常使用合适的碱来清除在反应期间产生的酸。合适的碱包括例如三乙胺、N,N-二异丙基乙胺、N-甲基吗啉等。该反应通常在惰性非质子极性稀

释剂例如二甲基甲酰胺、二氯甲烷、氯仿、乙腈、四氢呋喃中进行。该反应通常在约 0℃ - 约 60℃ 的温度下进行，并且一般需要约 1 - 约 24 小时。反应完成后，通过常规方法，包括萃取、沉淀、色谱法、过滤、研制、结晶等收集式(2)产物。

或者，例如，将适当的式(1) N-烷基苯乙基胺与合适的二烷氧基羰基乙酰氯接触，以生成式(2)化合物。这样的酰氯可通过本领域众所周知的方法由相应的酸制得，例如通过三氯化磷、三氯氧化磷、五氯化磷、亚硫酸氯或草酰氯的作用，使用或不使用少量二甲基甲酰胺，在惰性溶剂例如甲苯、二氯甲烷或氯仿中；于约 0 - 80℃ 的温度下进行所述反应。该反应通常进行 1 小时 - 24 小时。可将酰氯分离和纯化，或者其经常可以直接使用，也就是说，进行或不进行分离和/或纯化。这样的酰化反应通常使用合适的碱来清除在反应期间产生的酸。合适的碱包括例如吡啶、三乙胺、N,N-二异丙基乙胺、N-甲基吗啉等。该反应通常在惰性非质子极性稀释剂例如二氯甲烷、氯仿、四氢呋喃等进行。该反应通常在约 -20℃ - 约 80℃ 的温度下进行，并且一般需要约 1 - 约 24 小时。反应完成后，通过常规方法，包括萃取、沉淀、色谱法、过滤、研制、结晶等收集式(2)产物。

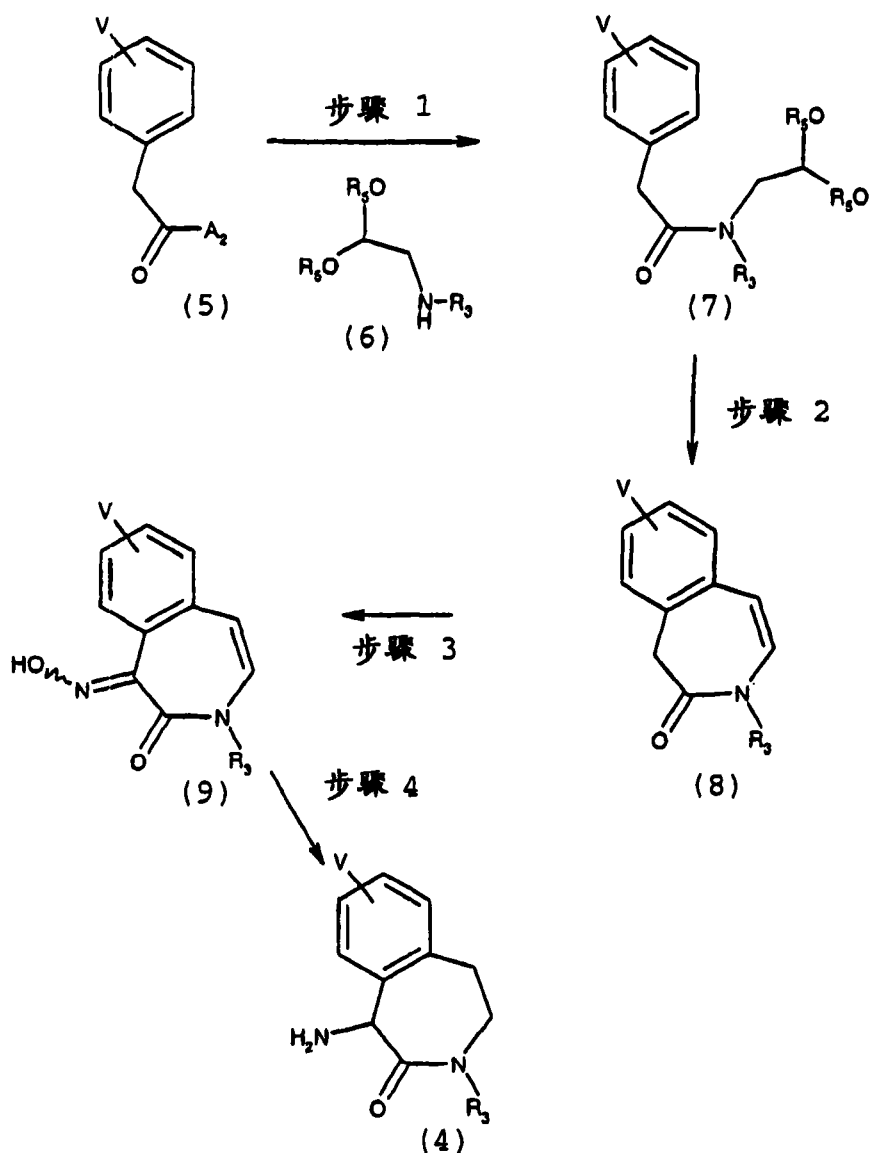
在反应方案 1 步骤 2 中，将式(2)化合物环合以生成式(3)化合物。

例如，将式(2)化合物与酸例如三氟甲磺酸或硫酸接触。通常使用所选的酸作为溶剂来进行该反应。一般情况下，首先将反应物在约 -20℃ - 约 0℃ 的温度下混合，然后温热至约环境温度 - 约 60℃ 的温度。该环合反应一般需要约 12 - 约 72 小时。反应完成后，通过常规方法，包括萃取、沉淀、色谱法、过滤、研制、结晶等收集式(2)产物。

在反应方案 1 步骤 3 中，将式(3)化合物脱保护以生成式(4)化合物。

除去这样的烷氧基羰基胺保护基是本领域众所周知且理解的。例如参见 *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Theodora Greene (1st 和 2nd Editions, Wiley-Interscience) 和 Ben-Ishai, *Tetrahedron*, 43, 439-450 (1987)。

反应方案 2



在反应方案 2 步骤 1 中, 将合适的式 (5) 苯基乙酸衍生物与适当的式 (6) 缩醛偶联, 以生成式 (7) 化合物。合适的式 (5) 苯基乙酸衍生物是其中 V 是式 I 终产物中的所需基团, 且 A₂ 是活化基团例如 -OH、-Cl 或 -Br 的化合物。合适的式 (6) 缩醛是其中 R₃ 是式 I 终产物中的所需基团, 且 R₅ 是 C₁-C₄ 烷基的化合物。这样的偶联反应是肽合成中的常规反应, 并且可如反应方案 1 步骤 1 所述采用其中所使用的合成方法。

另外, 反应方案 2 步骤 2 中描述的偶联可在 Schotten-Baumann 条件下, 使用式 (5) 适当苯乙酸的酰卤与合适的式 (6) 缩醛在混合溶剂例如甲基叔丁基醚、乙酸乙酯、四氢呋喃、丙酮或乙醚和水中进行。该反应使用合适的碱来进行, 所述碱有例如氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢钠或碳酸氢钾。一般情况下, 将该反应剧烈搅拌

或搅动，其在约-20℃ - 约 80℃的温度下进行，并通常需要约 1 - 约 24 小时。反应完成后，通过常规方法，包括萃取、沉淀、色谱法、过滤、研制、结晶等收集式(7)产物。

在反应方案 2 步骤 2 中，将式(7)化合物环合以生成式(8)化合物。在酸例如硫酸中进行这样的环合反应。通常使用酸作为溶剂。该反应一般在约-20℃ - 约 150℃的温度下进行，并通常需要约 1 - 约 24 小时。反应完成后，通过常规方法，包括萃取、沉淀、色谱法、过滤、研制、结晶等收集式(8)产物。

在反应方案 2 步骤 3 中，将式(8)化合物进行胺转移反应，以生成式(9)化合物。在反应方案 2 中描述了脞化作用。这样的脞化作用是通过将式(8)化合物的烯醇化物与脞转移试剂例如亚硝酸烷基酯接触来完成的。式(8)化合物的烯醇化物可通过将式(8)化合物与合适的碱例如叔丁醇钾、二异丙基氨基锂、六甲基二硅叠氮锂(Lithium hexamethyldisilazide)、六甲基二硅叠氮钠、六甲基二硅叠氮钾等反应来制得。Wheeler, 等人, Organic Syntheses, Coll. Vol. VI, p. 840 中举例说明了这样的脞化作用，其中描述了将亚硝酸异戊酯与酮反应来制备所需的脞。该反应通常是在溶剂例如四氢呋喃中进行的。该反应一般在约-20℃ - 约 50℃的温度下进行，并且通常需要约 1 - 约 24 小时。反应完成后，通过常规方法，包括萃取、沉淀、色谱法、过滤、研制、结晶等收集式(8)产物。

或者，这样的胺转移反应可经由叠氮化物来完成。叠氮化物可通过将式(8)化合物的烯醇化物与叠氮化物转移试剂例如甲苯磺酰叠氮和三异丙基苯磺酰叠氮反应来形成。Evans, 等人, J. Am. Chem. Soc., 112: 4011-4030 (1990) 41 中举例说明了这样的反应。该反应通常是在溶剂例如四氢呋喃中进行的。该反应一般在约-20℃ - 约 50℃的温度下进行，并且通常需要约 1 - 约 24 小时。反应完成后，通过常规方法，包括萃取、沉淀、色谱法、过滤、研制、结晶等收集具有叠氮化物来代替脞的式(8)产物。

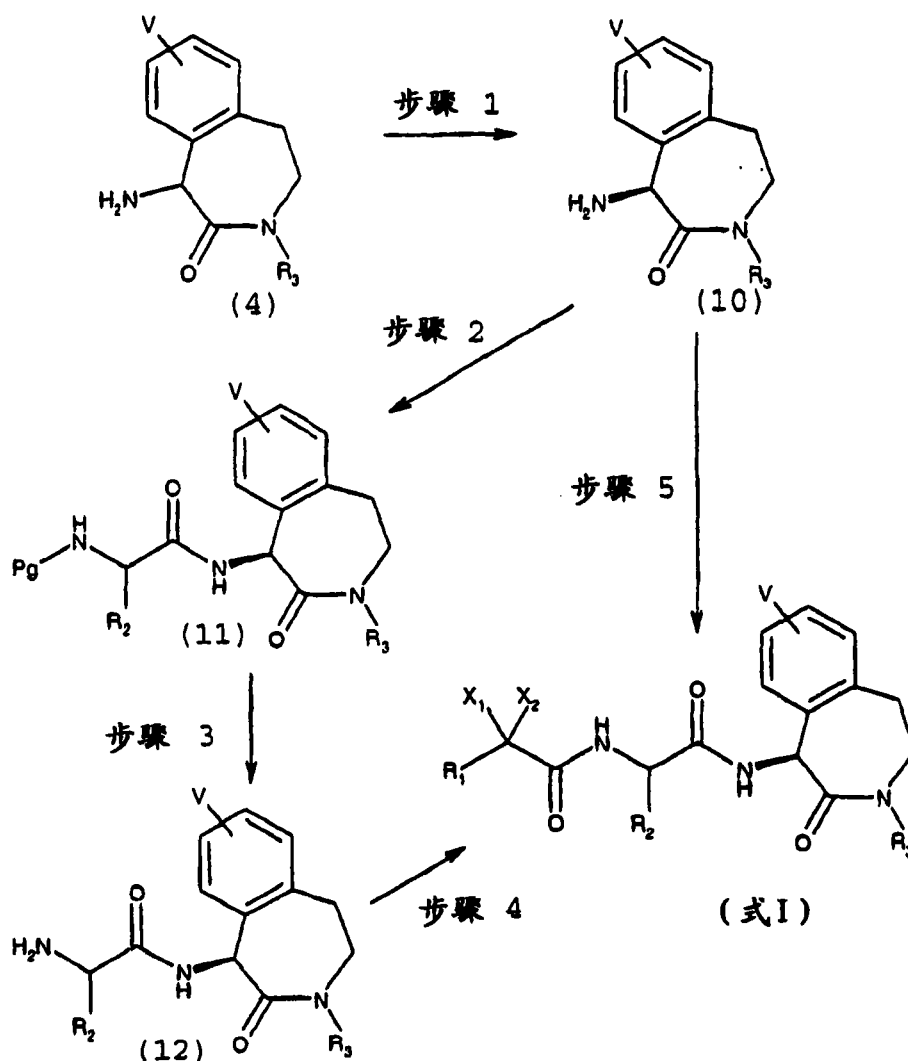
如反应方案 2 步骤 4 所示，将脞还原成式(4)化合物。这样的还原是通过用氢与合适的催化剂例如阮内镍或钯催化剂如披钯碳处理来完成的。该反应一般在溶剂例如四氢呋喃，乙酸乙酯，或低级醇例如甲醇、乙醇和异丙醇，乙酸，水，氨水等，及其混合物中进行。该反应

一般在大气压 - 约 600 psi (4137 kPa) 的氢气压下进行。该反应一般在约 20℃ - 约 100℃ 的温度下进行, 并且通常需要约 1 - 约 24 小时。反应完成后, 通过常规方法, 包括萃取、沉淀、色谱法、过滤、研制、结晶等收集式 (4) 产物。

或者, 当胺是经由叠氮化物转移时, 将叠氮基还原。这样的还原是通过如上所述的氢化进行的。

在另一个实施方案中, 本发明提供了制备式 I 内酰胺化合物, 包括 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮的立体有择方法, 以及制备其手性中间体的方法。反应方案 A 中描述了这样的方法。

反应方案 A



反应方案 A 步骤 1 描述了将合适的式 (4) 内酰胺化合物进行立体化学拆分以生成式 (10) 内酰胺化合物。本领域技术人员能够理解, 本发

明方法并不一定限于制备一种异构体。本发明方法能够制备内酰胺化合物的任一种特定对映体，并特别适于制备 1-氨基-3-烷基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮的异构体。

由于在 2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮部分的 (S)-异构体具有更强的生物活性，本发明在制备基本上纯的 (S)-异构体方面是最有用的。

本文所用术语“基本上纯”是指 (R)-或 (S)-内酰胺，特别是 (R)-和 (S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮的对映体纯度。依据本发明，所制得的基本上纯的 (S)-1-氨基-3-烷基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮可包含大于 80%、优选大于 90%、更优选大于 95%、最优选大于 97% 的 (S)-对映体。

例如，式 (4) 化合物的个体异构体可通过将二苯甲酰基酒石酸盐、(R)-(-)-10-樟脑磺酸和 (D)-(-)-扁桃酸盐分级结晶来拆分。预计有多种不同的二苯甲酰基酒石酸酯（盐）适于该用途。具有选自下列的对位取代基的二苯甲酰基酯是特别优选的：氢、卤素、 C_1-C_4 烷基和 C_1-C_4 烷氧基，二对甲苯甲酰基酒石酸酯（盐）是最优选的。二-对甲苯甲酰基-L-酒石酸酯（盐）是用于获得 (S)-异构体。

在反应方案 A 步骤 1 的优选实施方案中，式 (4) 化合物是定义如下的化合物：其中 V 是氢，且 R_3 是 C_1-C_4 烷基，包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基和仲丁基；最优选使用其中 V 是氢，且 R_3 是甲基的式 (4) 化合物。

依据本发明方法，将式 (4) 化合物与所选的酸接触。一般可使用约 0.4 摩尔当量 - 大大过量所选的酸，优选使用约 0.4 - 1.5 摩尔当量，更优选使用约 0.5 - 1.1 摩尔当量所选的酸。

本发明方法一般通过将酸加成盐从溶液中结晶出来来进行。特别是，溶剂例如低级醇，包括甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、丁醇、仲丁醇、异丁醇、叔丁醇、戊醇、异戊醇、叔戊醇、己醇、环戊醇和环己醇是合适的；其中甲醇、乙醇和异丙醇是优选的。使用反溶剂可能是有利的。本文所用术语“反溶剂”是指其中与溶剂相比盐的溶解性显著下降的溶剂。优选地，当使用反溶剂时，其与所选溶剂混溶。合适的反溶剂包括醚例如乙醚、甲基叔丁基醚等，和乙酸低级烷基酯例如乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙酸丙酯、乙酸异丁酯、乙酸

仲丁酯、乙酸丁酯、乙酸戊酯、乙酸异戊酯等，和烷烃例如戊烷、己烷、庚烷、环己烷等。当本发明方法是通过将酸加成盐从外消旋混合物中结晶出来而进行的时，在使用反溶剂时必须小心以避免结晶出不需要的非对映体盐。

一般情况下，结晶在约 40℃ - 所选溶剂的回流温度的初始温度下以约 0.05 摩尔浓度 - 约 0.25 摩尔浓度的初始浓度进行。然后将该混合物冷却以生成盐。加入晶种可能是有利的。将初始沉淀搅拌约 4 - 48 小时可能是有利的。优选将该结晶溶液缓慢地冷却。最适宜的是，将结晶混合物冷却至环境温度 - 约 -20℃ 的温度。可使用本领域众所周知的技术，包括过滤、倾析、离心、蒸发、干燥等来收集盐。式 (10) 化合物可作为所选酸的酸加成盐直接使用。或者，在使用之前，可在酸交换之后将式 (10) 化合物作为另一酸加成盐分离出来，或者可通过在本领域众所周知且理解的碱性条件下萃取而作为碱分离出来。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了动态拆分 (dynamic resolution) 基本上对映体纯的 (S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮，包括作为动态方法，在芳族醛存在下，将 1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮作为选自下列的酸的酸加成盐结晶出来：二-对甲苯基-L-酒石酸、(R)-(-)-10-樟脑磺酸和 (D)-(-)-扁桃酸。该动态方法的优点是，在结晶期间 1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮转化成一种异构体，由此提高了产率和避免了包括不需要的异构体的废物流。

预计有多种不同的醛适于本发明方法，我们已经发现，在实际过程中有很多醛特别合适。具体来说，我们已经发现，在本发明动态拆分方法中，水杨醛类是优选的，水杨醛、5-硝基水杨醛和 3,5-二氯水杨醛是更优选的。

因此，当本发明方法作为动态拆分进行时，在醛存在下将 1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮与所选的酸接触。对于动态拆分，通常使用约 0.9 - 1.2 摩尔当量的酸，优选使用约 1 摩尔当量的酸。醛一般以催化量使用。通常使用约 0.5 - 0.001 摩尔当量的醛，优选使用约 0.1 - 约 0.01 摩尔当量的醛。

该动态方法一般在溶剂或不具有上述反溶剂的溶剂中进行。将 1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮、所选的酸和醛的

混合物搅拌以转化成所需异构体。该转化一般在环境温度-所选溶剂的回流温度下进行。转化一般需要6-48小时。

本领域技术人员知道,当本发明方法是作为动态拆分来进行时,使用(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮的酸加成盐可由于分离的产物中存在少量醛而变得复杂。因此,动态拆分后,在其使用或形成碱之前,优选通过盐交换来分离(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮,优选将其作为盐酸盐分离出来。

本领域技术人员知道,式(10)化合物可用于制备可用来治疗阿尔茨海默氏病的化合物的多种方法中。这些方法描述在于1997年12月22日提交的PCT申请PCT/US97/22986中,下文对其作了描述。本发明方法的特征在于,它们利用了反应方案A步骤1所示的拆分制得了式I化合物。

反应方案A步骤2描述了式 $\text{PgNH-CHR}_2\text{-C(O)-A}$ 所示合适的氨基保护的氨基酸与适当的式(10)内酰胺化合物的偶联反应。合适的氨基保护的氨基酸是定义如下的那些:其中Pg是胺保护基, R_2 是式I终产物中的所需基团,且A是能够与式(10)化合物的氨基偶联的活化基团例如-OH或-Cl。对于本领域技术人员来说,这样的氨基保护的氨基酸易于获得。

优选的式 $\text{PgNH-CHR}_2\text{-C(O)-A}$ 所示氨基保护的氨基酸是其中Pg是叔丁氧基羰基和苄氧基羰基, R_2 是甲基,并且具有L-氨基酸立体化学的那些。

反应方案A步骤2中描述的偶联反应涉及肽合成中的常规反应,并且也可以采用其中所使用的合成方法。反应方案1步骤1中详细描述了这样的方法。

反应方案A步骤3中描述了将(11)化合物脱保护以生成式(12)化合物。这样的氨基保护基的脱保护是本领域众所周知且理解的。

反应方案A步骤4中描述了合适的式(13)化合物 $\text{R}_1\text{CX}_1\text{X}_2\text{-C(O)A}_1$ 与式(12)化合物的生成式I化合物的偶联反应。合适的式(13)化合物是其中 R_1 、 X_1 和 X_2 是式I终产物中的所需基团的化合物,并且是本领域众所周知的,包括描述在于1997年12月22日提交的PCT申请PCT/US97/22986中以及如本文所述。合适的式(13)化合物还可以具有

式 I 终产物中所需的立体化学。步骤 3 中描述的偶联反应是用式 (13) 酸 (其中 A_1 是 $-OH$ 的化合物) 或由其衍生的酰卤 (其中 A_1 是 $-Cl$ 或 $-Br$ 的化合物) 以类似于反应方案 1 步骤 1 所述的方式进行的。

反应方案 A 步骤 5 描述了制备式 I 化合物的另一方法, 其显示了将合适的式 (10) 化合物与合适的式 (14) 化合物 $R_1CX_1X_2-C(O)-NH-CHR_2-C(O)A_2$ 的直接生成式 I 化合物的偶联反应。合适的式 (10) 化合物如步骤 2 所述。合适的式 (14) 化合物是其中 R_1 、 X_1 、 X_2 和 R_2 是式 I 终产物所需基团的化合物。合适的式 (14) 化合物还是其中立体化学符合式 I 终产物需求的化合物。

式 (14) 化合物可通过将羧基保护的氨基酸 $H_2N-CHR_2-C(O)OPg_1$ 与如上所述的式 (13) 化合物偶联来容易地制得。这样的偶联反应同样是本领域众所周知的, 并且获得了这样的产物, 其在脱保护后, 生成了式 (14) 化合物。

通过下述实施例和制备来进一步举例说明本发明。这些实施例和制备仅是举例说明, 而不是以任何方式限制本发明。

除非另有说明, 否则在实施例和制备中使用的术语具有其标准含义。例如, “ $^{\circ}C$ ” 是指摄氏度; “mmol” 是指毫摩尔或毫摩尔数; “g” 是指克或克数; “mL” 是指毫升或毫升数; “盐水” 是指饱和氯化钠水溶液; “THF” 是指四氢呋喃; “HPLC” 是指高压液相色谱法等。

实施例 1

合成 1-氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮

向氢氧化钠 (1.1 当量) 在 15 mL 无水 DMF 内的浆液中加入 2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮 (0.0042 mol) 在 10 mL DMF 中的溶液。然后加入甲基碘 (约 2 当量)。当 TLC 证实反应完全时, 将该反应混合物倒入冰上, 并萃取到乙酸乙酯内。将有机层依次用水和盐水洗涤。然后将有机层用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩。通过 HPLC (LC 2000) 纯化残余物, 用乙酸乙酯/己烷系统洗脱, 获得了 3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮。

将 3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮 (1 当量) 溶解在 THF 中, 并加入异戊腈 (1.2 当量)。将该混合物在冰浴中冷却至 $0^{\circ}C$ 。滴加 NaHMDS (1.1 当量, 1M 的 THF 溶液)。搅拌 1 小时或直至反应完全后, 将该混合物浓缩, 用 1N 盐酸酸化, 并用乙酸乙酯萃取。将有机相

干燥, 浓缩, 获得了粗产物, 通过硅胶色谱纯化, 获得了 1-羟基亚氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮: 质谱 (M+H)⁺, 205.1.

将 1-羟基亚氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮溶解在 EtOH/NH₃ (20:1) 中, 在高压气体贮罐 (bomb) 中使用阮内镍和氢气 (500 psi/3447kPa) 于 100℃ 氢化 10 小时。将所得混合物过滤, 浓缩, 获得了油状物, 通过硅胶色谱纯化, 获得了本标题化合物。

实施例 2

合成 1-氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮

在室温向 20 L Morton 烧瓶中加入 MTBE (5.52 L, 7 体积) 和 (N-甲基氨基)-乙醛缩二甲醇 (614 g, 5 mol) 以形成溶液。向该 Morton 反应烧瓶中加入通过加入碳酸氢钠 (546g, 6.5 mol) 和水 (6.31 L, 8 体积) 制得的碳酸氢钠溶液。将该混合物冷却至 10℃ 以下, 用 1 小时向该冷却的反应混合物中滴加苯乙酰氯 (789 g, 5 mol) 的 MTBE (789 mL) 溶液。加入完成后, 将该反应混合物在室温搅拌 1 小时。在该阶段, HPLC 分析表明反应已完全。用 MTBE (4 体积) 萃取, 用无水硫酸镁干燥, 然后用旋转蒸发器浓缩, 获得了 1.187 kg (98%) N-甲基-N-(2, 2-二甲氧基乙基) 苯基乙酰胺, 为液体, (M+H)⁺ = 237.9.

在浓氮气氛下向 5 L Morton 烧瓶中加入 H₂SO₄ (1.42 L), 向该反应烧瓶中滴加 N-甲基-N-(2, 2-二甲氧基乙基) 苯基乙酰胺 (712 g, 3 mol), 引起放热 (从 22℃ 升至 78℃)。然后将所得反应在 110℃ 加热 3 小时, 然后冷却至室温, 并转移到 20 L Morton 烧瓶中。在 10℃ 以下, 用氢氧化钠水溶液 (9.18 L, 5 N) 中止该反应混合物的反应。用乙酸乙酯 (2 × 2.85 L) 萃取, 用硫酸钠干燥, 然后浓缩至固体, 获得了 520 g (73.5%) 3-甲基-6, 7-二氢-2H-3-苯并氮杂萘-2-酮, 为固体。将该产物从 MTBE 中重结晶以提高纯度, 获得了固体, mp = 81 - 82℃; (M+H)⁺ = 174.2.

将 3-甲基-6, 7-二氢-2H-3-苯并氮杂萘-2-酮 (113.8 g, 0.657 mol) 的 THF (0.5 L) 溶液冷却至 0℃, 并滴加异戊腈 (100.75 g, 0.86 mol)。以使温度保持在 10℃ 以下的速度向所得混合物中加入 LiHMDS (1 N 的 THF 溶液, 854 mL, 0.854 mol)。加入完成后, 将该反应在室温搅拌 2 - 3 小时, 同时通过 HPLC 检测反应进程。反应完全后, 将该混合物冷

却至 0℃, 用盐酸 (2N) 将 pH 从 12 调节至 2-3。将所得沉淀搅拌 12-16 小时, 然后通过过滤分离, 干燥, 获得了 86.3 g (64.9%) 1-羟基亚氨基-3-甲基-6, 7-二氢-2H-3-苯并氮杂萘-2-酮; mp = 225-226℃; $(M+H)^+ = 203.0$ 。

将 1-羟基亚氨基-3-甲基-6, 7-二氢-2H-3-苯并氮杂萘-2-酮 (35 g, 0.173 mol) 的乙醇 (525 mL) 溶液与披钨炭 (10%, 3.5 g) 在稀盐酸 (17.5 g 浓盐酸在 17 mL 水中的溶液) 中的浆液一起加到高压釜中。将所得混合物在 50℃ 和 250 psi (1723 kPa) 氢化直至反应完全。将该反应混合物经由硅藻土 (celite) 垫过滤, 使用乙醇作为溶剂, 并将滤液浓缩至 90 mL。向该浓缩液中加入水 (350 mL), 并将所得溶液进一步浓缩至约 200 mL。将二氯甲烷 (350 mL) 加到该水溶液中, 然后用氢氧化钠水溶液 (1N) 将 pH 调节至 11-11.5。分离出有机相, 用二氯甲烷 (175 mL) 萃取水相。将合并的萃取液浓缩, 获得了在静置时结晶的残余物, 得到了本标题化合物: mp = 69-81℃; $(M+H)^+ = 191.0$ 。

实施例 3

合成 1-氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮

向 22 L Morton 烧瓶中加入二氯甲烷 (4.73 L, 8 体积)、N-甲基苯乙基胺 (591 g, 4.33 mol) 和碳酸氢钠水溶液 (436.7 g, 5.2 mol, 在 4.73 L 水中)。将该混合物冷却至 5℃ 以下, 用 70 分钟向该冷却的反应混合物中滴加氯乙酰氯 (513.7 g, 4.55 mol) 的二氯甲烷 (887 mL) 溶液。加入完成后, HPLC 分析表明反应已完全。分离各层, 用二氯甲烷萃取水层。将合并的有机层用无水硫酸镁干燥, 用旋转蒸发器浓缩, 获得了 915.7 g (99.8%) N-甲基-N-(2-苯基乙基)-1-氯乙酰胺: $(M+H)^+ = 212.1$ 。

在氮气氛围下向 12 L 烧瓶中加入 N-甲基-N-(2-苯基乙基)-1-氯乙酰胺 (883.3 g, 4.17 mol) 和邻二氯苯 (6.18 L)。加入氯化铝 (1319 g, 10.13 mol), 引起了放热 (从 22℃ 升至 50℃)。然后将所得反应加热至 165℃ 2.5 小时, 用约 14 小时冷却至室温。将该反应混合物冷却至约 0℃, 分 4 批加到冷水 (8.86 L, 约 5℃) 中以将放热保持在约 40℃。分离各层, 用二氯甲烷 (7.07 L) 萃取水层, 并分离各层。合并有机层, 依次用盐酸 (8.83 L, 1N) 和饱和碳酸氢钠水溶液 (7.07 L) 萃取, 用硫酸镁干燥, 与硅胶 (883 g) 合并, 并施加到硅胶柱 (3.53 kg, 在烧结玻

璃漏斗中，作为在二氯甲烷中的浆液堵塞)。用二氯甲烷洗脱该硅胶柱直至收集到 25 L，然后用乙酸乙酯洗脱，获得了产物。将含有产物级分蒸发，获得了 3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮，为黄褐色固体，608 g (83%)。

在 22 L 烧瓶中，于氮气氛围下将 3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮 (606 g, 3.46 mol) 和异戊腈 (543 g, 4.5 mol) 放入 THF (7.88 L) 中。将该混合物冷却至约 0℃，然后以使温度保持在约 7℃ 以下的速度向该混合物中加入 LiHMDS (1 N 的 THF 溶液, 4.5 L, 04.5 mol)。加入完成后，将该反应在室温搅拌约 2 小时，同时通过 HPLC 监测反应进程。反应完全后，将该混合物冷却至约 0℃，用盐酸 (2N) 将 pH 从 12 调节至约 2-3。将所得沉淀搅拌约 6 小时，然后通过过滤分离，干燥，获得了 1-羟基亚氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮 604.7 g (85.6%)。

将 1-羟基亚氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮 (625 g, 3.06 mol) 和 3A 乙醇 (15.6 L) 与披钨炭 (10%, 120 g) 在稀盐酸 (浓盐酸 (312 g 在 320 mL 水中的溶液) 中的浆液一起加到高压釜中。将所得混合物在剧烈搅拌下于 50℃ 和 250 psi (1723 kPa) 氢化直至反应完全 (约 4 小时)。将该反应混合物经由硅藻土垫过滤，使用乙醇作为溶剂，并将滤液浓缩，获得了固体。用二氯甲烷 (6 L) 处理该固体，加入 1N 氢氧化钠水溶液直至水层的 pH 为 11-11.5。将该混合物搅拌，分离各层，用二氯甲烷 (2 L) 萃取水层。将有机层用硫酸镁干燥，过滤，用旋转蒸发器蒸发，获得了本标题化合物 477 g (81.9%)。

实施例 4

合成 (S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮

将 1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮 (1.544 g, 8.12 mmol) 在 15 mL 甲醇中轻微加热以形成溶液。在另一烧瓶中，将二-对甲苯甲酰基-L-酒石酸 (3.12 g, 8.08 mmol) 溶解在 15 mL 甲醇中，并通过移液管加到温热的胺溶液中。将该混合物加热，沉淀出固体。再加入 30 mL 甲醇以获得溶液，将其回流 30-40 分钟，然后缓慢地冷却至环境温度，获得了固体。搅拌约 18 小时后，通过过滤收集固体，用少量冷的甲醇洗涤，获得了 2.24 g (S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二-对甲苯甲酰基-L-酒石酸盐 (产率为 96

%, 94.7% ee)。

将(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二-对甲苯甲酰基-L-酒石酸盐(11.83 g, 20.5 mmol)溶解在45 mL 1.0 N 氢氧化钠水溶液中,并用二氯甲烷(3×25 mL)萃取。将合并的二氯甲烷层依次用35 mL 1.0 N 氢氧化钠水溶液、盐水溶液洗涤,并用无水硫酸镁干燥。真空除去溶剂,获得了本标题化合物(3.38 g),为无色油状物(产率为87%, 93.2% ee)。

实施例 5

合成(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮

将1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮(6.0 g, 31.5 mmol)在75 mL 甲醇中轻微加热以形成溶液,与二-对甲苯甲酰基-L-酒石酸(12.2 g, 31.5 mmol)在75 mL 温热的甲醇中的溶液合并。向该溶液中加入晶种,形成了固体。再加入100 mL 甲醇,将该混合物搅拌。搅拌约18小时后,通过过滤收集固体,用少量冷的甲醇洗涤,获得了6.7 g 固体。将固体与甲醇(200 mL)合并,搅拌。18小时后,收集固体,获得了(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二-对甲苯甲酰基-L-酒石酸盐(4.4 g)。通过实施例4中描述的方法分离出碱,获得了本标题化合物(96% ee)。

实施例 6

合成(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮

在22 L 容器中于氮气氛围下将1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮(438 g, 2.3 mol)加热(约40℃)以获得在甲醇(4.38 mL)中的溶液。在另一个烧瓶中,将二-对甲苯甲酰基-L-酒石酸(889.7 g, 2.3 mol)溶解在4.38 L 甲醇中,加热至约40℃,然后加入1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮溶液。继续加热,再加入6.13 L 甲醇,然后将该混合物回流约45分钟,之后缓慢地冷却至环境温度,获得了固体。搅拌约18小时后,通过过滤收集固体,用少量母液洗涤,风干后,用约2 L 乙酸乙酯洗涤,获得了561.6 g (S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二-对甲苯甲酰基-L-酒石酸盐。将(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二-对甲苯甲酰基-L-酒石酸盐、二氯甲烷(6.57 L)和1N 氢氧化钠水溶液(6.57 L)合并,搅拌。分离各层,将有机层用1N 氢氧化钠

水溶液(3.28 L)萃取2次,用盐水(2.46 L)萃取1次,然后用硫酸镁干燥,过滤,用旋转蒸发仪浓缩,获得了本标题化合物 250 g (57.4 %, 94.1 % ee)。

实施例 7

合成(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮盐酸盐

将1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮(31.9 g, 168 mmol)在约300 mL乙酸异丙酯中浆化,并加热至45℃。在另一个单独的烧瓶中,将(R)-(-)-D-扁桃酸(25.0 g, 164 mmol)在约130 mL异丙醇中加热直至形成溶液,并加到上面获得的1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮/乙酸异丙酯浆液中,得到溶液,其中迅速形成了沉淀。将该混合物在45℃搅拌约3小时。将5-硝基水杨醛(2-羟基-5-硝基苯甲醛)(1.40 g, 8.38 mmol, 5 mol %)加到该温热的溶液中,并将该混合物在45℃搅拌。约14小时后,将该浆液冷却至环境温度,搅拌2小时,然后通过过滤收集固体,用70 mL冷的乙酸异丙酯洗涤,在真空烘箱中于40℃干燥,获得了46.62 g (S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮(R)-扁桃酸盐(产率为82.9 %, 98.4 % ee)。

将(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮(R)-扁桃酸盐(2.42 g, 7.06 mmol, 98.4 % ee)在25 mL乙酸乙酯中于环境温度浆化。加入浓盐酸(1.1 mL, 约11.2 mmol),在剧烈搅拌下将该混合物加热至50℃搅拌3.5小时。将该浆液冷却至环境温度,过滤,用甲基叔丁基醚(约10 mL)洗涤,获得了1.48 g本标题化合物(产率为92.5 %, 97.9 % ee)。

实施例 8

合成(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮

在氮气氛下向圆底烧瓶中加入在THF中的N-t-Boc-L-丙氨酸(1.0当量)、羟基苯并三唑水合物(约1.1当量)和(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮(1.0当量)。向该充分搅拌的混合物中加入Hunig's碱(N,N-二异丙基乙胺,1.1当量),然后加入EDC(1.1当量)。在环境温度搅拌4-17小时后,减压除去溶剂,将残

余物置于乙酸乙酯和水中，用饱和碳酸氢钠水溶液、1N 盐酸、盐水洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，减压除去溶剂，获得了 1-(N-t-Boc-L-丙氨酰基)氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮：质谱 $(M+H)^+$ ，362.3。

在 N₂ 下向 1-(N-t-Boc-L-丙氨酰基)氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮在 1,4-二氧杂环己烷 (0.03 - 0.09 M) 内的在冰浴中冷却至约 10℃ 的搅拌溶液中通入无水 HCl 气流 10 - 15 分钟。将该溶液密封，然后移去冷却浴，搅拌温热至环境温度，2 - 8 小时，通过 TLC 监测，1.0 意味着原料已消耗完。将该溶液浓缩，获得了 1-(L-丙氨酰基)-(S)-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮，不用进一步纯化直接使用。

在氮气氛下将 1-(L-丙氨酰基)-(S)-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-3-甲基-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮 (1.0 当量)、羟基苯并三唑水合物 (1.1 当量) 和 (S)-2-羟基-3-甲基-丁酸 (1.0 当量) 置入 THF 中。向该充分搅拌的混合物中加入 Hunig's 碱 (N,N-二异丙基乙胺, 1.1 当量)，然后加入 EDC (1.1 当量)。在环境温度搅拌 4 - 17 小时后，减压除去溶剂，将残余物置于乙酸乙酯 (或类似溶剂) 和水中，用饱和碳酸氢钠水溶液、1N 盐酸、盐水洗涤，用无水硫酸钠干燥，减压除去溶剂，获得了本标题化合物。

实施例 9

合成 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮

在氮气氛下向圆底烧瓶中加入在 THF (3.76 L) 内的 N-t-Boc-L-丙氨酸 (249.5 g, 1.32 mol)、羟基苯并三唑水合物 (232.2 g, 1.52 mol) 和 (S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮 (250.8 g, 1.32 mol)。将该混合物冷却至 5℃ 以下，然后加入 Hunig's 碱 (N,N-二异丙基乙胺, 188.4 g, 1.45 mol)，然后加入 EDC (283.7 g, 1.45 mol)。搅拌 6 小时后，将该反应混合物温热至环境温度，并搅拌约 14 小时。减压除去溶剂，将残余物置于乙酸乙酯 (3.76 L) 和水 (1.76 L) 中，分离各层，将有机层用水 (1.76 L) 萃取，合并水层，用乙酸乙酯 (1.76 L) 萃取。合并有机层，用饱和碳酸氢钠水溶液 (1.76 L) 萃取，用无水硫酸钠干燥，过滤，用旋转蒸发仪浓缩，获得了 1-(N-t-Boc-L-

丙氨酰基)氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂草-2-酮 463 g (97.2%)。

使用液面下分散管,通过让无水 HCl 气体流经冷却至约 0℃的乙酸乙酯(1.76 L)来制备 HCl 的乙酸乙酯溶液。将上述制备的 HCl 的乙酸乙酯溶液加到 1-(N-t-Boc-L-丙氨酰基)氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂草-2-酮(462 g, 1.28 mol)在乙酸乙酯(3.7 L)内的剧烈搅拌溶液中。再加入一定量的乙酸乙酯(1 L),让该反应混合物温热至室温,并搅拌 22 小时。将该反应混合物过滤,获得了固体。将该固体用乙腈(5 L)浆化,加热至回流,然后冷却至约 60℃,之后过滤并干燥,获得了 1-(L-丙氨酰基)-(S)-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂草-2-酮 389.8 g (94.7%)。

在氮气氛下将 1-(L-丙氨酰基)-(S)-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-3-甲基-1H-3-苯并氮杂草-2-酮(369.5 g, 1.18 mol)、羟基苯并三唑水合物(207.6 g, 1.36 mol)、Hunig's 碱(N,N-二异丙基乙胺, 352.2 g, 2.71 mol)和(S)-2-羟基-3-甲基-丁酸(140.6 g, 1.18 mol)在 THF (4.8 L)中合并,冷却至 5℃以下。加入 EDC (253.7 g, 1.3 mol),让该反应混合物温热至环境温度,并搅拌。约 25 小时后,将该反应混合物用二氯甲烷(5.54 L)稀释,并用水(2.22 L)萃取。将有机层用水(2.22 L)萃取,合并水层,用二氯甲烷(5.54 L)萃取。合并有机层,用水(2.22 L)萃取 2 次,用饱和碳酸氢钠水溶液(2.22 L)萃取,用无水硫酸钠干燥,过滤,并用旋转蒸发仪蒸发,获得了本标题化合物 428 g (100%)。

实施例 10

合成(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂草-2-酮二水合物

在轻微的温热下(40℃)将(N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂草-2-酮固体置于丙酮(3.42 L)和水(0.856 L)中。将该溶液分成约 2 L 的部分,向每份溶液中加入水(7.19 L),同时将该浑浊的溶液温热至 50℃。水加入完成后,将该浑浊的溶液冷却至环境温度,获得了固体,将其作为浆液在环境温度搅拌约 14 小时,然后过滤并干燥,获得了本标题化合物 310.6 g (66.2%)。

当用作药物时,本发明化合物通常以药物组合物的形式给药。因

此, 在另一个实施方案中, 本发明提供了药物组合物, 其中包含有效量的结晶 N-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物和可药用稀释剂。这样的药物组合物用于抑制 β -淀粉状蛋白肽释放和/或其合成, 包括用于治疗阿尔茨海默氏病。因此, 本发明包括结晶 N-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物在制备用于抑制 β -淀粉状蛋白肽释放和/或其合成, 特别包括用于治疗阿尔茨海默氏病的药物中的应用。

结晶 N-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物可通过多种途径给药。本发明化合物可以以使得化合物以有效量被生物利用的任何形式或方式, 包括口服和非胃肠道途径给药。例如, 本发明化合物可以通过口服、吸入、皮下、肌内、静脉内、透皮、鼻内、直肠、经眼、局部、舌下、颊等途径给药。

在制备本发明组合物的过程中, 通常将活性组分与赋形剂混合, 用赋形剂稀释, 或者包封在可呈胶囊、小袋、纸或其它容器形式的载体内。本发明化合物可单独给药或者以药物组合物的形式给药, 也就是说, 与可药用稀释剂例如载体或赋形剂合并, 其中可药用稀释剂的比例和性质是根据本发明化合物的溶解度和化学性质、所选的给药途径和标准药物实践 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (1990)) 确定。

本发明药物组合物是通过药物领域众所周知的方式制得的。载体或赋形剂可以是起活性组分的载体或介质作用的固体、半固体或液体材料。适宜的载体或赋形剂是本领域众所周知的。可使本发明药物组合物适于口服、吸入、非胃肠道或局部使用, 并且可以以呈片剂、胶囊、气雾剂、吸入剂、栓剂、溶液剂、悬浮剂等形式施用。

对于口服治疗给药, 可将化合物与赋形剂混合, 并以片剂、锭剂 (troches)、胶囊、酏剂、悬浮剂、糖浆剂、糯米纸囊剂 (wafers)、口香糖等形式使用。这些制剂应当含有至少 4% 的本发明化合物—活性组分, 但是可根据特定形式而变, 并且可适宜地占制剂单位重量的 2% - 约 90%。本发明化合物在组合物中的量是可获得合适的剂量的量。

优选的本发明组合物和制剂可由本领域技术人员确定。

片剂、丸剂、胶囊、锭剂等还可以含有一种或多种下列辅助剂：粘合剂例如微晶纤维素、西黄蓍胶或明胶；赋形剂例如淀粉或乳糖；崩解剂例如藻酸、Primogel、玉米淀粉等；润滑剂例如硬脂酸镁、硅油或 Sterotex；助流剂例如胶态二氧化硅；并且可加入甜味剂例如蔗糖或糖精，或矫味剂例如薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味剂。当单位剂型是胶囊时，除了上述类型的物质以外，其还可以含有液体载体例如聚乙二醇或脂肪油。其它单位剂型可含有改变剂量单位物理形式的其它多种物质，例如包衣。因此，可用糖、虫胶或其它包衣剂将片剂或丸剂包衣。除了本发明化合物以外，糖浆剂还可以含有作为甜味剂的蔗糖和一些防腐剂、染料、着色剂和矫味剂。制备这些不同组合物的物质应当是药物纯的，并且在所用的量是无毒的。

为了非胃肠道给药，可将本发明化合物掺入到溶液或悬浮液内。这些制剂一般含有至少 0.1% 本发明化合物，但是可以在占制剂重量的 0.1 - 约 90% 之间变化。本发明化合物在组合物中的量是可获得合适的剂量的量。溶液或悬浮液还可以包含一种或多种下列辅助剂：无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗菌剂例如苯甲醇或尼泊金甲酯；抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂例如乙二胺四乙酸；缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，和用于调节张力的物质例如氯化钠或葡萄糖。非胃肠道给药用制剂可封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量瓶中。优选的组合物和制剂能由本领域技术人员确定。

本发明化合物还可以局部给药，并且当局部给药时，载体可适当地包含溶液、膏剂或凝胶剂基质。基质可例如包含一种或多种下列组分：凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂例如水和醇、和乳化剂以及稳定剂。式 I 化合物或其可药用盐在局部给药用制剂中的浓度可以为约 0.1 - 约 10% w/v (重量/单位体积)。

另一优选的本发明制剂采用透皮给药系统(“贴剂”)。这样的透皮贴剂可用于连续或不连续地输注控制量的本发明化合物。用于递送药物活性剂的透皮贴剂的构造和应用是本领域众所周知的。参见例如 1991 年 6 月 11 日授权的 U.S. 专利 5,023,252, 该专利引入本申请以作参考。这样的贴剂可构造成连续、以脉冲方式或按需要递送药物活性

剂的形式。

为了更充分地举例说明本发明的实施，下面描述局部给药用药物组合物。这些实施例仅是举例说明，并不是为了以任何方式限制本发明范围。

制剂实施例 1

制备含有下列组分的硬明胶胶囊：

组分	量 (mg/胶囊)
活性组分	30.0
淀粉	305.0
硬脂酸镁	5.0

将上述组分混合，以每粒 340 mg 的量填充到硬明胶胶囊中。

制剂实施例 2

使用下列组分制备片剂：

组分	量 (mg/片)
活性组分	25.0
微晶纤维素	200.0
胶态二氧化硅	10.0
硬脂酸	5.0

将上述组分混合，压制成每片重 240 mg 的片剂。

制剂实施例 3

制备含有下列组分的干粉吸入剂：

组分	重量 %
活性组分	5
乳糖	95

将活性组分与乳糖混合，并加到干粉吸入器具中。

制剂实施例 4

如下所述制备每片含有 30 mg 活性组分的片剂：

组分	量 (mg/片)
活性组分	30.0 mg
淀粉	45.0 mg
微晶纤维素	35.0 mg
聚乙烯吡咯烷酮 (作为 10% 在无菌水中的溶液)	4.0 mg

羧甲基淀粉钠	4.5 mg
硬脂酸镁	0.5 mg
滑石粉	1.0 mg
总共	120 mg

将活性组分、淀粉和纤维素过 20 目 U.S. 筛，并充分混合。将聚乙烯吡咯烷酮溶液与所得粉末混合，然后过 16 目 U.S. 筛。将所制得的颗粒在 50-60℃ 干燥，并过 16 目 U.S. 筛。将羧甲基淀粉钠、硬脂酸镁和滑石粉预先过 30 目 U.S. 筛，然后加到上述颗粒中，混合后，在压片机上压制成每片重 150 mg 的片剂。

制剂实施例 5

如下所述制备每粒含有 40 mg 药物的胶囊：

组分量	(mg/胶囊)
活性组分	40.0 mg
淀粉	109.0 mg
硬脂酸镁	1.0 mg
总共	150.0 mg

将活性组分、淀粉和硬脂酸镁混合，过 20 目 U.S. 筛，以 150 mg 的量填充到硬明胶胶囊中。

制剂实施例 6

如下所述制备每粒含有 25 mg 活性组分的栓剂：

组分	量
活性组分	25 mg
饱和脂肪酸甘油酯加至	2,000 mg

将活性组分过 60 目 U.S. 筛，悬浮在预先使用最小必需热量熔化的饱和脂肪酸甘油酯内。然后将该混合物倒入标称 2.0 g 容量的栓剂模子内，并放冷。

制剂实施例 7

如下所述制备每 5.0 ml 剂量含有 50 mg 药物的悬浮液：

组分	量
活性组分	50.0 mg
黄原胶	4.0 mg

羧甲基纤维素钠 (11%)	
微晶纤维素 (89%)	50.0 mg
蔗糖	1.75 g
苯甲酸钠	10.0 mg
调味剂和着色剂	适量
纯化水	加至 5.0 ml

将活性组分、蔗糖和黄原胶混合，过 10 目 U.S. 筛，然后与预先制得的微晶纤维素和羧甲基纤维素钠在水中的溶液混合。用一些水将苯甲酸钠、调味剂和着色剂稀释，并在搅拌下加入。然后加入足量水以达到所需体积。

制剂实施例 8

如下所述制备每粒含有 15 mg 药物的胶囊：

组分	量 (mg/胶囊)
活性组分	15.0 mg
淀粉	407.0 mg
硬脂酸镁	3.0 mg
总共	425.0 mg

将活性组分、淀粉和硬脂酸镁混合，过 20 目 U.S. 筛，并以 560 mg 的量填充到硬明胶胶囊内。

制剂实施例 9

如下所述制备皮下用制剂：

组分	量
活性组分	1.0 mg
玉米油	1 ml

根据活性组分在玉米油中的溶解度，在该制剂中如果需要可使用高达约 5.0 mg 或更多的活性组分。

制剂实施例 10

如下所述制备局部给药用制剂：

组分	量
活性组分	1 - 10 g
乳化蜡	30 g

液体石蜡 20 g

白色软石蜡 加至 100 g

将白色软石蜡加热直至熔化。掺入液体石蜡和乳化蜡，并搅拌直至溶解。加入活性组分，继续搅拌直至分散。然后将该混合物冷却直至固化。

在一个其方法方面中，本发明涉及抑制 β -淀粉状蛋白肽释放和/或其合成的方法，包括给有此需要的患者施用有效量的结晶 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物。在一个特别的方法实施方案中，本发明提供了治疗阿尔茨海默氏病的方法，包括给有此需要的患者施用有效量的结晶 (N)-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物。

还应该认识到，本领域技术人员可通过治疗目前患有阿尔茨海默氏病的患者或者通过预防性地治疗有发展成该疾病危险的患者来影响阿尔茨海默氏病。因此，术语“治疗”是指其中可减缓、中断、阻止、控制或停止阿尔茨海默氏病进展的所有进程，但是不一定指完全消除所有症状。这样，本发明方法包括在有发展成阿尔茨海默氏病危险的患者中预防阿尔茨海默氏病的发作，抑制阿尔茨海默氏病的进展，和治疗重症阿尔茨海默氏病。

本文所用术语“患者”是指患有与 β -淀粉状蛋白肽释放和/或其合成增加有关的病症，包括阿尔茨海默氏病的温血动物例如哺乳动物。应当理解，豚鼠、狗、猫、大鼠、小鼠、马、牛、羊和人是在该术语含义范围内的动物的实例。需要这种治疗的患者易于诊断。

本文所用术语式 I 化合物的“有效量”是指能有效地抑制 β -淀粉状蛋白肽释放和/或其合成，特别是治疗阿尔茨海默氏病的量。

有效量可由作为本领域技术人员的临床诊断医师通过使用常规技术并观察在类似状况下获得的结果来容易地确定。在确定有效量—结晶 N-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萘-2-酮二水合物的剂量时，临床诊断医师要考虑多种因素，包括但不限于：N-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯

并氮杂萆-2-酮的效力和性质；患者种类；其身材、年龄和一般健康状况；疾病的牵涉程度和严重程度；个体患者的反应；给药方式；给药剂剂的生物利用度特征；所选的给药方案；使用的其它伴行药物治疗；和其它相关因素。

预计有效量的结晶 N-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萆-2-酮二水合物为约 0.1 毫克/千克体重/天 (mg/kg/天) - 约 100 mg/kg/天。优选的量能由本领域技术人员确定。

可在包括下列测试在内的不同生物系统中测试本发明 N-((S)-2-羟基-3-甲基-丁酰基)-1-(L-丙氨酰基)-(S)-1-氨基-3-甲基-2,3,4,5-四氢-1H-3-苯并氮杂萆-2-酮二水合物。

实施例 A

用于检测 β -淀粉状蛋白生成抑制剂的细胞筛选

在具有 Swedish 突变的细胞系中测定上述多种式 I 化合物抑制 β -淀粉状蛋白生成的能力。该筛选测定使用这样的细胞 (K293 = 人肾细胞系)，该细胞已经按照国际专利申请出版物 No. 94/10569⁸ 和 Citron 等人¹² 描述的方式，用含有双突变 $\text{LyS}_{651}\text{Met}_{652}$ 至 $\text{Asn}_{651}\text{Leu}_{652}$ (APP751 编号方式) 的淀粉状蛋白前体蛋白 751 (APP751) 稳定地转染过。该突变一般称为 Swedish 突变，在 Dulbecco 氏最小必需培养基 (Sigma, St. Louis, MO) + 10% 胎牛血清中将称为 “293 751 SWE” 的细胞以 $2-4 \times 10^4$ 个细胞/孔的量铺在 Corning 96-孔平板上。为了获得在线性测定范围内的 β -淀粉状蛋白 ELISA 结果，($\sim 0.2-2.5$ ng/mL)，细胞数目很重要。

在用 10% 二氧化碳平衡的恒温箱中于 37℃ 培养过夜后，除去培养基，用 200 μL 含有式 I 化合物 (药物) 的培养基/孔替换，预处理 2 小时后，并如上所述培养细胞。药物贮备液是在 100% 二甲亚砜中制备的，这样在处理所用的最终药物浓度下，二甲亚砜的浓度不超过 0.5%，实际上，通常等于 0.1%。

在预处理结束时，再除去培养基，用新鲜的如上所述的含有药物的培养基替换，将细胞再培养 2 小时。处理后，将平板在 Beckman GPR 中以 1200 rpm 的转速于室温离心 5 分钟，以使细胞碎屑从条件培养基中离心成团。从每个孔中将 100 μL 条件培养基或其适当稀释物转移到

ELISA 平板中并在 4℃ 培养过夜，其中所述平板是如国际专利申请出版物 No. 94/10569¹ 所述用抗 β -淀粉状蛋白肽的氨基酸 13-28 的抗体 266 [P. Seubert, *Nature* (1992) 359: 325-327] 预包被的。在第二天进行采用抗 β -淀粉状蛋白肽的氨基酸 1-5 的标记的抗体 3D6 [P. Seubert, *Nature* (1992) 359: 325-327] 的 ELISA 测定，以测定所产生的抗 β -淀粉状蛋白肽的量。

通过 Hansen 等人的方法的改进形式来测定本发明化合物的细胞毒害作用。向保留在组织培养平板内的细胞中加入 25 μ L 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物 (MTT) (Sigma, St. Louis, MO) 贮备液 (5 mg/mL)，使终浓度为 1 mg/mL。将细胞在 37℃ 培养 1 小时，通过加入相同体积的 MTT 裂解缓冲液 (20% w/v 十二烷基硫酸钠在 50% 二甲基甲酰胺中的溶液，pH 4.7) 来停止细胞活动。通过在室温振摇过夜来达到完全萃取。在 Molecular Device 的 UV_{max} 微量培养板读数器中测定在 OD_{562nm} 和 OD_{650nm} 的差异，以作为细胞活力的指标。

将 β -淀粉状蛋白肽 ELISA 的结果拟合成标准曲线，并以 ng/mL β -淀粉状蛋白肽表示。为了将细胞毒性规格化，将这些结果除以 MTT 结果，并以占不含药物的对照结果的百分比表示。所有结果都是至少 6 个平行测定的平均值和标准差。

实施例 B

体内抑制 β -淀粉状蛋白释放和/或合成

该实施例举例说明如何测试本发明化合物在体内抑制 β -淀粉状蛋白释放和/或合成。对于这些实验，使用 3-4 个月龄的 PDAPP 小鼠 [Games 等人, (1995) *Nature* 373: 523-527]。根据所测试的化合物，通常将化合物配制成 1-10 mg/mL 的浓度。由于化合物的低溶解性因素，可以用不同载体配制化合物，例如玉米油 (Safeway, South San Francisco, CA)；10% 乙醇在玉米油中的混合物；2-羟基丙基- β -环糊精 (Research Biochemicals International, Natick MA)；和羧甲基纤维素 (Sigma Chemical Co., St. Louis MO)。

用 26 号的针头给小鼠皮下给药，3 小时后，通过 CO₂ 麻醉法将动物安乐死，使用用 0.5 M EDTA 溶液，pH 8.0 包被的 1 cc 25G 5/8" 结核菌素注射器/针头通过心脏穿刺采集血液。将血液置于含有 EDTA 的 Becton Dickinson 采血管中，以 1500 $\times$ g 于 5℃ 离心 15 分钟。然后取

出小鼠的脑，将皮层和海马切下来，并置于冰上。

1. 脑测定

为了制备用于酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的海马和皮层组织，使用 Kontes 机动化研杵 (Fisher, Pittsburgh PA) 将每个脑区域在 10 体积冰冷的胍缓冲液 (5.0 M 胍-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 中均化。将匀浆在旋转平台上于室温轻微摇动 3-4 小时，在定量测定 β -淀粉状蛋白之前在 -20℃ 贮存。

将脑匀浆用冰冷的酪蛋白缓冲液 [0.25% 酪蛋白，磷酸盐缓冲盐水 (PBS), 0.05% 叠氮化钠, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抑酶肽, 5 mM EDTA, pH 8.0, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 亮抑蛋白酶肽] 进行 1:10 稀释由此将胍的终浓度降至 0.5 M，然后以 $16,000 \times g$ 于 4℃ 离心 20 分钟。如果需要的话，通过加入其中加有 0.5 M 盐酸胍的酪蛋白缓冲液将样本进一步稀释，以获得 ELISA 测定的最佳范围。制备 β -淀粉状蛋白标准物 (1-40 或 1-42 氨基酸)，使得最终的组合物等于在 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 存在下的 0.5 M 胍。

定量测定 β -淀粉状蛋白 (aa 1-40) 和 β -淀粉状蛋白 (aa 1-42) 的总的 β -淀粉状蛋白三明治 ELISA 由 β -淀粉状蛋白的两种单克隆抗体 (mAb) 构成。捕获抗体 266 [P. Seubert, Nature (1992) 359: 325-327] 对 β -淀粉状蛋白的氨基酸 13-28 是特异性的。对 β -淀粉状蛋白的氨基酸 1-5 有特异性的抗体 3D6 [Johnson-Wood 等人, PNAS USA (1997) 94: 1550-1555] 是生物素化的，并且在测定中起报道抗体的作用。3D6 生物素化操作采用的是生产商 (Pierce, Rockford IL) 有关免疫球蛋白的 NHS-生物素标记的方法，不同之处在于使用的是 100 mM 碳酸氢钠缓冲液，pH 8.5。3D6 抗体不识别分泌的淀粉状蛋白前体蛋白 (APP) 或全长的 APP，而是仅识别具有氨基末端天冬氨酸的 β -淀粉状蛋白。该测定的灵敏度下限为 $\sim 50 \text{ pg}/\text{ml}$ (11 pM)，并且在高达 1 ng/ml 的浓度下对内源性鼠 β -淀粉状蛋白肽不表现出交叉反应。

用于定量测定 β -淀粉状蛋白 (aa 1-42) 水平的三明治 ELISA 使用 mAb 21F12 [Johnson-Wood 等人, PNAS USA (1997) 94: 1550-1555] (识别 β -淀粉状蛋白的氨基酸 33-42) 作为捕获抗体。生物素化的 3D6 在灵敏度下限为 $\sim 125 \text{ pg}/\text{ml}$ (28 pM) 的该测定中也是报道抗体。

在室温将 266 和 21F12 捕获性 mAbs 以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的量在 96 孔免疫测定平板 (Costar, Cambridge MA) 内包被过夜。然后抽吸这些平板，在

室温用 0.25 % 人血清白蛋白在 PBS 缓冲液中的溶液阻断至少 1 小时, 然后在 4℃ 贮存干燥直至使用。在使用之前用洗涤缓冲液 (Tris-缓冲盐水, 0.05 % 吐温 20) 将平板再水合。将样本和标准物加到平板中, 并在 4℃ 培养过夜。在该测定的每个步骤之间用洗涤缓冲液将平板洗涤 3 次。将在酪蛋白培养缓冲液 (0.25 % 酪蛋白, PBS, 0.05 % 吐温 20, pH 7.4) 中稀释至 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的生物素化的 3D6 在孔中于室温培养 1 小时。将在酪蛋白培养缓冲液中进行 1:4000 稀释的 Avidin-HRP (Vector, Burlingame CA) 加到孔中, 在室温培养 1 小时。加入比色物质 Slow TMB-ELISA (Pierce, Cambridge MA), 并反应 15 分钟, 之后, 加入 2 N H_2SO_4 停止酶反应。使用 Molecular Devices Vmax (Molecular Devices, Menlo Park CA) 通过测定在 450 nm 和 650 nm 的吸收度差异来定量测定反应产物。

2. 血液测定

将 EDTA 血浆在样本稀释液 (0.2 gm/l 磷酸钠 $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (一碱价), 2.16 gm/l 磷酸钠 $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (二碱价), 0.5 gm/l 硫柳汞, 8.5 gm/l 氯化钠, 0.5 ml Triton X-405, 6.0 g/l 不含球蛋白的牛血清白蛋白; 和水) 中作 1:1 稀释。使用上述用于脑测定的总 β -淀粉状蛋白测定 (266 捕获/3D6 报道), 但是用所述样本稀释液代替上述酪蛋白稀释液, 来测定样本稀释液中的样本和标准物。

通过上文的描述, 本领域技术人员可对本发明组合物和方法作不同的修改和改变。在本申请权利要求书范围内的所有这样的修改都包括在本发明中。