

Данное изобретение относится к области фармацевтической и органической химии и касается соединения, которое ингибитирует высвобождение  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтез.

**Предпосылки к созданию изобретения**

Некоторые лактамы, которые ингибируют высвобождение  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтез и, следовательно, применимы для лечения болезни Альцгеймера, описаны в международной заявке № PCT/US 97/22986.

Соединение по данному изобретению (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он применимо для ингибирования высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза и, следовательно, применимо для лечения болезни Альцгеймера и имеет полезные эффективные и безопасные свойства.

**Краткое описание изобретения**

Данное изобретение относится к соединению (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-ону.

В одном из аспектов способа, данное изобретение относится к способу ингибирования высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она. В конкретном варианте способа, данное изобретение относится к способу лечения болезни Альцгеймера, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она. Данное изобретение также относится к способу предотвращения или ингибирования прогрессирования болезни Альцгеймера, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

В другом варианте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он и фармацевтически приемлемый разбавитель. Такие композиции применимы для ингибирования высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза, включая лечение болезни Альцгеймера.

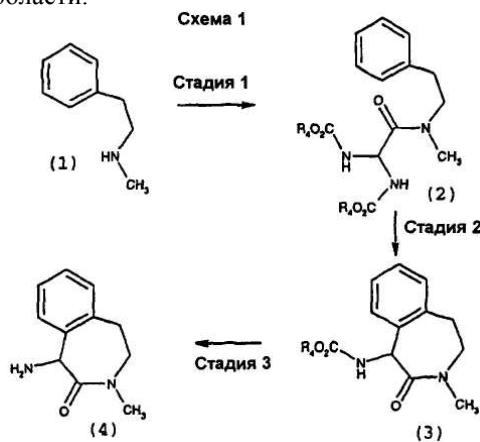
**Подробное описание изобретения**

Значения используемых терминов приведены ниже.

Термин "ее" или "энантиомерный избыток" относится к выраженному в процентах избытку одного энантиомера,  $E_1$ , в смеси обоих энантиомеров ( $E_1 + E_2$ ), который рассчитывают по уравнению  $((E_1-E_2)/(E_1+E_2)) \times 100\% = ee$ . Как хорошо известно в данной области, энантиомерный избыток может быть определен капиллярным электрофорезом и хиральной ВЭЖХ данных соединений или их производных.

В данном описании обозначения Cahn-Prelog-Ingold (R)- и (S)- и обозначения L- и D- для стереохимии изомеров глицеральдегида используются для ссылки на конкретные изомеры.

Соединение по данному изобретению может быть получено, как описано ниже. На схемах ниже все заместители, если не указано иначе, являются такими, как определено в данном описании, и все реагенты известны и приняты в данной области.



На схеме 1 стадия 1 N-метилфенэтиламин формулы (1) ацилируют подходящим бисалоксикарбонилацилацил-переносом, получая соединение формулы (2). N-метилфенэтиламин коммерчески доступен и его легко можно получить при взаимодействии 2-бром- или 2-хлорэтилбензола с метиламином в условиях, хорошо известных и принятых в данной области. Подходящий бисалоксикарбонилацилацил-переносом, такой как бисалоксикарбонилуксусные кислоты и бисалоксикарбонилацилхлориды, имеет R<sub>4</sub>, который означает C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкил и переносит бисалоксикарбонилацильную группу к соединению формулы (1). (См. Ben-Ishai. *Tetrahedron*, 43, 439-450 (1987)).

Например, соединение формулы (1) контактируют с подходящей бисалоксикарбонилуксусной кислотой, получая соединение формулы (2). Такие реакции сочетания являются обычными в синтезе пеп-

тидов, и применяемые там способы синтеза могут быть использованы. Для облегчения указанного ацилирования могут быть использованы, например, хорошо известные реагенты сочетания, такие как карбодимииды с хорошо известными добавками, такими как N-гидроксисукцинимид, 1-гидроксибензотриазол и т.п., или без них. В таких реакциях сочетания часто используют основание для связывания кислоты, образующейся во время реакции. К подходящим основаниям относятся, например, триэтиламин, N,N-дизопропилэтиламин, N-метилморфолин и тому подобное. Реакцию обычно проводят в инертном аprotонном полярном разбавителе, таком как диметилформамид, метиленхлорид, хлороформ, ацетонитрил, тетрагидрофуран и тому подобное. Обычно реакцию проводят при температуре от примерно 0°C до примерно 60°C, и обычно она требует от примерно 1 до примерно 24 ч. После завершения реакции продукт формулы (2) извлекают обычными способами, включая экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание, кристаллизацию и тому подобное.

Альтернативно, например, соединение формулы (1) контактируют с подходящим бисалоксикарбонилацетилхлоридом, получая соединение формулы (2). Такие хлорангидриды кислот легко получают из соответствующих кислот хорошо известными в данной области способами, например, воздействием на них трихлоридом фосфора, оксихлоридом фосфора, пентахлоридом фосфора, тионилхлоридом или оксалихлоридом с небольшим количеством диметилформамида или без него в инертном растворителе, таком как толуол, метиленхлорид или хлороформ, при температуре примерно 0-80°C. Реакцию обычно проводят в течение периода времени от 1 до 24 ч. Хлорангидрид кислоты может быть выделен и очищен или часто может быть использован непосредственно, то есть с выделением или без него и с очисткой или без нее. В таких реакциях ацилирования обычно используют подходящее основание для связывания кислоты, образующейся во время реакции. К подходящим основаниям относятся, например, пиридин, триэтиламин, N,N-дизопропилэтиламин, N-метилморфолин и тому подобное. Реакцию обычно проводят в инертном аprotонном полярном разбавителе, таком как метиленхлорид, хлороформ, тетрагидрофуран и тому подобное. Обычно реакцию проводят при температуре от примерно -20°C до примерно 80°C, и обычно она требует от примерно 1 до примерно 24 ч. После завершения реакции продукт формулы (2) извлекают обычными способами, включая экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание, кристаллизацию и тому подобное.

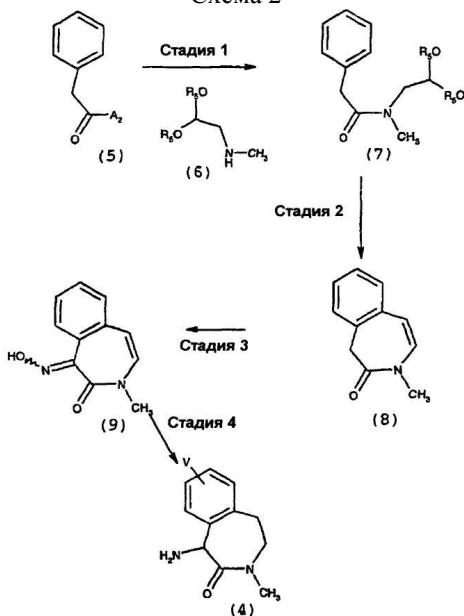
На схеме 1, стадия 2, соединение формулы (2) подвергают циклизации, получая соединение формулы (3).

Например, соединение формулы (2) контактируют с кислотой, такой как метансульфоновая кислота или серная кислота. Реакцию обычно проводят, используя выбранную кислоту в качестве растворителя. Обычно реагенты вначале смешивают при температуре от примерно -20°C до примерно 0°C и затем дают нагреваться до температур от примерно температуры окружающей среды до примерно 60°C. Реакция циклизации обычно требует от примерно 12 до примерно 72 ч. После завершения реакции продукт формулы (3) извлекают обычными способами, включая экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание, кристаллизацию и тому подобное.

На схеме 1, стадия 3, из соединения формулы (3) удаляют защитные группы, получая соединение формулы (4).

Удаление таких аллоксикарбонил защитных групп амина хорошо известно и принято в данной области. Например, см. "Защитные группы в органическом синтезе", Теодора Грин (1-е и 2-е издания, Wiley-Interscience) и Ben-Ishai, *Tetrahedron*, 43, 439-450 (1987)).

Схема 2



На схеме 2, стадия 1, подходящую фенилуксусную кислоту формулы (5) связывают с подходящим ацеталем формулы (6), получая соединение формулы (7). Подходящей фенилуксусной кислотой формулы (5) является такая, где  $A_2$  означает активированную группу, например,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{Cl}$  или  $-\text{Br}$ . Подходящим ацеталем формулы (6) является такой, где  $R_5$  означает  $C_1\text{-}C_4$  алкил. Такие реакции сочетания обычны в синтезе пептидов, и используемые там способы синтеза могут быть использованы, как описано на схеме 1, стадия 1.

Также сочетание, указанное на схеме 2, стадия 1, может быть проведено в условиях Schotten-Baumann с использованием галогенангидрида кислоты соединения формулы (5) и подходящего ацетала формулы (6) в смешанном растворителе, таком как метил-трет-бутиловый эфир, этилацетат, тетрагидрофуран, ацетон или диэтиловый эфир и вода. Такие реакции проводят, используя подходящее основание, такое как гидроксид натрия, гидроксид калия, карбонат натрия, карбонат калия, бикарбонат натрия или бикарбонат калия. Обычно реакционную смесь перемешивают или энергично взбалтывают и поддерживают при температуре от примерно  $-20^\circ\text{C}$  до примерно  $80^\circ\text{C}$ , и реакция обычно требует от примерно 1 до примерно 24 ч. После завершения реакции продукт формулы (7) извлекают обычными способами, включая экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание, кристаллизацию и тому подобное.

На схеме 2, стадия 2, соединение формулы (7) подвергают циклизации, получая соединение формулы (8). Такие реакции циклизации обычно проводят в кислоте, такой как серная кислота. Обычно кислоту используют в качестве растворителя. Как правило, реакцию проводят при температуре от примерно  $-20^\circ\text{C}$  до примерно  $150^\circ\text{C}$ , и обычно она требует от примерно 1 до примерно 24 ч. После завершения реакции продукт формулы (8) извлекают обычными способами, включая экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание, кристаллизацию и тому подобное.

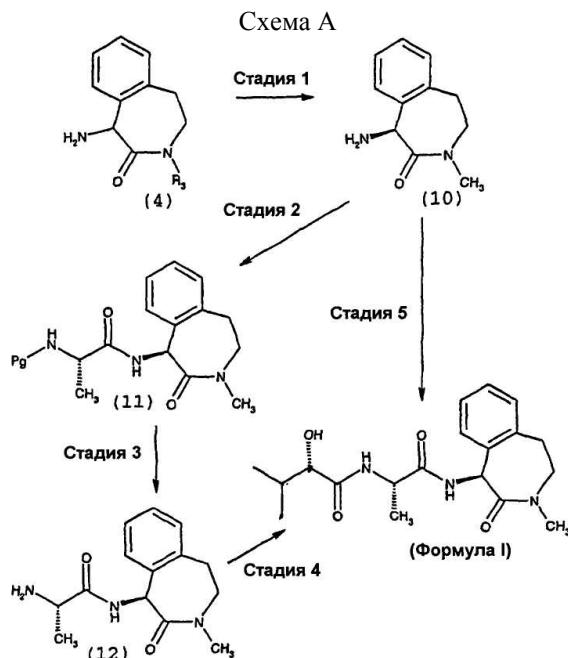
На схеме 2, стадия 3, соединение формулы (8) подвергают реакции переноса амина, получая соединение формулы (9). На схеме 2 показана оксимизация. Такую оксимацию осуществляют при контактировании енолята соединения формулы (8) с оксимными реагентами переноса, такими как сложный эфир алкилнитрита. Енолят соединения формулы (8) может быть получен при взаимодействии соединения формулы (8) с подходящим основанием, таким как трет-бутоксид калия, дизопропиламид лития, гексаметилсилазид лития, гексаметилсилазид натрия, гексаметилсилазид калия и тому подобное. Примеры таких реакций оксиминирования приведены Wheeler, et al., *Organic Synthesis, Coll. Vol. VI*, p. 840, где описано взаимодействие изоамилнитрита с кетоном для получения требуемого оксима. Реакцию обычно проводят в растворителе, таком как тетрагидрофуран. Как правило, реакцию проводят при температуре от примерно  $-20^\circ\text{C}$  до примерно  $50^\circ\text{C}$ , и обычно она требует от примерно 1 до примерно 24 ч. После завершения реакции продукт формулы (8) извлекают обычными способами, включая экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание, кристаллизацию и тому подобное.

Альтернативно, такая реакция переноса амина может быть осуществлена через азид. Азид может быть образован при взаимодействии енолята соединения формулы (8) с азидным реагентом переноса, таким как толуолсульфонилазид и триизопропилбензолсульфонилазид. Примеры такого взаимодействия приведены Evans, et al., в *J. Am. Chem. Soc*, 112:4011-4030 (1990) 41. Реакцию обычно проводят в растворителе, таком как тетрагидрофуран. Как правило, реакцию проводят при температуре от примерно  $-20^\circ\text{C}$  до примерно  $50^\circ\text{C}$ , и обычно она требует от примерно 1 до примерно 24 ч. После завершения реакции продукт формулы (8), имеющий азид вместо оксима, извлекают обычными способами, включая экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание, кристаллизацию и тому подобное.

Как показано на схеме 2, стадия 4, оксим восстанавливают до соединения формулы (4). Такие восстановления осуществляют обработкой водородом и подходящим катализатором, таким как никель Ренея или палладиевые катализаторы, такие как палладий на углероде. Реакцию обычно проводят в растворителе, таком как тетрагидрофуран, этилацетат или низшие спирты, такие как метанол, этанол и изопропанол, в уксусной кислоте, воде, водном аммиаке и тому подобное, и их смесях. Реакцию, как правило, проводят при давлении водорода в пределах от атмосферного давления до примерно 600 фунтов на кв. дюйм (4137 кПа). Как правило, реакцию проводят при температуре от примерно  $20^\circ\text{C}$  до примерно  $100^\circ\text{C}$ , и обычно она требует от примерно 1 до примерно 24 ч. После завершения реакции продукт формулы (4) извлекают обычными способами, включая экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание, кристаллизацию и тому подобное.

Альтернативно, когда перенос амина осуществляют через азид, азидогруппу восстанавливают. Такое восстановление проводят гидрированием, как описано выше.

Способы получения (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она приведены на схеме А.



На схеме А, стадия 1, представлено стереохимическое разделение соответствующего лактама формулы (4), получая лактам формулы (10), то есть по существу чистый (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он. Используемый здесь термин «по существу чистый» относится к энантиомерной чистоте (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она.

Согласно данному изобретению, по существу чистый (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он может быть получен с содержанием (S)-энантиомера более чем 80%, предпочтительно более чем 90%, более предпочтительно более чем 95%, наиболее предпочтительно более чем 97%.

Например, (S)-изомер соединения формулы (4) может быть выделен фракционной кристаллизацией дibenзоилтартрата, R-(-)-d-камфорсульфоновой кислоты и солей (D)-(-)-миндалевой кислоты. Предполагается, что для этой цели подходит широкое разнообразие дibenзоилтартратов. В частности, предпочтительны дibenзоиловые сложные эфиры, имеющие заместитель в пара-положении, выбранный из группы, состоящей из водорода, галогена, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкила и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкокси, и предпочтителен ди-п-толуоилтартрат. ди-п-Толуоил-L-тартрат используют для получения (S)-изомера.

Согласно данному способу, соединение формулы (4) контактируют с выбранной кислотой. Обычно может быть использовано от примерно 0,4 молярных эквивалентов до значительного избытка выбранной кислоты, предпочтительно примерно 0,4-1,5 молярных эквивалентов и более предпочтительно 0,5-1,1 молярных эквивалентов.

Способ обычно осуществляют путем кристаллизации кислотноаддитивной соли из раствора. В частности, растворители, такие как низшие спирты, включая метанол, этанол, н-пропанол, изопропанол, бутанол, втор-бутанол, изобутанол, трет-бутанол, амиловый спирт, изоамиловый спирт, трет-амиловый спирт, гексанол, циклопентанол и циклогексанол являются подходящими, предпочтительны метанол, этанол и изопропанол. Может быть выгодным применение антирастворителя. Используемый термин «антирастворитель» относится к растворителю, в котором соль значительно менее растворима по сравнению с растворителем. Предпочтительно, чтобы, когда используют антирастворитель, он был смешивающимся с выбранным растворителем. К подходящим антирастворителям относятся простые эфиры, такие как диэтиловый эфир, метил-трет-бутиловый эфир и тому подобное, и низшие алкилацетаты, такие как метилацетат, этилацетат, изопропилацетат, пропилацетат, изобутилацетат, втор-бутилацетат, бутилацетат, амилацетат, изоамилацетат и тому подобное, и алканы, такие как пентан, гексан, гептан, циклогексан и тому подобное. Когда данный способ осуществляют путем кристаллизации кислотноаддитивной соли из рацемической смеси, следует позаботиться об использовании антирастворителя, чтобы избежать кристаллизации нежелательной диастереомерной соли.

Обычно кристаллизацию проводят при начальной температуре примерно 40°C до температуры дефлекции выбранного растворителя (растворителей) и при начальных концентрациях от примерно 0,05 молярной до примерно 0,25 молярной. Смесь затем охлаждают, получая соль. Может быть выгодным внесение затравки. Может быть выгодным перемешивание первоначального осадка от примерно 4 до 48 ч. Предпочтительно кристаллизационный раствор охлаждают медленно. Кристаллизационный раствор наиболее подходящие охлаждают до температуры в диапазоне от температуры окружающей среды до примерно -20°C. Соль может быть собрана с использованием методик, которые хорошо известны в данной области, включая фильтрование, декантацию, центрифугирование, выпаривание, сушку и тому подобное. Соединение формулы (10) может быть использовано непосредственно в виде кислотноаддитив-

ной соли выбранной кислоты. Альтернативно, после кислотного обмена перед использованием соединение формулы (10) может быть выделено в виде другой кислотноаддитивной соли или может быть выделено в виде основания путем экстракции в основных условиях, как это хорошо известно и принято в данной области.

Предпочтительный способ дает (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он по существу энантиомерной чистоты путем кристаллизации 1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она в виде его аддитивной соли кислоты, выбранной из группы, состоящей из ди-*p*-толил-L-винной кислоты, (R)-(-)-д-камфорсульфоновой кислоты и (D)-(-)-миндальной кислоты, как динамический процесс в присутствии ароматического альдегида. Динамический процесс имеет то преимущество, что 1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он подвергается превращению в единственный изомер во время кристаллизации, улучшая таким образом выход и исключая поток отходов, который содержит нежелательный изомер.

Предполагается, что широкое разнообразие ароматических альдегидов подходит для динамического процесса, при этом было обнаружено, что на практике особенно подходящими являются несколько альдегидов. Конкретно, было обнаружено, что в данном динамическом процессе разделения предпочтительны салициловые кислоты и более предпочтительными являются салицилальдегид, 5-нитросалицилальдегид и 3,5-дихлорсалицилальдегид.

Соответственно, когда данный способ осуществляют как динамическое разделение, 1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он контактируют с выбранной кислотой в присутствии ароматического альдегида. Как правило, для динамического разделения используют от примерно 0,9 до 1,2 молярных эквивалентов кислоты, предпочтительно примерно до 1 молярного эквивалента. Ароматический альдегид используют обычно в каталитическом количестве. Обычно используют от примерно 0,5 до 0,001 молярного эквивалента ароматического альдегида, предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 0,01 молярного эквивалента.

Динамический процесс обычно проводят в растворителе без антирастворителя, как описано выше. Смесь 1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она, выбранной кислоты и ароматического альдегида перемешивают, чтобы способствовать превращению в требуемый изомер. Обычно такое превращение проводят при температуре в диапазоне от температуры окружающей среды до температуры дефлекции растворителя. Обычно превращение требует от 6 до 48 ч.

Как должно быть понятно специалисту, когда данный процесс осуществляют как динамическое разделение, использование кислотноаддитивной соли (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она может быть осложнено присутствием небольшого количества ароматического альдегида в выделенном продукте. Поэтому после динамического разделения предпочтительно выделить (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он путем солевого обмена, предпочтительно в виде гидрохлоридной соли, перед его применением или образованием основания.

Схема А, стадия 2, представляет реакцию сочетания подходящего аминозащищенного аланина формулы PgNH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-C(O)-A и подходящего лактама формулы (10). Подходящим аминозащищенным аланином является такой, в котором Pg означает защищающую амин группу, который имеет L-конфигурацию, и где A означает активирующую группу, например, -OH или -Cl, способную к сочетанию с аминогруппой соединения формулы (10). Такие аминозащищенные аланины легко доступны для специалиста в данной области.

Реакция сочетания, показанная на схеме реакции А, стадия 2, включает реакцию, которую обычно проводят для синтеза пептида, и используемые там способы синтеза также могут быть использованы. Такие способы описаны подробно на схеме 1, стадия 1.

Схема реакции А, стадия 3, изображает удаление защитных групп соединения формулы (11), получая соединение формулы (12). Такое удаление аминозащитных групп хорошо известно и принято в данной области.

Схема реакции А, стадия 4, представляет реакцию сочетания подходящего соединения формулы (13), (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-CH<sub>2</sub>OH-C(O)-A<sub>2</sub> и соединения формулы (12) для получения соединения формулы I. S-Изомер соединения формулы (13) коммерчески доступен и хорошо известен в данной области, включая международную заявку PCT/US 97/22986, поданную 22 декабря 1997. Реакцию сочетания, показанную на стадии 3, проводят с использованием кислоты формулы (13) (соединения, где A<sub>1</sub> означает -OH) или полученного из нее галогенангидрида кислоты (соединения, где A<sub>1</sub> означает -Cl или -Br) способом, подобно приведенному на схеме 1, стадия 1.

Альтернативный способ получения соединений формулы I приведен на схеме А, стадия 5, где показана реакция сочетания подходящего соединения формулы (10) и подходящего соединения формулы (14), (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-CH<sub>2</sub>OH-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-C(O)A<sub>2</sub>, чтобы непосредственно получить соединение формулы I. Подходящее соединение формулы (10) описано на стадии 2. Подходящим соединением формулы 14 является такое, которое имеет стереохимию, как требуется в конечном продукте формулы I.

Соединения формулы (14) легко получают сочетанием карбоксизащищенных аминокислот, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-C(O)OPg<sub>1</sub>, с соединениями формулы (13), как описано выше. К тому же, такие реакции сочетания хорошо известны в данной области и дают продукт, который после удаления защитных групп обеспечи-

вает соединение формулы (14).

Соединение формулы I может быть выделено и очищено многими методами, включая кристаллизацию. Могут быть использованы методы кристаллизации из раствора и сус펜дирования. В частности, соединение по данному изобретению может быть получено кристаллизацией из разнообразных безводных и водных растворителей. Подходящие растворители: ацетон, низшие спирты (подобно метанолу, этианолу и изопропанолу), уксусная кислота и ацетонитрил с водой или без воды и этилацетат, диэтиловый эфир и метил-трет-бутиловый эфир. На практике обнаружено, что предпочтительным является водный ацетон. Для данного водного растворителя количество используемой воды будет зависеть от относительной растворимости (N)-(S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она в растворителе по сравнению с водой и от того, какой используют метод, кристаллизации или сус펜дирования.

Кристаллизацию обычно проводят, растворяя (N)-(S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он в водном растворителе и оставляя раствор остывать, с добавлением еще воды или без добавления, получая твердое вещество. Обычно кристаллизацию проводят при начальных температурах от примерно 40°C до температуры дефлегмации выбранного водного растворителя. Смесь затем охлаждают, получая кристаллический дигидрат. Затравка может быть полезной. Предпочтительно кристаллизационный раствор охлаждают медленно. Кристаллизационную смесь наиболее удобно охладить до температуры в диапазоне от температуры окружающей среды до примерно -20°C.

Данное изобретение далее иллюстрируется следующими примерами и препаратаами. Данные примеры и препараты являются только пояснительными и не предназначены для какого-нибудь ограничения изобретения.

Термины, используемые в примерах и препаратах, имеют их обычные значения, если не указано иначе. Например, «°С» относится к градусам Цельсия; «ммоль» относится к миллимолям или миллимолям; «г» относится к грамму или граммам; «мл» относится к миллилитру или миллилитрам; «насыщенный раствор соли» относится к насыщенному водному раствору хлорида натрия; «ТГФ» относится к тетрагидрофурану; «ВЭЖХ» относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии и т.д.

Пример 1. Синтез 1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она.

К сусpenзии гидрида натрия (1,1 экв.) в 15 мл сухого ДМФ добавляют 4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (0,0042 моль) в виде раствора в 10 мл ДМФ. Затем добавляют метилюодид (около 2 экв.). Когда согласно ТСХ реакция заканчивается, реакционную смесь выливают на лед и экстрагируют в этилацетат. Органический слой промывают водой, затем насыщенным раствором соли. Органический слой затем сушат над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Остаток очищают ВЭЖХ (LC 2000), элюируя системой этилацетат/гексан, получая 3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он.

3-Метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (1 экв.) растворяют в ТГФ и добавляют изоамилнитрит (1,2 экв.). Смесь охлаждают до 0°C на ледяной бане. Добавляют по каплям NaHMDS (1,1 экв., 1М в ТГФ). После перемешивания в течение 1 ч или до тех пор, пока не закончится реакция, смесь концентрируют, затем подкисляют 1н. водным раствором хлористоводородной кислоты и экстрагируют этилацетатом. Органическую часть сушат и концентрируют, получая неочищенный продукт, который очищают хроматографией на силикагеле, с получением 1-гидроксимино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он.

Масс-спектрометрия (M+H)<sup>+</sup>, 205,1.

1-Гидроксимино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он растворяют в EtOH/NH<sub>3</sub> (20:1) и гидрируют в сосуде высокого давления, используя никель Ренея и водород (500 фунтов на кв. дюйм/3447 кПа) при 100°C в течение 10 ч. Полученную смесь фильтруют и концентрируют, получая масло, которое очищают хроматографией на силикагеле с получением указанного в заголовке соединения.

Пример 2. Синтез 1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она.

В 20 л колбу Мортона добавляют МТВЕ (5,52 л, 7 объемов) и диметилацеталь (N-метиламино)ацетальдегид (614 г, 5 моль), получая раствор при комнатной температуре. Раствор бикарбоната натрия, полученный добавлением бикарбоната натрия (546 г, 6,5 моль) и воды (6,31 л, 8 объемов) добавляют в реакционную колбу Мортона. Смесь охлаждают до температуры менее чем 10°C и добавляют по каплям раствор фенилацетилхлорида (789 г, 5 моль) в МТВЕ (78 9 мл) к охлажденной реакционной смеси в течение 1 ч. После добавления реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. На данной стадии анализ ВЭЖХ показывает, что реакция завершена. Экстракционная обработка МТВЕ (4 объема), сушка безводным сульфатом магния с последующим концентрированием на роторном испарителе дает 1,187 кг (98%) N-метил-N-(2,2-диметоксизтил)фенилацетамида в виде жидкости, (M+H)<sup>+</sup>=237,9. В 5 л колбу Мортона в стойкой атмосфере азота добавляют H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (1,42 л) и добавляют по каплям N-метил-N-(2,2-диметоксизтил)фенилацетамид (712 г, 3 моль) в реакционную колбу, что вызывает экзотермический эффект (22 до 78°C). Полученную реакционную смесь нагревают затем до 110°C в течение 3 ч, затем охлаждают до комнатной температуры и переносят в 20 л колбу Мортона. При тем-

пературе менее чем 10°C реакционную смесь резко гасят водным гидроксидом натрия (9,18 л, 5н.). Экстракционная обработка этилацетатом (2 x 2,85 л), сушка сульфатом натрия с последующим концентрированием до твердого вещества дает 520 г (73,5%) 3-метил-6,7-дигидро-2Н-3-бензазепин-2-она в виде твердого вещества. Данное вещество может быть подвергнуто перекристаллизации из МТВЕ для дополнительной очистки, получая твердое вещество, т.пл.=81-82°C; (M+H)<sup>+</sup>=174,2.

Раствор 3-метил-6,7-дигидро-2Н-3-бензазепин-2-она (113,8 г, 0,657 моль) в ТГФ (0,5 л) охлаждают до 0°C и добавляют по каплям изоамилнитрит (100,75 г, 0,86 моль). К полученной смеси добавляют LiHMDS (1н. раствор в ТГФ, 854 мл, 0,854 моль) с такой скоростью, что температура остается ниже 10°C. После добавления реакционную смесь продолжают перемешивать при комнатной температуре в течение 2-3 ч, отслеживая протекание реакции с использованием ВЭЖХ. После завершения реакции смесь охлаждают до 0°C и доводят pH от 12 до 2-3, используя водную HCl (2н.). Полученный осадок перемешивают в течение 12-16 ч перед выделением фильтрованием и сушат, получая 86,3 г (64,9%) 1-гидроксиимино-3-метил-6,7-дигидро-2Н-3-бензазепин-2-она; т.пл.=225-226°C; (M+H)<sup>+</sup>=203,0.

Раствор 1-гидроксиимино-3-метил-6,7-дигидро-2Н-3-бензазепин-2-она (35 г, 0,173 моль) в этаноле (525 мл) добавляют в автоклав вместе с палладием на углероде (10%, 3,5 г) в виде суспензии в разбавленной HCl (концентрированная водная, 17,5 г в 17 мл воды). Полученную смесь гидрируют при 50°C и 250 фунт на кв. дюйм (1723 кПа), пока реакция не завершится. Реакционную смесь фильтруют через слой целината, используя этанол в качестве растворителя, и фильтрат концентрируют до 90 мл. К концентрату добавляют воду (350 мл) и полученный раствор дополнительно концентрируют до примерно 200 мл. Ди-хлорметан (350 мл) добавляют к водному раствору перед доведением pH до 11-11,5 водным гидроксидом натрия (1 н.). Органическую часть отделяют и водную часть экстрагируют ди-хлорметаном (175 мл). Объединенные экстракты концентрируют до остатка, который кристаллизуется при стоянии, получая указанное в заголовке соединение: т.пл.=69-81°C; (M+H)<sup>+</sup>=191,0.

Пример 3. Синтез 1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она. В 22 л колбу Мортона добавляют ди-хлорметан (4,73 л, 8 объемов), N-метилфенэтиламин (591 г, 4,33 моль) и водный бикарбонат натрия (436,7 г, 5,2 моль в 4,73 л воды). Смесь охлаждают до менее чем 5°C и в охлажденную реакционную смесь добавляют по каплям раствор хлорацетилхлорида (513,7 г, 4,55 моль) в ди-хлорметане (887 мл) в течение периода 70 мин. После добавления анализ ВЭЖХ показывает, что реакция завершена. Слои разделяют и водный слой экстрагируют ди-хлорметаном.

Объединенные органические слои сушат над безводным сульфатом магния и концентрируют на роторном испарителе, получая 915,7 г (99,8%) N-метил-N-(2-фенилэтил)-1-хлорацетамида: (M+H)=212,1.

В 12 л колбу в атмосфере азота добавляют N-метил-N-(2-фенилэтил)-1-хлорацетамида (883,3 г, 4,17 моль) и орто-ди-хлорбензол (6,18 л). Добавляют хлорид алюминия (1319 г, 10,13 моль), что вызывает экзотермический эффект (от 22 до 50°C). Полученную реакционную смесь нагревают затем до 165°C в течение 2,5 ч, затем охлаждают до комнатной температуры в течение примерно 14 ч. Реакционную смесь охлаждают до примерно 0°C и добавляют к холодной воде (8,86 л, примерно 5°C) четырьмя порциями для поддержания экзотермической реакции до примерно 40°C. Слои разделяют, водный слой экстрагируют ди-хлорметаном (7,07 л) и слои разделяют. Органические слои объединяют и экстрагируют водной хлористоводородной кислотой (8,83 л, 1н.) и затем насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (7,07 л), сушат над сульфатом магния, объединяют с силикагелем (883 г) и переносят в колонку с силикагелем (3,53 кг, в спеченной стеклянной воронке, набивка в виде суспензии в ди-хлорметане). Колонку элюируют ди-хлорметаном до тех пор, пока не будет собрано 25 л, и затем этилацетатом, получая продукт. Фракцию, содержащую продукт, выпаривают до получения 3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она в виде желтовато-коричневого твердого вещества, 608 г, (83%).

В 22 л колбу в атмосфере азота добавляют 3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (606 г, 3,46 моль) и изоамилнитрит (543 г, 4,5 моль) в ТГФ (7,88 л). Смесь охлаждают до примерно 0°C перед добавлением LiHMDS (1н. раствор в ТГФ, 4,5 л, 4,5 моль), который добавляют с такой скоростью, что температура остается ниже 7°C. После добавления реакционную смесь оставляют перемешиваться при комнатной температуре в течение примерно 2 ч, отслеживая протекание реакции путем ВЭЖХ. После завершения реакции смесь охлаждают до примерно 0°C и доводят pH от 12 до примерно 2-1, используя водную HCl (2 н.). Полученный осадок перемешивают примерно 6 ч перед выделением фильтрованием и сушат, получая 1-гидроксиимино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он 604,7 г (85,6%).

Раствор 1-гидроксиимино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (625 г, 3,06 моль) в этаноле 3А (15,6 л) в виде суспензии в разбавленной HCl (концентрированная водная хлористоводородная кислота, 312 г в 320 мл H<sub>2</sub>O) добавляют в автоклав вместе с палладием на углероде (10%, 120 г). Полученную смесь гидрируют при 50°C и 250 фунт на кв. дюйм (1723 кПа) с энергичным взбалтыванием, пока реакция не завершится (около 4 ч). Реакционную смесь фильтруют через слой целината, используя в качестве растворителя этанол, и фильтрат концентрируют, получая твердое вещество. Твердое вещество обрабатывают ди-хлорметаном (6 л) и добавляют 1н. водный раствор гидроксида натрия до pH водного слоя между 11-11,5. Смесь перемешивают, слои разделяют и водный слой экстрагируют ди-хлорметаном (2 л). Органические слои сушат над сульфатом магния, фильтруют и выпаривают на роторном испарителе, получая указанное в заголовке соединение 477 г (81,9%).

Пример 4. Синтез (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она.

1-Амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (1,544г, 8,12 ммоль) осторожно нагревают в 15 мл метанола, получая раствор. В другой колбе ди-п-толуоил-1-винную кислоту (3,12 г, 8,08 ммоль) растворяют в 15 мл метанола и добавляют с помощью пипетки к теплому раствору амина. Смесь нагревают, когда твердые вещества осаждаются. Дополнительные 30 мл метанола добавляют, получая раствор, который кипятят с обратным холодильником в течение 30-40 минут и затем медленно охлаждают до температуры окружающей среды, получая твердое вещество. После перемешивания в течение примерно 18 ч, твердое вещество собирают фильтрованием и промывают небольшим количеством холодного метанола, получая 2,24 г соли ди-п-толуоил-L-винной кислоты (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она (выход 96%, 94,7% ее).

Соль ди-п-толуоил-L-винной кислоты (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она (11,83 г, 20,5 ммоль) растворяют в 45 мл водного 1,0н. раствора гидроксида натрия и экстрагируют метиленхлоридом (3 x 25 мл). Объединенные слои метиленхлорида промывают 35 мл водного 1,0н. раствора гидроксида натрия, затем насыщенным раствором соли и сушат над безводным  $MgSO_4$ . Удаление растворителя в вакууме дает указанное в заголовке соединение (3,38 г) в виде бесцветного масла (выход 87%, 93,2% ее).

Пример 5. Синтез (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она.

1-Амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (6,0 г, 31,5 ммоль) осторожно нагревают в 75 мл метанола, получая раствор и объединяют с раствором ди-п-толуоил-L-винной кислоты (12,2 г, 31,5 ммоль) в 75 мл теплого метанола. В раствор вносят затравку и получают твердое вещество. Добавляют еще 100 мл метанола и смесь оставляют перемешиваться. После перемешивания в течение примерно 18 ч твердое вещество собирают фильтрованием и промывают небольшим количеством холодного метанола, получая 6,7 г твердого вещества. Твердое вещество объединяют с метанолом (200 мл) и перемешивают. Спустя 18 ч, твердое вещество собирают, получая соль ди-п-толуоил-L-винной кислоты (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она (4,4 г). Выделение основания по методике, описанной в примере 4, дает указанное в заголовке соединение (96% ее).

Пример 6. Синтез (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она.

В 22 л сосуде в атмосфере азота нагревают 1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (438 г, 2,3 моль) (примерно 40°C), получая раствор в метаноле (4,38 мл). В другой колбе ди-п-толуоил-1-винную кислоту (889,7 г, 2,3 моль) растворяют в 4,38 л метанола и нагревают до примерно 40°C перед добавлением раствора 1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она. Нагревание продолжают и добавляют еще 6,13 л метанола перед кипячением смеси с обратным холодильником примерно 45 мин и затем медленно охлаждают до температуры окружающей среды, получая твердое вещество. После перемешивания в течение примерно 18 ч твердое вещество собирают фильтрованием, промывают небольшим количеством маточной жидкости и после воздушной сушки около 2 л этилацетата, получая 561,6 г соли ди-п-толуоил-L-винной кислоты (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она. Объединяют соль ди-п-толуоил-L-винной кислоты (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она, дихлорметан (6,57 л) и 1н. водный раствор гидроксида натрия (6,57 л) и перемешивают. Разделяют слои и экстрагируют органический слой дважды 1н. водным раствором гидроксида натрия (3,28 л), один раз насыщенным раствором соли (2,46 л), сушат над сульфатом магния, фильтруют и выпаривают на роторном испарителе, получая указанное в заголовке соединение 250 г (57,4%, 94,1% ее).

Пример 7. Синтез соли хлористо-водородной кислоты (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она.

1-Амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (31,9 г, 168 ммоль) суспензируют в примерно 300 мл изопропилацетата и нагревают до 45°C. В отдельной колбе (R)-(-)-D-миндальную кислоту (25,0 г, 164 ммоль) нагревают в примерно 130 мл изопропилового спирта, пока не образуется раствор и добавляют к суспензии 1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он/изопропилацетат, полученной выше, получая раствор, из которого быстро образуется осадок. Смесь перемешивают при 45°C около 3 ч. К теплому раствору добавляют 5-нитросалицилальдегид (2-гидрокси-5-нитробензальдегид) (1,40 г, 8,38 ммоль, 5 мол.%) и смесь перемешивают при 45°C. Приблизительно через 14 ч суспензию охлаждают до температуры окружающей среды и перемешивают в течение 2 ч, затем твердые вещества собирают фильтрованием, промывают 70 мл холодного изопропилацетата и сушат в вакуумной печи при 40°C, получая 46,62 г соли (R)-миндальной кислоты (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она (выход 82,9%, 98,4% ее).

Соль (R)-миндальной кислоты (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она (2,42 г, 7,06 ммоль, 98,4% ее) суспензируют в 25 мл этилацетата при температуре окружающей среды. Добавляют концентрированную водную хлористоводородную кислоту (1,1 мл, примерно 11,2 ммоль) и смесь нагревают до 50°C при энергичном перемешивании в течение 3,5 ч. Суспензию охлаждают до температуры окружающей среды и фильтруют, промывают метил-трет-бутиловым эфиром (около 10 мл), получая 1,48 г указанного в заголовке соединения (выход 92,5%, 97,9% ее).

Пример 8. Синтез (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-

тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

В круглодонную колбу в атмосфере азота загружают N-трет-Вос-L-аланин (1,0 экв.), гидрат гидроксибензотриазола (примерно 1,1 экв.) и (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (1,0 экв.) в ТГФ. Основание Ханига (N,N-дизопропилэтиламин, 1,1 экв.) добавляют к хорошо перемешиваемой смеси, а затем EDC (1,1 экв.). После перемешивания в течение 4-17 ч при температуре окружающей среды растворитель удаляют при пониженном давлении, остаток забирают в этилацетат и воду, промывают насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, 1н. водной HCl, насыщенным раствором соли, сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют при пониженном давлении, получая 1-(N-трет-Вос-L-аланинил)амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он: масс-спектрометрия (M+H)<sup>+</sup>, 362,3.

Поток безводного газообразного HCl пропускают через перемешиваемый раствор 1-(N-трет-Вос-L-аланинил)амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она в 1,4-диоксане (0,03-0,09M), охлаждают на ледяной бане до примерно 10°C в атмосфере N<sub>2</sub> в течение 10-15 мин. Раствор закрывают, затем охлаждающую баню удаляют и раствор оставляют нагреваться до температуры окружающей среды с перемешиванием в течение 2-8 ч, отслеживая ТСХ потребление исходного материала. Раствор концентрируют, получая 1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он, который используют без дополнительной очистки.

В колбу загружают 1-(L-Аланинил)-(S)-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-3-метил-2Н-3-бензазепин-2-он (1,0 экв.), гидрат гидроксибензотриазола (1,1 экв.) и (S)-2-гидрокси-3-метилмасляную кислоту (1,0 экв.) в ТГФ в атмосфере азота. Основание Ханига (N,N-дизопропилэтиламин, 1,1 экв.) добавляют к хорошо перемешиваемой смеси с последующим добавлением EDC (1,1 экв.). После перемешивания в течение 4-17 ч при температуре окружающей среды растворитель удаляют при пониженном давлении, остаток забирают в этилацетат (или подобный растворитель) и воду, промывают насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, 1н. HCl, насыщенным раствором соли, сушат над безводным сульфатом натрия и растворитель удаляют при пониженном давлении, получая указанное в заголовке соединение.

Пример 9. Синтез (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

В круглодонную колбу загружают N-трет-Вос-L-аланин (249,5 г, 1,32 моль), гидрат гидроксибензотриазола (232,2 г, 1,52 моль) и (S)-1-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (250,8 г, 1,32 моль) в ТГФ (3,76 л) в атмосфере азота. Смесь охлаждают до менее чем 5°C перед добавлением основания Ханига (N,N-дизопропилэтиламин, 188,4 г, 1,45 моль), а затем EDC (283,7 г, 1,45 моль). После перемешивания в течение 6 ч реакционную смесь нагревают до температуры окружающей среды и перемешивают примерно 14 ч. Растворитель удаляют при пониженном давлении, остаток забирают в этилацетат (3,76 л) и воду (1,76 л), слои разделяют, органический слой экстрагируют водой (1,76 л), водные слои объединяют и экстрагируют этилацетатом (1,76 л). Органические слои объединяют, экстрагируют насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (1,76 л), сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и выпаривают на роторном испарителе, получая 1-(N-трет-Вос-L-аланинил)амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он 463 г (97,2%).

Раствор HCl в этилацетате получают пропусканием безводного газообразного HCl, используя погружаемую дисперсионную трубку, через этилацетат (1,76 л), охлажденный до примерно 0°C. Полученный этилацетатный раствор HCl добавляют к энергично перемешиваемой суспензии 1-(N-трет-Вос-L-аланинил)амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-она (462 г, 1,28 моль) в этилацетате (3,7 л). Добавляют дополнительное количество этилацетата (1 л), реакционной смеси дают нагреться до комнатной температуры и перемешивают в течение 22 ч. Реакционную смесь фильтруют, получая твердое вещество. Твердое вещество сушат в ацетонитриле (5 л), кипятят с обратным холодильником и затем охлаждают до примерно 60°C, затем фильтруют и сушат, получая 1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он 389,8 г (94,7%).

1-(L-Аланинил)-(S)-амино-3-метил-4,5,6,7-тетрагидро-3-метил-2Н-3-бензазепин-2-он (369,5 г, 1,18 моль), гидрат гидроксибензотриазола (207,6 г, 1,36 моль), основание Ханига (N,N-дизопропилэтиламин, 352,2 г, 2,71 моль) и (S)-2-гидрокси-3-метилмасляную кислоту (140,6 г, 1,18 моль) в ТГФ (4,8 л) объединяют в атмосфере азота и охлаждают до менее чем 5°C. Добавляют EDC (253,7 г, 1,3 моль) и реакционной смеси дают нагреться до температуры окружающей среды и перемешивают. Спустя примерно 25 ч, реакционную смесь разбавляют дихлорметаном (5,54 л) и экстрагируют водой (2,22 л). Органический слой экстрагируют водой (2,22 л), водные слои объединяют и экстрагируют дихлорметаном (5,54 л). Органические слои объединяют, экстрагируют дважды водой (2,22 л), насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (2,22 л), сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и выпаривают на роторном испарителе, получая твердое вещество 428 г (100%). Твердое вещество забирают в смесь растворителей, содержащую ацетон (3,42 л) и воду (0,856 л) при слабом нагревании (40°C). Раствор делят на порции ~2 л и к каждой добавляют воду (7,19 л), нагревая слабый раствор до 50°C. После окончания добавления воды слабому раствору дают остыть до окружающей среды, получая твердое вещество, которое перемешивают как суспензию при температуре окружающей среды примерно 14 ч, затем фильтруют и сушат, получая указанное в заголовке соединение 310,6 г (66,2%) в форме его дигидрата.

При использовании в качестве фармацевтического средства соединение по данному изобретению обычно вводят в форме фармацевтической композиции. Поэтому в другом воплощении данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим эффективное количество (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она и фармацевтически приемлемый разбавитель. Такие композиции используют для ингибиования высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза, включая лечение болезни Альцгеймера. Таким образом, данное изобретение охватывает применение (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она для изготовления лекарственного средства для ингибиования высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза, включая лечение болезни Альцгеймера.

(N)-((S)-2-Гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он может быть введен различными путями. Данное соединение может быть введено в любой форме, которая делает соединение биодоступным в эффективном количестве, включая пероральный и парентеральный пути введения. Например, данное соединение может быть введено перорально, путем ингаляции, подкожно, внутримышечно, внутривенно, чрескожно, через нос, ректально, через глаза, местно, сублингвально, буккально и тому подобное.

При получении композиций по данному изобретению активный ингредиент обычно смешивают с эксципиентом, разбавляют эксципиентом или заключают внутрь такого носителя, который может быть в форме капсулы, саше, бумажного или другого контейнера. Соединение по данному изобретению может быть введено как таковое или в форме фармацевтической композиции, то есть, объединенным с фармацевтически приемлемыми разбавителями, такими как носители или эксципиенты, относительная доля и природа которых определяются растворимостью и химическими свойствами данного соединения, выбранным путем введения и стандартной фармацевтической практикой (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е издание, Mack Publishing Co. (1990)).

Данные фармацевтические композиции получают способами хорошо известными в фармацевтической области. Носителем или эксципиентом может быть твердый, полутвердый или жидкий материал, который может служить в качестве носителя или среды для активного ингредиента. Подходящие носители или эксципиенты хорошо известны в данной области. Фармацевтическая композиция может быть приспособлена для перорального, ингаляционного, парентерального или местного применения и может быть введена пациенту в форме таблеток, капсул, аэрозолей, препаратов для ингаляции, суппозиториев, раствора, супензий или тому подобное.

Для цели перорального терапевтического введения соединения могут быть смешаны с эксципиентами и использованы в форме таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, супензий, сиропов, облаток, жевательных резинок и тому подобное. Указанные препараты должны содержать по меньшей мере 4% соединения по данному изобретению, активного ингредиента, но могут быть изменения в зависимости от конкретной формы, и обычно это может быть между 2% и примерно 90% от массы единичной формы. Количество соединения, присутствующего в композициях, является таким, что могут быть получены подходящие дозы. Предпочтительные композиции и препараты по данному изобретению могут быть определены специалистом в данной области.

Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и тому подобное могут также содержать один или несколько следующих адьювантов: связующих, таких как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантная камедь или желатин; эксципиентов, таких как крахмал или лактоза; дезинтеграторов, таких как альгиновая кислота, примогель, кукурузный крахмал и тому подобное; смазок, таких как стеарат магния, силиконовое масло или Sterotex; улучшающих скольжение веществ, таких как коллоидальный диоксид кремния, и могут быть добавлены подсластители, такие как сахароза или сахарин, или вкусовое вещество, такое как перечная мятта, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор. Когда дозированная единичная форма является капсулой, она может содержать, в дополнение к веществам указанного выше типа, жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или жирное масло. Другие дозированные единичные формы могут содержать различные другие вещества, которые модифицируют физическую форму дозированной единицы, например, как покрытия. Так, таблетки или пилюли могут быть покрыты сахаром, шеллаком или другими пленкообразующими агентами. Сироп может содержать, в дополнение к данным соединениям, сахарозу в качестве подсластителя и некоторые консерванты, красители и окрашенные вещества и ароматизаторы. Вещества, используемые для изготовления указанных различных композиций, должны быть фармацевтически чистыми и нетоксичными в используемых количествах.

Для цели парентерального введения соединение по данному изобретению может быть введено в раствор или супензию. Данные препараты обычно содержат по меньшей мере 0,1% соединения по изобретению, но данная величина может изменяться в диапазоне от 0,1 до примерно 90% от их массы. Количество соединения, присутствующего в таких составах таково, что может быть получена подходящая доза. Растворы или супензии могут также содержать один или несколько следующих адьювантов: стерильных разбавителей, таких как вода для инъекций, физиологический раствор, фиксированные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактери-

альных агентов, таких как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразователей, таких как этилендиаминететрауксусная кислота; буферов, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агентов для доведения тоничности, таких как хлорид натрия или декстроза. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или во флаконы для множества доз, изготовленные из стекла или пластика. Предпочтительные композиции и препараты могут быть определены специалистом в данной области.

Соединение по данному изобретению может быть также введено местно, и, когда это так, носитель может подходяще содержать основу для раствора, мази или геля. Основа, например, может включать одно или несколько следующих веществ: вазелин, ланолин, полизиленгликоль, пчелиный воск, минеральное масло, разбавители, такие как вода и спирт, и эмульгаторы и стабилизаторы. Композиции для местного применения могут содержать соединение формулы I или его фармацевтическую соль в концентрации от примерно 0,1 до примерно 10% мас./об. (масса на единицу объема).

Другая предпочтительная композиция по данному изобретению используется в устройствах для чрескожной доставки («пластырях»). Такие пластиры для чрескожной доставки могут быть использованы, чтобы обеспечить непрерывное или прерывистое введение соединения по данному изобретению в контролируемых количествах. Конструкция и применение пластиры для чрескожной доставки фармацевтических агентов хорошо известны. См., например, патент США 5023252, выданный 11 июня 1991, включенный в данное описание в качестве ссылки. Такие пластиры могут быть сконструированы для непрерывной, пульсирующей доставки или для доставки по потребности фармацевтических агентов.

Для того чтобы более полно проиллюстрировать работу данного изобретения, ниже описаны типичные фармацевтические композиции. Примеры являются исключительно иллюстративными и никоим образом не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1 композиции.

Готовят твердые желатиновые капсулы, содержащие следующие ингредиенты:

Ингредиент	Количество (мг/капсула)
Активный ингредиент	30,0
Крахмал	305,0
Стеарат магния	5,0

Указанные ингредиенты смешивают и помещают в желатиновые капсулы в количестве по 340 мг.

Пример 2 композиции.

Состав для таблетки получают, используя следующие ингредиенты:

Ингредиент	Количество (мг/таблетка)
Активный ингредиент	25,0
Целлюлоза микрокристаллическая	200,0
Коллоидальный диоксид кремния	10,0
Стеариновая кислота	5,0

Компоненты смешивают и прессуют в форме таблеток, каждая массой 240 мг.

Пример 3 композиции.

Состав сухого порошка для ингаляции получают содержащим следующие компоненты:

Ингредиент	Мас.%
Активный ингредиент	5
Лактоза	95

Активный ингредиент смешивают с лактозой и смесь добавляют в устройство для ингаляции сухого порошка.

Пример 4 композиции.

Таблетки, каждая из которых содержит 30 мг активного ингредиента, получают следующим образом:

Ингредиент	Количество (мг/таблетка)
Активный ингредиент	30,0 мг
Крахмал	45,0 мг
Целлюлоза микрокристаллическая	35,0 мг
Поливинилпирролидон (как 10% раствор в стерильной воде)	4,0 мг
Натрийкарбоксиметилкрахмал	4,5 мг
Стеарат магния	0,5 мг
Тальк	1,0 мг
Всего	120 мг

Активный ингредиент, крахмал и целлюлозу пропускают через сито № 20 меш США и тщательно смешивают. Раствор поливинилпирролидона смешивают с полученными порошками, которые затем пропускают через сито 16 меш США. Полученные таким образом гранулы сушат при 50-60°C и пропускают через сито 16 меш США. Натриевую соль карбоксиметилкрахмала, стеарат магния и тальк, предварительно пропущенные через сито № 30 меш США, добавляют затем к гранулам, которые после смеши-

вания прессуют на таблетировочной машине, получая таблетки, каждая массой 150 мг.

Пример 5 композиции.

Капсулы, каждая из которых содержит 40 мг медикамента, готовят следующим образом.

Ингредиент	Количество (мг/капсула)
Активный ингредиент	40,0 мг
Крахмал	109,0 мг
Стеарат магния	1,0 мг
Всего	150,0 мг

Активный ингредиент, крахмал и стеарат магния смешивают, пропускают через сито № 20 меш США и помещают в твердые желатиновые капсулы в количестве по 150 мг.

Пример 6 композиции.

Суппозитории, каждый из которых содержит 25 мг активного ингредиента, готовят следующим образом.

Ингредиент	Количество
Активный ингредиент	25 мг
Глицериды насыщенных жирных кислот	До 2000 мг

Активный ингредиент пропускают через сито № 60 меш США и сусpendируют в глицеридах насыщенных жирных кислот, предварительно расплавленных с использованием минимально необходимого тепла. Смесь затем заливают в форму для суппозитория номинальной емкостью 2,0 г и оставляют остывать.

Пример 7 композиции.

Суспензии, содержащие 50 мг медикамента на дозу 5,0 мл, получают следующим образом.

Ингредиент	Количество
Активный ингредиент	50,0 мг
Ксантановая камедь	4,0 мг
Натрийкарбоксиметилцеллюлоза (11%)	
Микрокристаллическая целлюлоза (89%)	50,0 мг
Сахароза	1,75 г
Бензоат натрия	10,0 мг
Ароматизатор и краситель	q.v.
Очищенная вода	До 5,0 мл

Активный ингредиент, сахарозу и ксантановую камедь смешивают, пропускают через сито № 10 меш США и затем смешивают с предварительно приготовленным раствором микрокристаллической целлюлозы и натрийкарбоксиметилцеллюлозы в воде. Бензоат натрия, ароматизатор и краситель разбавляют некоторым количеством воды и добавляют при перемешивании. Затем добавляют достаточное количество воды, получая необходимый объем.

Пример 8 композиции.

Капсулы, каждая из которых содержит 15 мг медикамента, готовят следующим образом.

Ингредиент	Количество (мг/капсула)
Активный ингредиент	15,0 мг
Крахмал	407,0 мг
Стеарат магния	3,0 мг
Всего	425,0 мг

Активный ингредиент, крахмал и стеарат магния смешивают, пропускают через сито № 20 меш США и помещают в твердые желатиновые капсулы в количестве по 560 мг.

Пример 9 композиции.

Состав для подкожного введения может быть приготовлен следующим образом.

Ингредиент	Количество
Активный ингредиент	1,0 мг
Кукурузное масло	1 мл

В зависимости от растворимости активного ингредиента в кукурузном масле в данной композиции может быть использовано до примерно 5,0 мг или более активного ингредиента, если желательно.

Пример 10 композиции.

Состав для местного применения может быть приготовлен следующим образом.

Ингредиент	Количество
Активный ингредиент	1-10 г
Эмульгирующий воск	30 г
Жидкий парафин	20 г
Белый мягкий парафин	До 100 г

Белый мягкий парафин нагревают до расплавления. Добавляют жидкий парафин и эмульгирующий воск и перемешивают до растворения. Добавляют активный ингредиент и перемешивают до его диспергирования. Затем смесь охлаждают до затвердевания.

В одном из аспектов способа, данное изобретение относится к способу ингибиования высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она. В конкретном варианте способа, данное изобретение относится к способу лечения болезни Альцгеймера, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

Признано, что специалист в данной области может воздействовать на болезнь Альцгеймера путем лечения пациента, пораженного болезнью в настоящее время, или путем принятия профилактических мер для пациента при риске развития болезни. Так, термины «лечебение» и «способ лечения» относятся ко всем способам, при применении которых может быть замедлено, прервано, прекращено, ограничено или остановлено развитие болезни Альцгеймера, но без необходимости показания полного исключения всех симптомов. Как таковые, данные способы включают предотвращение начала болезни Альцгеймера у пациента при риске развития болезни Альцгеймера, ингибиование прогрессирования болезни Альцгеймера и лечение прогрессирующей болезни Альцгеймера.

Используемый термин «пациент» относится к теплокровному животному, такому как млекопитающее, которое поражено расстройством, связанным с усилением высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза, включая болезнь Альцгеймера. Понятно, что морские свинки, собаки, кошки, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, овцы и люди являются примерами животных в объеме значения данного термина. Пациенты, нуждающиеся в таком лечении, легко распознаемы.

Используемый термин «эффективное количество» соединения формулы I относится к количеству, которое является эффективным при ингибиовании высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза и, особенно при лечении болезни Альцгеймера.

Эффективное количество может быть легко определено обслуживающим диагностом, как специалистом в данной области, с использованием обычных методик и наблюдения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества, дозы (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она, внимательным диагностом должен учитываться ряд факторов, включая, но, не ограничиваясь ими: эффективность и свойства (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она; особенности пациента, его размер, возраст и общее состояние здоровья; степень вовлечения в патологический процесс или тяжесть болезни; ответную реакцию отдельного пациента; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему приема лекарственного средства; применение другого сопутствующего медикаментозного лечения и другие имеющие к этому отношение обстоятельства.

Эффективное количество (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она, как предполагается, изменяется от примерно 0,1 миллиграмм на килограмм массы тела в сутки (мг/кг/сутки) до примерно 100 мг/кг/сутки. Предпочтительные количества способен определить специалист в данной области.

Эффективное количество ангидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она как предполагается, изменяется от примерно 0,1 миллиграмма на килограмм массы тела в (мг/кг/сутки) до примерно 100 мг/кг/сутки. Предпочтительные количества способен определить специалист в данной области.

Ангидрат (негидратированная форма) (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она по данному изобретению может быть испытан в различных биологических системах, включая следующее.

Пример А. Клеточный скрининг для определения ингибиторов продуцирования  $\beta$ -амилоида.

Соединение формулы I анализируют на его способность ингибиовать продуцирование  $\beta$ -амилоида в клеточной линии, обладающей шведской мутацией. В этом скрининг-анализе используют клетки (K2 93=линия клеток почек человека), которые стабильно трансфицированы геном для амилоидного белка-предшественника 751 (APP751), содержащим двойную мутацию Lys<sub>651</sub>Met<sub>652</sub> на Asn<sub>651</sub>Leu<sub>652</sub> (нумерация APP751) способом, описанным в публикации международной патентной заявки № 94/10569 и Citron и др. Эту мутацию обычно называют шведской мутацией и клетки, обозначенные как «293 751 SWE», размещают в 96-луночных планшетах Corning при 2-4 x 10<sup>4</sup> клеток на лунку в минимальной основной среде Dulbecco (Sigma, St. Louis, MO) плюс 10% фетальная телячья сыворотка.

Число клеток является важным для того, чтобы достичь результатов ELISA по  $\beta$ -амилоиду в линейном диапазоне анализа (-0,2 до 2,5 нг на мл).

После инкубирования в течение ночи при 37°C в инкубаторе, уравновешенном 10% диоксидом углерода, среду удаляют и заменяют 200 мкл среды, содержащей соединение формулы I (лекарство), на лунку для двухчасового периода предварительной обработки, и клетки инкубируют, как указано выше. Исходные растворы лекарства готовят в 100% диметилсульфоксиде такие, что при конечной концентрации лекарства, используемой при лечении, концентрация диметилсульфоксида не превышает 0,5% и

фактически обычно равна 0,1%.

В конце периода предварительной обработки среду снова удаляют и заменяют свежей, содержащей лекарство средой, как указано выше, и клетки инкубируют в течение дополнительных двух часов. После обработки планшеты центрифугируют в Beckman GPR при 1200 обор, в мин в течение пяти минут при комнатной температуре, чтобы осадить клеточный дебрис из кондиционированной среды. Из каждой лунки 100 мкл кондиционированной среды или соответствующих ее разбавлений переносят на планшет ELISA, предварительно покрытый антителом 266 [P. Seubert, *Nature* (1992) 359:325-327] против аминокислот 13-28  $\beta$ -амилоидного пептида, как описано в публикации международной патентной заявки №. 94/10569, и сохраняют при 4°C в течение ночи. Анализ ELISA с использованием меченого антитела 3D6 [P. Seubert, *Nature* (1992) 359:325-327] против аминокислот 1-5  $\beta$ -амилоидного пептида проводят на следующий день, чтобы измерить количество образовавшегося  $\beta$ -амилоидного пептида.

Цитотоксичные эффекты соединений измеряют с помощью модификации метода Hansen, и др. К клеткам, остающимся на планшете для культуры ткани, добавляют 25 мкл исходного раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (MTT) (Sigma, St. Louis, MO) (5 мг/мл) до конечной концентрации 1 мг/мл. Клетки инкубируют при 37°C в течение одного часа и активность клеток останавливают добавлением равного объема буфера лизиса MTT (20% мас./об. додецилсульфат натрия в 50% диметилформамиде, pH 4,7). Полная экстракция достигается взбалтыванием в течение ночи при комнатной температуре. Разницу в OD<sub>562nm</sub> и OD<sub>650nm</sub> измеряют в аппарате для прочтения микропланшетов молекулярного устройства UV<sub>max</sub> в качестве индикатора жизнеспособности клеток.

Результаты ELISA по  $\beta$ -амилоидному пептиду подставляют в стандартную кривую и выражают как нг/мл  $\beta$ -амилоидного пептида. Чтобы нормализовать цитотоксичность, эти результаты делят на результаты MTT и выражают как процентную долю результатов от контроля без лекарства. Все результаты представляют среднее значение и стандартное отклонение по меньшей мере из шести повторных анализов.

Пример В. Подавление *in vivo* высвобождения  $\beta$ -амилоида и/или его синтеза.

Этот пример поясняет, как соединения по данному изобретению могут быть испытаны для выявления подавления *in vivo* высвобождения  $\beta$ -амилоида и/или его синтеза. Для этих экспериментов используют мышей PDAPP в возрасте 3-4 месяцев [Games et al., (1995) *Nature* 373:523-527]. В зависимости от того, какое соединение испытывают, соединение обычно вводят в состав в количестве между 1 и 10 мг/мл. Из-за низких показателей растворимости соединений, они могут быть приготовлены с различными носителями, такими как кукурузное масло (Safeway, South San Francisco, CA); 10% этанол в 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклогексстрин (Research Biochemicals International, Natick MA) и карбоксиметилцеллюлоза (Sigma Chemical Co., St. Louis MO).

Мышам вводят дозы подкожно иглой 26 калибра и, спустя 3 ч, животных умерщвляют посредством CO<sub>2</sub> наркоза и кровь отбирают пункцией сердца с помощью туберкулинового шприца/иглы на 1 см<sup>3</sup> 25G 5/8" с покрытием раствором 0,5M EDTA, pH 8,0. Кровь помещают в содержащую EDTA вакуумированную трубку Becton-Dickinson и приводят во вращение на 15 мин при 1500 x g при 5°C. Головной мозг мышей затем удаляют и кору и гиппокамп отсекают и помещают на лед.

1. Анализ мозга.

Чтобы подготовить ткань гиппокампа и коры для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), каждый регион мозга гомогенизируют в 10 объемах охлажденного льдом гуанидинового буфера (5,0M гуанидин-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) с помощью автоматического пестика Kontes (Fisher, Pittsburgh PA). Гомогенаты осторожно покачивают на вращающейся платформе в течение трех-четырех часов при комнатной температуре и хранят при -20°C до количественного анализа  $\beta$ -амилоида.

Гомогенаты мозга разбавляют 1:10 охлажденным на льду казеиновым буфером [0,25% казеина, физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS), 0,05% азота натрия, 20 мкг/мл апоптотина, 5 mM EDTA, pH 8,0, 10 мкг/мл лейпептина], снижая тем самым конечную концентрацию гуанидина до 0,5M, перед центрифугированием при 16000 x g в течение 20 мин при 4°C. Образцы затем разбавляют, если необходимо, для достижения оптимального диапазона для измерений ELISA добавлением казеинового буфера с добавкой 0,5M гидрохлорида гуанидина.  $\beta$ -амилоидные стандарты (1-40 или 1-42 аминокислоты) готовят так, что конечный состав равносителен 0,5M гуанидину в присутствии 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA).

Общий  $\beta$ -амилоидный сэндвич ELISA для количественного определения как  $\beta$ -амилоида (ак 1-40), так и  $\beta$ -амилоида (ак 1-42) состоит из двух моноклональных антител (mAb) к  $\beta$ -амилоиду. Иммобилизованное антитело, 266 [P. Seubert, *Nature* (1992) 359:325-327], является специфичным к аминокислотам 13-28  $\beta$ -амилоида. Антитело 3D6 [Johnson-Wood et al., *PNAS USA* (1997) 94:1550-1555], которое является специфичным по отношению к аминокислотам 1-5  $\beta$ -амилоида, обработано биотином и служит в качестве антитела-репортера в анализе. Процедуру биотинилирования 3D6 проводят по протоколу производителя (Pierce, Rockford IL) для введения в иммуноглобулины метки NHS-биотин, за исключением того, что используют буфер 100 mM бикарбонат натрия, pH 8,5. Антитело 3D6 не распознает секретированный амилоидный белок-предшественник или APP полной длины, но обнаруживает только разновидности  $\beta$ -амилоида с аминоконцевой аспарагиновой кислотой. Анализ имеет нижний предел чувствительности ~50

пг/мл (11 пМ) и не показывает никакой перекрестной реактивности к эндогенному мышиному  $\beta$ -амилоидному пептиду при концентрациях вплоть до 1 нг/мл.

Конфигурация сэндвича ELISA для количественного определения содержания  $\beta$ -амилоида (ак 1-42) использует mAb 21F12 [Johnson-Wood et al., PNAS USA (1997) 94:1550-1555] (которое распознает аминокислоты 33-42  $\beta$ -амилоида) в качестве иммобилизованного антитела. Биотинилированное 3D6 также является антителом-репортером в этом анализе, который имеет более низкий предел чувствительности ~125 пг/мл (28 пМ).

Иммобилизованные mAbs 266 и 21F12 наносят в количестве 10 мкг/мл на 96-луночные планшеты для иммуноанализа (Costar, Cambridge MA) на ночь при комнатной температуре. Планшеты затем подвергают аспирации и блокируют 0,25% сывороточным альбумином человека в буфере PBS по меньшей мере на 1 ч при комнатной температуре, затем хранят осущенными при 4°C до использования. Планшеты повторно гидратируют буфером для промывания (Tris-забуференный физиологический раствор, 0,05% Tween 20) перед использованием. Образцы и стандарты наносят на планшеты и инкубируют в течение ночи при 4°C. Планшеты промывают 3 раза буфером для промывания между всеми стадиями анализа. Биотинилированное 3D6, разбавленное до 0,5 мкг/мл в казеиновом буфере для инкубирования (0,25% казеин, PBS, 0,05% Tween 20, pH 7,4) инкубируют в лунке в течение 1 ч при комнатной температуре. Авидин-HRP (Вектор, Burlingame CA), разбавленный 1:4000 в казеиновом буфере для инкубирования, добавляют в лунки на 1 ч при комнатной температуре. Колориметрический субстрат, Slow TMB-ELISA (Pierce, Cambridge MA), добавляют и оставляют для реакции на 15 мин, после чего ферментативную реакцию прекращают добавлением 2 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Продукт реакции количественно определяют с помощью молекулярных устройств Vmax (Molecular Devices, Menlo Park CA), измеряющих разницу в оптической плотности при 450 нм и 650 нм.

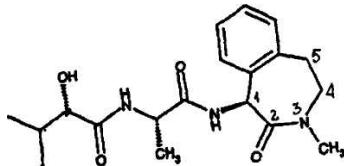
## 2. Анализ крови.

Плазму с EDTA разбавляют 1:1 в разбавителе для образцов (0,2 г/л фосфата натрия·H<sub>2</sub>O (одноосновного), 2,16 г/л фосфата натрия·7H<sub>2</sub>O (двуосновного), 0,5 г/л тимерозала, 8,5 г/л хлорида натрия, 0,5 мл Тритона X-405, 6,0 г/л бычьего сывороточного альбумина без глобулина и вода). Образцы и стандарты в разбавителе для образцов анализируют, используя общий  $\beta$ -амилоидный анализ (266 иммобилизованное/3D6 репортер), описанный выше для анализа мозга, за исключением того, что используют разбавитель для образца вместо описанных казеиновых разбавителей.

Исходя из предшествующего описания, у специалиста могут появиться различные модификации и изменения в составе и способе. Все такие модификации находятся в сфере действия прилагаемой формулы изобретения и должны быть приобщены к сему.

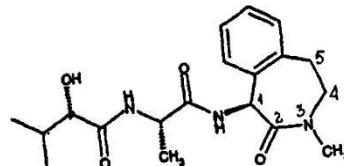
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он формулы I



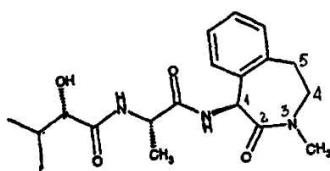
(I)

2. Фармацевтическая композиция, содержащая (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он формулы I и фармацевтически приемлемый разбавитель



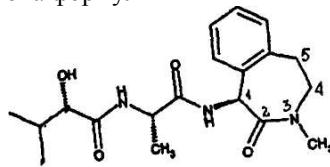
(I)

3. Способ ингибирования высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она формулы I



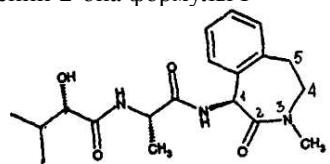
(I)

4. Способ лечения болезни Альцгеймера, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1H-3-бензазепин-2-она формулы I



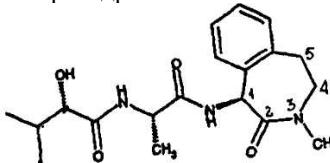
(I)

5. Способ профилактики болезни Альцгеймера, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1H-3-бензазепин-2-она формулы I



(I)

6. Способ ингибиования прогрессирования болезни Альцгеймера, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1H-3-бензазепин-2-она формулы I



(I)

7. Применение соединения по п.1 в качестве фармацевтического средства.
8. Применение соединения по п.1 при лечении болезни Альцгеймера.
9. Применение соединения по п.1 при профилактике болезни Альцгеймера.
10. Применение соединения по п.1 при ингибиовании высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза.
11. Применение соединения по п.1 при ингибиовании прогрессирования болезни Альцгеймера.
12. Применение соединения по п.1 для изготовления лекарственного средства для ингибиования высвобождения  $\beta$ -амилоидного пептида и/или его синтеза, включая лечение болезни Альцгеймера.
13. Применение соединения по п.1 для изготовления лекарственного средства для предотвращения болезни Альцгеймера и/или для ингибиования прогрессирования болезни Альцгеймера.

