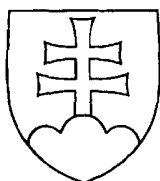


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ  
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **5. 11. 2001**  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/249 552**  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **17. 11. 2000**  
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **2. 12. 2003**  
Vestník ÚPV SR č.: **12/2003**  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky  
v prípade vylúčenej prihlášky:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky  
podľa PCT: **PCT/US01/27799**  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky  
podľa PCT: **WO02/047671**

(11), (21) Číslo dokumentu:

**559-2003**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> :

**A61K 31/55,  
C07D223/16**

(71) Prihlasovateľ: **ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US;**  
**ELAN PHARMACEUTICALS, INC., South San Francisco, CA, US;**

(72) Pôvodca: **Audia James Edmund, Indianapolis, IN, US;**  
**John Varghese, South San Francisco, CA, US;**  
**Latimer Lee H., Oakland, CA, US;**  
**McDaniel Stacey Leigh, Martinsville, IN, US;**  
**Nissen Jeffrey Scott, Indianapolis, IN, US;**  
**Thorsett Eugene D., Moss Beach, CA, US;**  
**Tung Jay S., Belmont, CA, US;**

(74) Zástupca: **Bezák Marián, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Laktámová zlúčenina na inhibíciu uvoľňovania alebo syntézy beta-amyloidového peptidu**

(57) Anotácia:  
Zlúčenina (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyl)-1-(L-alani-  
nyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benza-  
pezín-2-ónu, kompozície s jej obsahom a jej použitie na vý-  
robu liečiva na inhibíciu uvoľňovania a/alebo syntézy beta-  
amyloidového peptidu vrátane liečby Alzheimerovej cho-  
roby.

**SK 559-2003 A3**

## **LAKTÁMOVÁ ZLÚČENINA NA INHIBÍCIU UVOĽŇOVANIA ALEBO SYNTÉZY BETA-AMYLOIDOVÉHO PEPTIDU**

### **Oblasť techniky**

Predložený vynález sa týka oblasti farmaceutickej a organickej chémie a konkrétne zlúčeniny, ktorá inhibuje uvoľňovanie a/alebo syntézu beta-amyloidového peptidu.

### **Doterajší stav techniky**

Isté laktámy, ktoré inhibujú uvoľňovanie a/alebo syntézu beta-amyloidového peptidu, a z toho dôvodu sú užitočné na liečenie Alzheimerovej choroby, sú popísané v PCT prihláške č. PCT/US 97/22986.

Zlúčenina podľa predloženého vynálezu, (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón, je užitočná na inhibíciu uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidového peptidu a z tohto dôvodu je užitočná na liečenie Alzheimerovej choroby a má výhodné vlastnosti týkajúce sa účinnosti a bezpečnosti.

### **Podstata vynálezu**

Predložený vynález sa týka zlúčeniny (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu.

V jednom zo svojich spôsobových znakov sa predložený vynález týka spôsobu inhibície uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidového peptidu zahrňujúceho podávanie pacientovi, ktorý to potrebuje, účinného množstva (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu. V jednom vyhotovení tohto spôsobu sa predložený vynález týka

spôsobu liečenia Alzheimerovej choroby, zahrňujúceho podávanie pacientovi, ktorý to potrebuje, účinného množstva (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu. Predložený vynález sa tiež týka spôsobu prevencie alebo inhibície postupu Alzheimerovej choroby, zahrňujúceho podávanie pacientovi, ktorý to potrebuje, účinného množstva (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu.

V inom vyhotovení sa predložený vynález týka farmaceutickej kompozície obsahujúcej (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón a farmaceuticky prijateľné riedidlo. Takéto kompozície sú použiteľné na inhibíciu uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidového peptidu, vrátane liečenia Alzheimerovej choroby.

### **Detailný popis predloženého vynálezu**

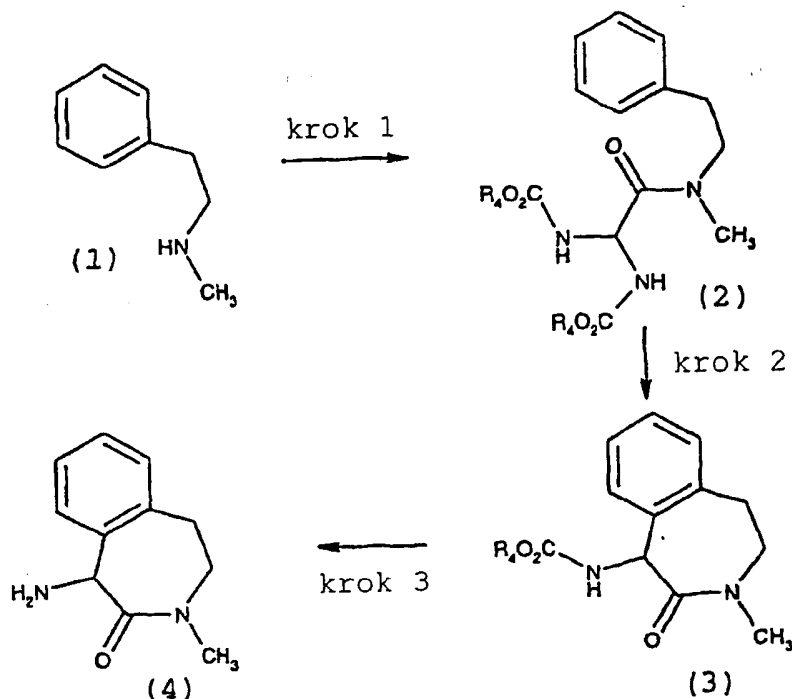
Ako sa tu používajú, nižšie uvedené výrazy majú nasledujúce významy:

Výraz „ee„ alebo „enantiomérny prebytok„ znamená percento, v ktorom jeden enantiomér, E1, je v prebytku v zmesi oboch enantiomérov (E1 + E2), vypočítaný podľa rovnice  $((E1 - E2) / (E1 + E2)) \times 100 \% = ee$ . Ako je dobre známe v odbore, enantiomérny prebytok sa môže určiť kapilárnou elektroforézou a chirálnou HPLC zlúčenín alebo ich derivátov.

Na označovanie špecifických izomérov sa použije Cahn – Prelog – Ingoldovo označenie (R)- a (S)- a označenie L- a D- pre stereochemiu izomérov glyceraldehydov.

Zlúčenina podľa predloženého vynálezu sa môže pripraviť spôsobom popísaným ďalej. V nasledujúcich schémach majú všetky substituenty, pokiaľ nie je uvedené inak, prv definované významy a všetky činidlá sú dobre známe v odbore.

Schéma 1



V schéme 1, krok 1, sa N-metylphenetylamin všeobecného vzorca (1) acyluje vhodným bisalkoxykarbonylacetátovým prenosovým činidlom kvôli získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca (2). N-metylphenetylamin je komerčne dostupný a ľahko sa pripraví reakciou 2-bróm- alebo 2-chlóretylbenzénu s metylamínom za podmienok dobre známych v odbore. Vhodné bisalkoxykarbonylacetátové prenosové činidlo je také, v ktorom  $\text{R}^4$  je  $\text{C}_1\text{-C}_4$ -alkyl a prenáša bisalkoxykarbonylacetyllovú skupinu na zlúčeninu všeobecného vzorca (1), ako sú bisalkoxykarbonyloctové kyseliny a bisalkoxykarbonylacetylchloridy (pozri Ben-Ishai, Tetrahedron, 43, 439 – 450 (1987)).

Napríklad zlúčenina všeobecného vzorca (1) sa uvedie do kontaktu s vhodnou bisalkoxykarbonyloctovou kyselinou kvôli získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca (2). Takéto kopulačné reakcie sú bežné v syntéze peptidov a môžu sa použiť takéto spôsoby syntézy. Napríklad sa môžu použiť dobre známe kopulačné činidlá ako sú

karbodiimidy s použitím alebo bez použitia dobre známych aditív, ako je N-hydroxysukcínimid, 1-hydroxybenzotriazol a podobne, čo môže uľahčiť túto acyláciu. Takéto kopulačné reakcie často používajú vhodné bázy na vychytávanie kyseliny, vytvorenej v priebehu reakcie. Vhodné bázy zahrňujú napríklad trietylamín, N,N-diizopropyletylamín, N-metylmorfolín a podobne. Reakcia sa zvyčajne vykonáva v inertnom aprotickom polárnom riedidle ako je dimetylformamid, metylénchlorid, chloroform, acetonitril, tetrahydrofurán a podobne. Typicky sa reakcia vykonáva za teplôt od približne 0 °C do približne 60 °C a typicky vyžaduje od približne 1 do približne 24 hodín. Po skončení reakcie sa produkt všeobecného vzorca (2) izoluje bežnými spôsobmi zahrňujúcimi extrakciu, precipitáciu, chromatografiu, filtráciu, rozotrenie, kryštalizáciu a podobne.

Alternatívne sa napríklad zlúčenina všeobecného vzorca (1) uvedie do kontaktu s vhodným bisalkoxykarbonylacetylchloridom kvôli získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca (2). Takéto acetylchloridy sa ľahko pripravujú zo zodpovedajúcich kyselín spôsobmi dobre známymi v odbore, ako je pôsobenie chloridu fosforitého, fosforoxychloridu, chloridu fosforečného, fosfortionylchloridu alebo oxalylchloridu, s alebo bez malého množstva dimetylformamidu, v inertnom rozpúšťadle ako je toluén, metylénchlorid alebo chloroform; za teplôt od približne 0 do 80 °C. Reakcia sa typicky vykonáva po dobu, ktorá je v rozmedzí od 1 hodiny do 24 hodín. Kyslý chlorid sa môže izolovať a čistiť alebo sa môže často použiť priamo, t.j. s alebo bez izolácie a/alebo čistenia. Takáto acylačná reakcia všeobecne používa vhodnú bázu na vychytávanie kyseliny vytvorenej počas reakcie. Vhodné bázy zahrňujú napríklad pyridín, trietylamín, N,N-diizopropyletylamín, N-metylmorfolín a podobne. Reakcia sa zvyčajne vykonáva v inertnom aprotickom polárnom riedidle ako je metylénchlorid, chloroform, tetrahydrofurán a podobne. Typicky sa reakcia vykonáva za teplôt od približne -20 °C do približne 80 °C a typicky vyžaduje od približne 1 do približne 24 hodín. Po skončení reakcie sa produkt všeobecného vzorca (2) izoluje bežnými spôsobmi zahrňujúcimi extrakciu, precipitáciu, chromatografiu, filtráciu, rozotrenie, kryštalizáciu a podobne.

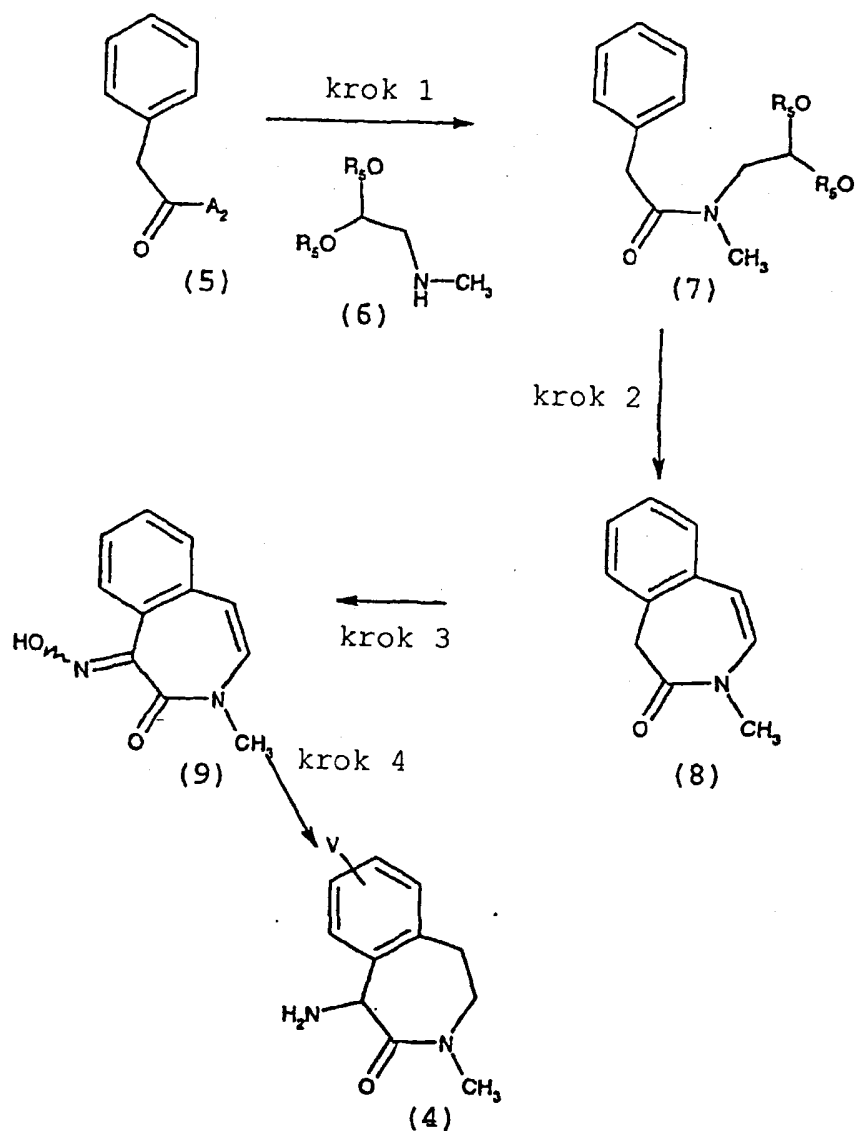
V schéme 1, krok 2, sa zlúčenina všeobecného vzorca (2) cyklizuje kvôli získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca (3).

Napríklad sa zlúčenina všeobecného vzorca (2) uvedie do kontaktu s kyselinou, ako je kyselina metánsulfónová alebo kyselina sírová. Reakcia sa typicky vykonáva použitím zvolenej kyseliny ako rozpúšťadla. Typicky sa činidlá najprv zmiešajú za teplôt od približne  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do približne  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  a potom sa nechajú zahriať na teplotu od približne teploty okolia do približne  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cyklizačná reakcia typicky vyžaduje od približne 12 do približne 72 hodín. Po skončení reakcie sa produkt všeobecného vzorca (2) izoluje bežnými spôsobmi zahrňujúcimi extrakciu, precipitáciu, chromatografiu, filtráciu, rozotrenie, kryštalizáciu a podobne.

V schéme 1, krok 3, sa zlúčenina všeobecného vzorca (3) zbaví ochrany kvôli získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca (4).

Odobratie takýchto alkoxykarbonylových amínových ochranných skupín je dobre známe v odbore, pozri napríklad *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Theodore Greene (1. a 2. vydanie, Wiley-Interscience) a Ben-Ishai, *Tetrahedron*, 43, 439 – 450 (1987).

Schéma 2



V schéme 2, krok 1, sa vhodná fenyloctová kyselina všeobecného vzorca (5) kopuluje s vhodným acetalom všeobecného vzorca (6) kvôli získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca (7). Vhodná fenyloctová kyselina všeobecného vzorca (5) je taká, v ktorej  $\text{A}_2$  je aktivovaná skupina, napríklad  $-\text{OH}$ ,  $-\text{Cl}$  alebo  $-\text{Br}$ . Vhodný acetal všeobecného vzorca (6) je taký, v ktorom  $\text{R}^5$  je  $\text{C}_1\text{-C}_4$  alkyl. Takéto kopulačné reakcie sú bežné v syntéze peptidov a tam používané syntetické spôsoby sa môžu použiť, ako je popísané v schéme 1, krok 1.

Kopulácia znázornená v schéme 2, krok 2, sa môže tiež vykonať za Schotten – Baumannových podmienok použitím kyslého halogenidu zlúčeniny všeobecného vzorca (5) a vhodného acetalu všeobecného vzorca (6) v zmesnom rozpúšťadle, ako je metyl-terc.-butyléter, etylacetát, tetrahydrofurán, acetón alebo dietyléter a voda. Takéto reakcie sa vykonávajú použitím vhodnej bázy, ako je hydroxid sodný, hydroxid draselný, uhličitan sodný, uhličitan draselný, hydrogenuhličitan sodný alebo hydrogenuhličitan draselný. Typicky sa reakčná zmes intenzívne mieša a vyhotovuje za teplôt od približne  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do približne  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a typicky vyžaduje od približne 1 do približne 24 hodín. Po skončení reakcie sa produkt všeobecného vzorca (7) izoluje bežnými spôsobmi zahrňujúcimi extrakciu, precipitáciu, chromatografiu, filtráciu, rozotrenie, kryštalizáciu a podobne.

V schéme 2, krok 2, sa zlúčenina všeobecného vzorca (7) cyklizuje kvôli získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca (8). Takéto cyklizačné reakcie sa vykonávajú v kyseline ako je kyselina sírová. Typicky sa kyselina použije ako rozpúšťadlo. Všeobecne sa reakcia vykonáva za teplôt od približne  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do približne  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  a typicky vyžaduje od približne 1 do približne 24 hodín. Po skončení reakcie sa produkt všeobecného vzorca (8) izoluje bežnými spôsobmi zahrňujúcimi extrakciu, precipitáciu, chromatografiu, filtráciu, rozotrenie, kryštalizáciu a podobne.

V schéme 2, krok 3, zlúčenina všeobecného vzorca (8) podstúpi amínovú prenosovú reakciu kvôli získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca (9). V schéme 2 je znázornená oximácia. Takáto oximácia sa dosiahne kontaktom enolátu zlúčeniny všeobecného vzorca (8) s oximovým prenosovým činidlom, ako je alkylidusitan ester. Enolát zlúčeniny všeobecného vzorca (8) sa môže pripraviť reakciou zlúčeniny všeobecného vzorca (8) s vhodnou bázou, ako je terc.-butoxid draselný, diizopropylamid lítny, hexametylsilazid lítny, hexametylsilazid sodný, hexametylsilazid draselný a podobne. Príklady takýchto oximácií sú uvedené vo Wheeler a kol., Organic Syntheses, zv. VI, str. 840, kde sa popisuje reakcia izoamyldusitanu s ketónom kvôli príprave požadovaného oximu. Reakcia sa typicky vykonáva v rozpúšťadle, ako je tetrahydrofurán. Všeobecne sa reakcia vykonáva za teplôt od približne  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do približne  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a typicky vyžaduje od približne 1 do približne 24

hodín. Po skončení reakcie sa produkt všeobecného vzorca (8) izoluje bežnými spôsobmi zahrňujúcimi extrakciu, precipitáciu, chromatografiu, filtráciu, rozotrenie, kryštalizáciu a podobne.

Alternatívne sa môže takáto amínová prenosová reakcia vykonať pomocou azidu. Azid sa môže vytvoriť reakciou enolátu zlúčeniny všeobecného vzorca (8) s azidovým prenosovým činidlom, ako je toluénsulfonylazid a triizopropylbenzénsulfonylazid. Príklady takýchto reakcií sú uvedené v Evans a kol., J. Am. Chem. Soc., 112, 4011 – 4030 (1990), 41. Reakcia sa typicky vykonáva v rozpúšťadle ako je tetrahydrofurán. Všeobecne sa reakcia vykonáva za teplôt od približne – 20 °C do približne 50 °C a typicky vyžaduje od približne 1 do približne 24 hodín. Po skončení reakcie sa produkt všeobecného vzorca (8), ktorý obsahuje azid namiesto oximu, izoluje bežnými spôsobmi zahrňujúcimi extrakciu, precipitáciu, chromatografiu, filtráciu, rozotrenie, kryštalizáciu a podobne.

Ako je znázornené v schéme 2, krok 4, oxim sa redukuje na zlúčeninu všeobecného vzorca (4). Takéto redukcie sa dosahujú spracovaním vodíkom a za prítomnosti vhodného katalyzátora, ako je Raney – nikel alebo paládiový katalyzátor, ako je paládium na uhlí. Reakcia sa typicky vykonáva v rozpúšťadle ako je tetrahydrofurán, etylacetát alebo nižšie alkoholy ako je metanol, etanol a izopropanol, v kyseline octovej, vode, vodnom čpavku a podobne a ich zmesiach. Reakcia sa všeobecne vykonáva za tlaku vodíka v rozmedzí od atmosférického tlaku do približne 600 psi (4 137 kPa). Všeobecne sa reakcia vykonáva za teplôt od približne 20 °C do približne 100 °C a typicky vyžaduje od približne 1 do približne 24 hodín. Po skončení reakcie sa produkt všeobecného vzorca (4) izoluje bežnými spôsobmi zahrňujúcimi extrakciu, precipitáciu, chromatografiu, filtráciu, rozotrenie, kryštalizáciu a podobne.

Alternatívne, pokiaľ sa amín prenesie pomocou azidu, azidoskupina sa redukuje. Takéto redukcie sa vykonávajú hydrogenáciou, ako je popísané vyššie.

Spôsob výroby (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu sú popísané v schéme A.

Schéma A

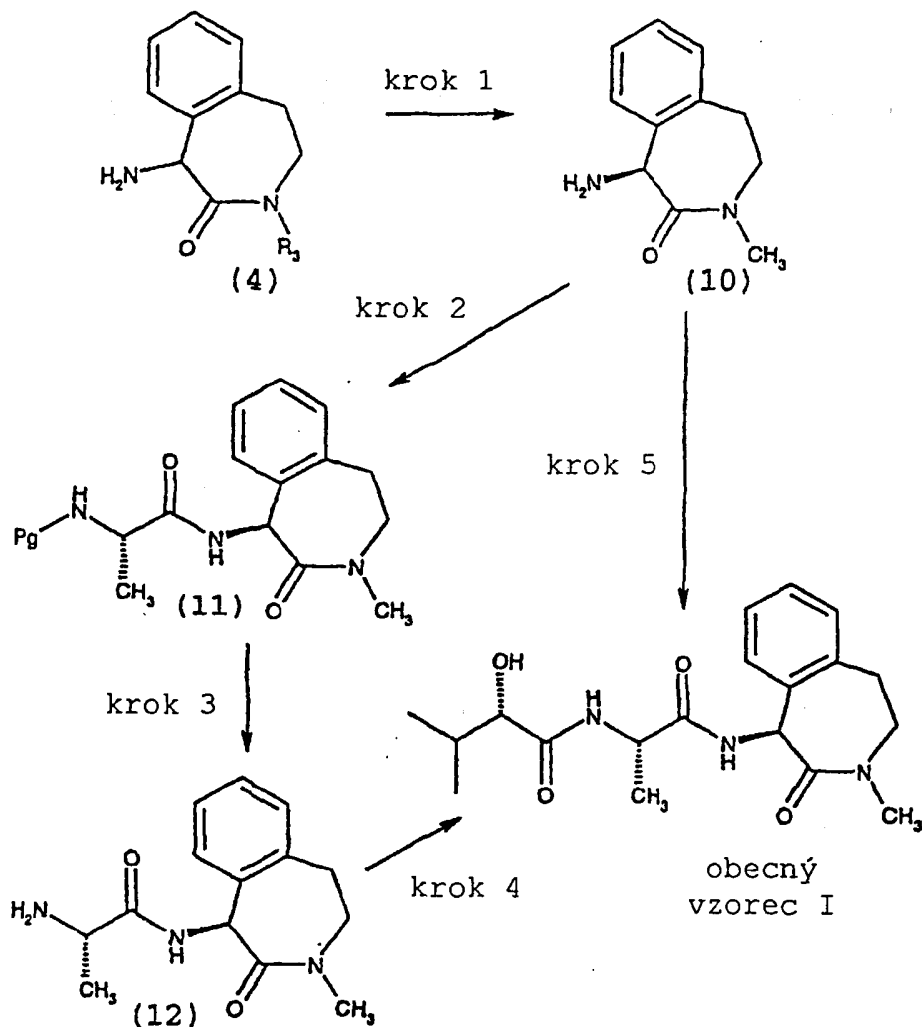


Schéma A, krok 1, znázorňuje stereochemickú separáciu vhodného laktámu všeobecného vzorca (4) kvôli získaniu laktámu všeobecného vzorca (10), to znamená v zásade čistého (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu. Ako sa tu používa výraz „v zásade čistý“, znamená enantiométnu čistotu (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu. Podľa predloženého vynálezu sa môže pripraviť v zásade čistý (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-

2H-3-benzazepín-2-ón obsahujúci (S)-enantiomér v množstve väčšom ako 80 %, výhodne väčšom ako 90 %, výhodnejšie väčšom ako 95 %, najvhodnejšie väčšom ako 97 %.

Napríklad sa môže (S)-izomér zlúčeniny všeobecného vzorca (4) separovať frakčnou kryštalizáciou dibenzoylvínanu alebo soľou kyseliny (R)-(-)-d-gáforsulfónovej a (D)-(-)-mandľovej. Možno očakávať, že pre tento účel je vhodný široký rad dibenzoylvínanov. Konkrétne dibenzoylestery, ktoré majú para-substituent zvolený zo súboru, zahrňujúceho atóm vodíka, halogén, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alkyl a C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alkoxy, sú výhodné a výhodnejší je di-p-toluoyl-1-vínan. Di-p-toluoyl-1-vínan sa použije na získanie (S)-izoméru.

V spôsobe podľa predloženého vynálezu sa zlúčenina všeobecného vzorca (4) uvedie do kontaktu so zvolenou kyselinou. Všeobecne sa môže použiť od približne 0,4 molárnych ekvivalentov do veľkého prebytku zvolenej kyseliny, pričom približne od 0,4 do 1,5 molárnych ekvivalentov sú výhodné a od približne 0,5 do 1,1 molárnych ekvivalentov je výhodnejšie.

Spôsob sa typicky vykonáva kryštalizáciou adičnej soli kyseliny z roztoku. Vhodné sú obzvlášť rozpúšťadlá ako sú nižšie alkoholy, vrátane alkoholov, ako je metanol, etanol, n-propanol, izopropanol, butanol, sek.-butanol, izobutanol, terc.-butanol, amylalkohol, izo-amylalkohol, terc.-amylalkohol, hexanol, cyklopentanol a cyklohexanol, metanol, etanol a izopropanol sú výhodné. Výhodné môže byť použitie protirozpúšťadla.

Ako sa tu používa, výraz „protirozpúšťadlo“, znamená rozpúšťadlo, v ktorom je soľ významne menej rozpustná ako v rozpúšťadle. Výhodne pokiaľ sa použije protirozpúšťadlo, potom je miešateľné so zvoleným rozpúšťadlom. Vhodné protirozpúšťadlá zahrňujú étery ako je dietyléter, metyl-terc.-butyléter a podobne a nižšie alkylacetáty ako je metylacetát, etylacetát, izopropylacetát, propylacetát, izobutylacetát, sek.-butylacetát, butylacetát, amylacetát, izo-amylacetát a podobne a alkány, ako je pentán, hexán, heptán, cyklohexán a podobne.

Pokiaľ sa spôsob podľa predloženého vynálezu vykonáva kryštalizáciou adičnej soli kyseliny z racemickej zmesi, musí sa protirozpúšťadlo použiť opatrne kvôli zabráneniu kryštalizácie soli na nežiaducu diastereomérnu soľ.

Typicky sa kryštalizácia vykonáva za počiatočných teplôt do približne 40 °C do teploty spätného toku zvoleného rozpúšťadla alebo rozpúšťadiel a za počiatočných koncentrácií od približne 0,05 mólu do približne 0,25 mólu. Zmes sa potom ochladí kvôli získaniu soli. Výhodné môže byť naočkovanie.

Miešanie východiskového precipitátu po dobu od približne 4 do 48 hodín môže byť výhodné. Výhodne sa kryštalizačný roztok ochladzuje pomaly. Kryštalizačná zmes sa najvýhodnejšie ochladí na teplotu od teploty okolia do približne -20 °C. Soľ sa môže izolovať použitím spôsobov, ktoré sú dobre známe v odbore, vrátane filtrácie, usadzovania, centrifugácie, odparovania, sušenia a podobne.

Zlúčenina všeobecného vzorca (10) sa môže použiť priamo ako adičná soľ zvolenej kyseliny. Alternatívne pred použitím sa môže zlúčenina všeobecného vzorca (10) izolovať ako ďalšia adičná soľ kyseliny po výmene kyseliny alebo sa môže izolovať vo forme bázy extrakciou za bazických podmienok, ako je dobre známe v odbore.

Výhodný spôsob poskytuje (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón v zásade enantiomericky čistý kryštalizáciou 1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu vo forme jeho adičnej soli kyseliny, kde je kyselina zvolená zo súboru, zahrňujúceho kyselinu di-p-tolyl-L-vínnu, kyselinu (R)-(-)-d-gáforsulfónovú a kyselinu (D)-(-)-mandľovú v dynamickom procese v prítomnosti aromatického aldehydu. Dynamický proces má výhodu spočívajúcu v tom, že 1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón podstúpi premenu na jediný izomér v priebehu kryštalizácie, čo vedie k zlepšeniu výťažku a bráni vzniku odpadového prúdu, obsahujúceho nežiaduci izomér.

Možno očakávať, že pre dynamický proces je vhodný široký rad aromatických aldehydov a zistilo sa, že v praxi sú mnohé aldehydy obzvlášť výhodné. Konkrétne sa zistilo, že výhodné salicylové kyseliny sú salicylaldehyd, 5-nitrosalicylaldehyd a

3,5-dichlórsalicylaldehyd sú výhodnejšie v uvažovanom dynamickom separačnom procese.

V súlade s tým, pokiaľ sa spôsob podľa predloženého vynálezu vykonáva ako dynamická separácia, 1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón sa uvedie do kontaktu so zvolenou kyselinou v prítomnosti aromatického aldehydu. Všeobecne sa pre dynamickú separáciu použije od približne 0,9 do 1,2 molárnych ekvivalentov kyselín, pričom výhodný je približne 1 molárny ekvivalent. Aromatický aldehyd sa všeobecne použije v katalytickom množstve. Typicky sa použije od približne 0,5 do 0,001 molárnych ekvivalentov aromatického aldehydu, pričom od približne 0,1 do približne 0,01 molárnych ekvivalentov je výhodné.

Dynamický proces sa typicky vykonáva v rozpúšťadle bez protirozpúšťadla, ako je popísané vyššie. Zmes 1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón, zvolená kyselina a aromatický aldehyd sa miešajú kvôli umožneniu premeny na požadovaný izomér. Všeobecne sa táto premena vykonáva za teplôt od teploty okolia do teploty spätného toku rozpúšťadla. Všeobecne premena vyžaduje od 6 do 48 hodín.

Odborníkovi v odbore je jasné, že pokiaľ sa spôsob podľa predloženého vynálezu vykonáva ako dynamická separácia, použitie adičnej soli kyseliny (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón sa môže komplikovať prítomnosťou malých množstiev aromatického aldehydu v izolovanom produkte. Preto je po dynamickej separácii výhodné, aby (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón sa izoloval výmenou soli, výhodne vo forme hydrochloridovej soli, pred jeho použitím alebo vytváraním bázy.

Schéma A, krok 2, znázorňuje kopulačnú reakciu vhodného amínovo chráneného alanínu všeobecného vzorca  $\text{PgNH-CHCH}_3\text{-C(O)-A}$  a vhodného laktámu všeobecného vzorca (10). Vhodný amínovo chránený alanín je taký, v ktorom Pg je ochranná skupina amínu, je v L-konfigurácii a A je aktivujúca skupina, napríklad  $-\text{OH}$  alebo  $-\text{Cl}$ , schopná kopulácie s amínovou skupinou zlúčeniny všeobecného vzorca (10). Takéto amínovo chránené alaníny sú odborníkovi v odbore ľahko dostupné.

Kopulačná reakcia znázornená v reakčnej schéme A, krok 2, zahrňuje reakciu, ktorá sa zvyčajne vykonáva v syntéze peptidov a možno tiež použiť tam používané syntetické spôsoby. Takéto spôsoby sú detailne popísané v schéme 1, krok 1.

Reakčná schéma A, krok 3, znázorňuje odstránenie ochrannnej skupiny zo zlúčeniny všeobecného vzorca (11) kvôli získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca (12). Takéto odstránenia ochrannnej skupiny amínu sú dobre známe v odbore.

Reakčná schéma A, krok 4, znázorňuje kopulačnú reakciu vhodnej zlúčeniny všeobecného vzorca (13),  $(\text{CH}_3)_2\text{CH-CHOH-C(O)A}_1$  a zlúčeniny všeobecného vzorca (12) kvôli získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca I. S-izomér zlúčeniny všeobecného vzorca (13) je komerčne dostupný a je dobre známy v odbore, pozri napríklad PCT prihláška č. PCT/US 97/22986, podaná 22. decembra 1997. Kopulačná reakcia znázornená v kroku 3 sa vykoná použitím kyseliny všeobecného vzorca (13) (zlúčenín, v ktorých  $\text{A}_1$  je  $-\text{OH}$ ) alebo halogenidu kyseliny, ktorý je z nej odvodený (zlúčenín, v ktorých  $\text{A}_1$  je  $-\text{C}_1$  alebo  $-\text{Br}$ ), spôsobom podobným spôsobu uvedenému v schéme 1, krok 1.

Alternatívny spôsob prípravy zlúčenín všeobecného vzorca I je znázornený v schéme A, krok 5, ktorý ukazuje kopulačnú reakciu vhodnej zlúčeniny všeobecného vzorca (10) a vhodnej zlúčeniny všeobecného vzorca (14),  $(\text{CH}_3)_2\text{CH-CHOH-C(O)-NH-CHCH}_3\text{-C(O)A}_2$ , kvôli priamemu získaniu zlúčeniny všeobecného vzorca I. Vhodná zlúčenina všeobecného vzorca (10) je ako bolo popísané v kroku 2. Vhodná zlúčenina všeobecného vzorca (14) je taká, ktorá má stereochemiu rovnakú ako sa požaduje u konečného produktu všeobecného vzorca I.

Zlúčeniny všeobecného vzorca (14) sa ľahko pripravujú kopuláciou karboxy – chránených aminokyselín,  $\text{H}_2\text{N-CHCH}_3\text{-C(O)OPg}_1$ , kde zlúčeniny všeobecného vzorca (13) sú ako bolo popísané vyššie. Opätovne sú takéto kopulačné reakcie dobre známe v odbore a poskytujú produkt, ktorý po odstránení ochrannej skupiny dáva zlúčeninu všeobecného vzorca (14).

Zlúčenina všeobecného vzorca I sa môže izolovať a čistiť radom spôsobov, vrátane kryštalizácie. Môže sa použiť kryštalizácia z roztoku a suspenzačné techniky. Obzvlášť sa môže zlúčenina podľa predloženého vynálezu pripraviť kryštalizáciou z radu bezvodých a vodných rozpúšťadiel. Vhodné rozpúšťadlá zahrňujú acetón,

nižšie alkoholy (ako je metanol, etanol a izopropanol), kyselinu octovú a acetonitril s použitím alebo bez použitia vody a etylacetát, dietyléter a metyl-terc.-butyléter. V praxi sa zistilo, že výhodný je vodný acetón. Pre dané vodné rozpúšťadlo použité množstvo vody závisí od relatívnej rozpustnosti (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu v rozpúšťadle v porovnaní s vodou a tu sa používa kryštalizácia alebo suspenzačné techniky.

Kryštalizácia sa všeobecne vykonáva tak, že sa (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón rozpustí vo vodnom rozpúšťadle a potom sa roztok nechá chladnúť, s pridaním alebo bez pridaní ďalšej vody, kvôli získaniu pevnej látky. Typicky sa kryštalizácia vykonáva za počiatočných teplôt od približne 40 °C do teploty spätného toku zvoleného vodného rozpúšťadla. Zmes sa potom ochladí kvôli získaniu kryštalického dihydrátu. Výhodné môže byť očkovanie.

Výhodne sa kryštalizačný roztok ochladí pomaly. Kryštalizačná zmes sa najvýhodnejšie ochladí na teplotu od teploty okolia do približne -20 °C.

### **Príklady uskutočnenia vynálezu**

Predložený vynález je ďalej ilustrovaný nasledujúcimi príkladmi a prípravami. Tieto príklady a prípravy sú len ilustračné a nemajú za cieľ obmedziť rozsah predloženého vynálezu žiadnym spôsobom.

Výrazy použité v príkladoch a prípravách majú ich bežný význam, pokiaľ nie je uvedené inak. Napríklad „°C„ znamená stupne Celzia; „mmól„ znamená milimól alebo milimóly; „g„ znamená gram alebo gramy; „ml„ znamená mililiter alebo mililitre; „soľný roztok„ znamená nasýtený vodný roztok chloridu sodného; „THF„ znamená tetrahydrofurán; „HPLC„ znamená vysokovýkonovú kvapalinovú chromatografiu; a podobne.

## Príklad 1

### Syntéza 1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu

Do kašovitej suspenzie hydridu sodného (1,1 ekviv.) v 15 ml bezvodého DMF sa pridal 4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón (0,0042 mólu) ako roztok v 10 ml DMF. Potom sa pridal etyljodid (približne 2 ekviv.). Keď sa pomocou TLC určilo, že reakcia sa skončila, reakčná zmes sa vliala na ľad a extrahovala do etylacetátu. Organická vrstva sa premývala vodou, nasledoval soľný roztok. Organická vrstva sa potom sušila nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrovala a koncentrovala za zníženého tlaku. Rezíduum sa čistilo pomocou HPLC (LC 2000), vymývajúc systémom etylacetát/hexán kvôli získaniu 3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu.

3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón (1 ekviv.) sa rozpustil v THF a pridal sa izoamylidusitan (1,2 ekviv.). Zmes sa ochladila na teplotu  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  v ľadovom kúpeli. Po kvapkách sa pridal NaHMDS (1,1 ekviv., 1M v THF). Po miešaní po dobu 1 hodinu alebo kým sa reakcia neskončila, sa zmes koncentrovala a potom okyslila 1N vodným roztokom kyseliny chlorovodíkovej a extrahovala etylacetátom. Organická časť sa sušila a koncentrovala kvôli získaniu surového produktu, ktorý sa čistil silikagelovou chromatografiou kvôli získaniu 1-hydroxyimino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu.

Hmotová spektroskopia  $(\text{M}+\text{H})^+$ : 205,1.

1-hydroxyimino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón sa rozpustil v EtOH/ $\text{NH}_3$  (20 : 1) a hydrogenoval v bombе použitím Raney niklu a vodíka (500 psi/3 447 kPa) pri teplote  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 hodín. Výsledná zmes sa filtrovala a koncentrovala kvôli získaniu oleja, ktorý sa čistil silikagelovou chromatografiou kvôli získaniu zlúčeniny z názvu.

## Príklad 2

### Syntéza 1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu

Do 20 l Mortonovej fľaše sa pridal MTBE (5,52 l, 7 objemov) a (N-metylamino)-acetaldehyd-dimetylacetal (614 g, 5 mólov) kvôli vytvoreniu roztoku za teploty okolia. Roztok hydrogenuhličitanu sodného, pripravený pridaním hydrogenuhličitanu sodného (546 g, 6,5 mólov) do vody (6,31 l, 8 objemov) sa pridal do Mortonovej reakčnej fľaše. Zmes sa ochladila na menej ako 10 °C a do ochladenej reakčnej zmesi sa po kvapkách pridával MTBE (789 ml) roztok fenylacetylchloridu (789 g, 5 mólov) po dobu 1 hodinu. Po pridaní sa reakčná zmes miešala za teploty okolia po dobu 1 hodinu. V tejto etape HPLC analýza indikovala, že reakcia sa skončila. Extrakčné spracovanie pomocou MTBE (4 objemy), sušenie nad bezvodým síranom horečnatým, nasledované koncentráciou v rotačnom odparovači, poskytlo 1,187 kg (98 %) N-metyl-N-(2,2-dimetoxyetyl)fenylacetamidu vo forme kvapaliny.

$$(M+H)^+ = 237,9.$$

Do 5 litrovej Mortonovej fľaše pod silnou dusíkovou atmosférou sa pridala  $H_2SO_4$  (1,42 l) a po kvapkách sa pridal N-metyl-N-(2,2-dimetoxyetyl)-fenylacetamid (712 g, 3 móly) do reakčnej fľaše, čo spôsobilo exotermu (22 až 78 °C). Výsledná reakčná zmes sa potom zahrievala na teplotu 110 °C po dobu 3 hodiny a potom ochladila na teplotu okolia a preniesla do 20 l Mortonovej fľaše. Za teploty menšej ako 10 °C sa reakcia zastavila vodným hydroxidom sodným (9,18 l, 5 N). Extrakčné spracovanie etylacetátom (2 x 2,85 l), sušenie nad síranom sodným, nasledované koncentráciou na pevnú látku, poskytlo 520 g (73,5 %) 3-metyl-6,7-dihydro-2H-3-benzazepín-2-ónu vo forme pevnej látky. Tento materiál sa môže rekryštalizovať z MTBE kvôli zvýšeniu čistoty kvôli získaniu pevnej látky.

Teplota topenia: 81 – 82 °C.

$$(M+H)^+ = 174,2.$$

THF (0,5 l) roztok 3-metyl-6,7-dihydro-2H-3-benzazepín-2-ónu (113,8 g, 0,657 mólu) sa ochladil na teplotu 0 °C a po kvapkách sa pridal izoamylidusitan (100,75 g,

0,86 mólu). Do výslednej zmesi sa pridal LiHMDS (1N THF roztok, 854 ml, 0,854 mólu) takou rýchlosťou, aby teplota zostala pod 10 °C. Po pridaní sa reakčná zmes nechala za miešania za teploty okolia po dobu 2 – 3 hodiny s monitorovaním postupu reakcie pomocou HPLC. Po skončení reakcie sa zmes ochladila na teplotu 0 °C a pH sa upravilo na hodnotu z 12 na 2 – 3 použitím vodného HCl (2N). Výsledný precipitát sa miešal po dobu 12 - 16 hodín pred izoláciou filtráciou a sušil kvôli získaniu 86,3 g (64,9 %) 1-hydroxyimino-3-metyl-6,7-dihydro-2H-3-benzapezín-2-ónu.

Teplota topenia: 225 – 226 °C.

$(M+H)^+ = 203,0$ .

Etanolvý roztok (525 ml) 1-hydroxyimino-3-metyl-6,7-dihydro-2H-3-benzapezín-2-ónu (35 g, 0,173 mólu) sa pridal do autoklávu s paládiom na uhlí (10 %, 3,5 g) vo forme zriedenej HCl (koncentrovaný vodný, 17,5 g v 17 ml vody) kašovitej suspenzie. Výsledná zmes sa hydrogenovala za teploty 50 °C a 250 psi (1 723 kPa), kým sa reakcia neskončila. Reakčná zmes sa filtrovala cez vrstvu celitu použitím etanolu ako rozpúšťadla a filtrát sa koncentroval na 90 ml. Voda (350 ml) sa pridala do koncentráту a výsledný roztok sa ďalej koncentroval na približne 200 ml. Do vodného roztoku sa pridal dichlórmétán (350 ml) pred úpravou pH na 11,0 – 11,5 vodným hydroxidom sodným (1N). Organická časť sa separovala a vodná časť sa extrahovala dichlórmétánom (175 ml). Skombinované extrakty sa koncentrovali na rezíduu, ktoré v pokoji kryštalizovalo kvôli získaniu zlúčeniny z názvu.

Teplota topenia: 69 – 81 °C.

$(M+H)^+ = 191,0$ .

### Príklad 3

#### Syntéza 1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu

Do 22 l Mortonovej fľaše sa pridal dichlórmétán (4,73 l, 8 objemov), N-metylfenetylamin (591 g, 4,33 mólov) a vodný hydrogenuhličitan sodný (436,7 g, 5,2 mólov v 4,73 l vody). Zmes sa ochladila na teplotu menej ako 5 °C a do ochladenej reakčnej zmesi sa po kvapkách pridal dichlórmétánový (887 ml) roztok chlóracetylchloridu (513,7 g, 4,55 mólov) v priebehu 70 minút. Po pridaní HPLC analýza ukázala, že reakcia sa skončila. Vrstvy sa separovali a vodná vrstva sa extrahovala dichlórmétánom. Kombinované organické vrstvy sa sušili nad bezvodým síranom horečnatým a koncentrovali v rotačnom odparovači kvôli získaniu 915,7 g (99,8 %) N-metyl-N-(2-fenyletyl)-1-chlóracetamidu.

(M+H) = 212,1.

Do 12 l fľaše sa pod dusíkovou atmosférou pridal N-metyl-N-(2-fenyletyl)-1-chlóracetamid (883,3 g, 4,17 mólov) a orto-dichlórbenzén (6,18 l). Pridanie chloridu hlinitého (1 319 g, 10,13 mólov) spôsobilo exotermu (22 až 50 °C). Výsledná reakčná zmes sa potom zahrievala na teplotu 165 °C po dobu 2,5 hodiny a potom sa ochladila na teplotu okolia v priebehu približne 14 hodín. Reakčná zmes sa ochladila na teplotu približne 0 °C a pridala sa v štyroch častiach do studenej vody (8,86 l, približne 5 °C) kvôli udržaniu exotermu na približne 40 °C. Vrstvy sa separovali, vodná vrstva sa extrahovala dichlórmétánom (7,07 l) a vrstvy sa separovali. Organické vrstvy sa skombinovali a extrahovali vodnou kyselinou chlorovodíkovou (8,83 l, 1N) a potom nasýteným vodným roztokom hydrogenuhličitanu sodného (7,07 l), sušili nad síranom horečnatým, skombinovali so silikagelom (883 g) a vložili do kolóny silikagelu (3,53 kg, v sinterovanej sklenenej nálevke, naplnenej ako kašovitá suspenzia v dichlórmétáne). Kolóna sa vymývala dichlórmétánom, kým sa nezískalo 25 l a potom etylacetátom kvôli získaniu produktu. Frakcie obsahujúce produkt sa odparili na 3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón vo forme zlatohnedej pevnej látky, 608 g (83 %).

V 22 l fľaši bol pod dusíkom 3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón (606 g, 3,46 mólov) a izoamylidusitan (543 g, 4,5 mólov) v THF (7,88 l). Zmes sa ochladila na teplotu približne 0 °C pred pridaním LiHMDS (1N THF roztok, 4,5 l, 4,5 mólov) takou rýchlosťou, že teplota zostala pod približne 7 °C. Po pridaní sa reakčná zmes nechala za miešania za teploty okolia po dobu približne 2 hodiny za monitorovania postupu reakcie pomocou HPLC. Po skončení reakcie sa zmes ochladila na teplotu približne 0 °C a pH sa upravilo z 12 na približne 2 – 1 použitím vodného HCl (2N). Výsledný precipitát sa miešal po dobu približne 6 hodín pred izoláciou filtráciou a sušením kvôli získaniu 1-hydroxyimino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu, 604,7 g (85,6 %).

1-hydroxyimino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón (625 g, 3,06 mólov) a 3A etanol (15,6 l) vytvorili zmes. Výsledná zmes hydrogenovala za teploty 50 °C a tlaku 250 psi (1 723 kPa) za intenzívneho miešania, kým sa reakcia neskončila (približne 4 hodiny). Reakčná zmes sa filtrovala cez vrstvu celitu použitím etanolu ako rozpúšťadla a filtrát sa koncentroval kvôli získaniu pevnej látky. Pevná látka sa spracovávala dichlórmetánom (6 l) a pridával sa 1N vodný roztok hydroxidu sodného, kým pH vodnej vrstvy nebolo medzi 11,0 – 11,5. Zmes sa miešala, vrstvy sa separovali a vodná vrstva sa extrahovala dichlórmetánom (2 l). Organické vrstvy sa sušili nad síranom horečnatým, filtrovali a odparili v rotačnom odparovači kvôli získaniu zlúčeniny z názvu 477 g (81,9 %).

#### Príklad 4

##### Syntéza (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ónu

1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzazepín-2-ón (1,544 g, 8,12 mólov) sa mierne zahrievav v 15 ml metanolu kvôli vytvoreniu roztoku. V ďalšej fľaši sa rozpustila kyselina di-p-toluoyl-L-vínna (3,12 g, 8,08 mmólov) v 15 ml metanolu a pridala pipetou do horúceho roztoku amínu. Zmes sa zahrievav do precipitácie pevných látok. Pridalo sa ďalších 30 ml metanolu kvôli vytvoreniu roztoku, ktorý sa zahrievav na teplotu spätného toku po dobu 30 – 40 minút a potom pomaly ochladil

na teplotu okolia kvôli získaniu pevnej látky. Po miešaní po dobu približne 18 hodín sa pevná látka izolovala filtráciou a premývala malým množstvom studeného metanolu kvôli získaniu 2,24 g (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu vo forme soli kyseliny di-p-toluoyl-L-vínnej (96 % výťažok, 94,7 (ee).

(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón vo forme soli kyseliny di-p-toluoyl-L-vínnej (11,83 g, 20,5 mmólov) sa rozpustil v 45 ml vodného roztoku 1,0 N hydroxidu sodného a extrahoval metylénchloridom (3 x 25 ml). Skombinované metylénchloridové vrstvy sa premývali 35 ml vodným 1,0 N roztokom hydroxidu sodného, potom soľným roztokom a sušili nad bezvodým  $\text{MgSO}_4$ . Odstránenie rozpúšťadla za vákua poskytlo zlúčeninu z názvu (3,38 g) vo forme bezfarebného oleja (87 % výťažok, 93,2 % ee).

## Príklad 5

Syntéza (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu

1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón (6,0 g, 31,5 mmólov) sa mierne zahrieval v 75 ml metanolu kvôli vytvoreniu roztoku a skombinoval s roztokom kyseliny di-p-toluoyl-L-vínnej (12,2 g, 31,5 mmólov v 75 ml horúceho metanolu. Roztok sa naočkoval a vytvorila sa pevná látka. Pridalo sa ďalších 100 ml metanolu a zmes sa nechala za miešania. Po miešaní po dobu približne 18 hodín sa pevná látka izolovala filtráciou a premývala malým množstvom studeného metanolu kvôli získaniu 6,7 g pevnej látky. Pevná látka sa skombinovala s metanolom (200 ml) a miešala. Po uplynutí 18 hodín sa pevná látka izolovala kvôli získaniu (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu vo forme soli kyseliny di-p-toluoyl-L-vínnej (4,4 g). Izolácia bázy spôsobom popísaným v príklade 4 poskytla zlúčeninu z názvu (96 % ee).

### Príklad 6

#### Syntéza (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu

V 22 l nádobe sa pod dusíkovou atmosférou zahrieval (približne 40 °C) 1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón (438 g, 2,3 mólov) kvôli získaniu roztoku v metanole (4,38 ml). V ďalšej fľaši sa rozpustila kyselina di-p-toluoyl-L-vínna (889,7 g, 2,3 mólov) v 4,38 l metanolu a zahrievala na približne 40 °C pred pridaním roztoku 1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu. Zahrievanie pokračovalo a pridalo sa ďalších 6,13 l metanolu predtým, ako sa zmes zahrievala na teplotu spätného toku po dobu približne 45 minút a potom pomaly ochladila na teplotu okolia kvôli získaniu pevnej látky. Po miešaní po dobu približne 18 hodín sa pevná látka izolovala filtráciou a premývala malým množstvom matečnej tekutiny a po sušení na vzduchu približne 2 l etylacetátu kvôli získaniu 561,6 g (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu vo forme soli kyseliny di-p-toluoyl-L-vínnej. (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón vo forme soli kyseliny di-p-toluoyl-L-vínnej, dichlórmétán (6,57 l) a 1N vodný roztok hydroxidu sodného (6,57 l) sa skombinovali a miešali. Vrstvy sa oddelili a organická vrstva sa dvakrát extrahovala 1N vodným roztokom hydroxidu sodného (3,28 l), raz soľným roztokom (2,46 l) pred sušením nad síranom horečnatým, filtráciou a odparením na rotačnom odparovači kvôli získaniu zlúčeniny z názvu, 250 g (57,4 %, 94,1 % ee).

### Príklad 7

#### Syntéza hydrochloridu (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu

1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón (31,9 g, 168 mmólov) sa suspendoval na kašu v približne 300 ml izopropylacetátu a zahrieval na teplotu 45 °C. V inej fľaši sa zahrievala kyselina (R)-(-)-D-mandľová (25,0 g, 164 mmólov)

v približne 130 ml izopropylalkoholu do vytvorenia roztoku a pridala sa do kašovitej suspenzie 1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón/izopropylacetát získanej vyššie kvôli získaniu roztoku, z ktorého sa rýchlo tvoril precipitát. Zmes sa miešala za teploty 45 °C po dobu približne 3 hodiny. Do horúceho roztoku sa pridal 5-nitrosalicylaldehyd (2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyd) (1,40 g, 8,38 mmólov, 5 % mól) a zmes sa miešala za teploty 45 °C. Po uplynutí približne 14 hodín sa kašovitá suspenzia ochladila na teplotu okolia a miešala po dobu 2 hodiny pred izoláciou pevných látok filtráciou a premývaním 70 ml studeného izopropylacetátu a sušením vo vákuovej peci za teploty 40 °C kvôli získaniu 46,62 g (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu vo forme soli kyseliny (R)-mandľovej (82,9 % výtťažok, 98,4 % ee).

(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón vo forme soli kyseliny (R)-mandľovej (2,42 g, 7,06 mmólov, 98,4 % ee) sa suspendoval na kašu v 25 ml etylacetátu za teploty okolia. Pridala sa koncentrovaná vodná kyselina chlorovodíková (1,1 ml, približne 11,2 mmólov) a zmes sa zahrievala na teplotu 50 °C za intenzívneho miešania po dobu 3,5 hodiny. Kašovitá suspenzia sa ochladila na teplotu okolia a filtrovala, premývala metyl-terc.-butyléterom (približne 10 ml) kvôli získaniu 1,48 g zlúčeniny z názvu (92,5 % výtťažok, 97,9 % ee).

### Príklad 8

Syntéza (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu

Banka sa naplnila N-t-Boc-L-alanínom (1,0 ekviv.), hydrátom hydroxybenzotriazolu (približne 1,1 ekviv.) a (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónom (1,0 ekviv.) v THF pod dusíkovou atmosférou. Do dobre miešanej zmesi sa pridala Hunigova báza (N,N-diizopropyletylamín, 1,1 ekviv.), nasledovalo EDC (1,1 ekviv.). Po miešaní po dobu od 4 do 17 hodín za teploty okolia sa rozpúšťadlo odstránilo za zníženého tlaku, rezíduum sa vybralo v etylacetáte a vode, premývalo nasýteným vodným roztokom hydrogénuhličitanu sodného, 1N

vodným HCl, soľným roztokom, sušilo nad bezvodým síranom sodným, filtrovalo a rozpúšťadlo sa odstránilo za zníženého tlaku kvôli získaniu 1-(N-t-Boc-L-alaninyl)-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu.

Hmotová spektroskopia (M+H)<sup>+</sup> 362,3.

Prúd bezvodého plynného HCl sa nechal prechádzať cez miešaný roztok 1-(N-t-Boc-L-alaninyl)-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu v 1,4-dioxane (0,03 – 0,09 M), chladeného v ľadovom kúpeli na teplotu približne 10 °C pod N<sub>2</sub> po dobu 10 – 15 minút. Roztok sa uzatvoril, chladiaci kúpeľ sa odstránil a roztok sa nechal zahriať sa na teplotu okolia za miešania po dobu 2 – 8 hodín, monitorujúc 1.0 pomocou TLC na spotrebovanie východiskového materiálu. Roztok sa koncentroval kvôli získaniu 1-(L-alaninyl)-(S)-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu, ktorý sa použil bez ďalšieho čistenia.

1-(L-alaninyl)-(S)-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-3-metyl-2H-3-benzapezín-2-ón (1,0 ekviv.), hydrát hydroxybenzotriazolu (1,1 ekviv.) a kyselina (S)-2-hydroxy-3-metyl-maslová (1,0 ekviv.) sa miešali v THF pod dusíkovou atmosférou. Hunigova báza (N,N-diizopropyletylamín 1,1 ekviv.) sa pridala do dobre miešanej zmesi, nasledoval EDC (1,1 ekviv.). Po miešaní po dobu od 4 do 17 hodín za teploty okolia sa rozpúšťadlo odstránilo za zníženého tlaku, rezíduum sa vybralo v etylacetáte (alebo podobnom rozpúšťadle) a vode, premývalo nasýteným vodným roztokom hydrogénuhličitanu sodného, 1N HCl, soľným roztokom, sušilo nad bezvodým síranom sodným a rozpúšťadlo sa odstránilo za zníženého tlaku kvôli získaniu zlúčeniny z názvu.

## Príklad 9

Syntéza (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyl)-1-(L-alaninyl)-(S)-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu

Banka sa naplnila N-t-Boc-L-alanínom (249,5 g, 1,32 mólu), hydrátom hydroxybenzotriazolu (232,2 g, 1,52 mólu) a (S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónom (250,8 g, 1,32 mólu) v THF (3,76 l) pod dusíkovou

atmosférou. Zmes sa ochladila na teplotu menšiu ako 5 °C, pridala sa Hunigova báza (N,N-diizopropyletylamín, 188,4 g, 1,45 mólu), nasledovalo EDC (283,7 g, 1,45 mólu). Po miešaní po dobu 6 hodín sa reakčná zmes zahriala na teplotu okolia a miešala po dobu približne 14 hodín. Rozpúšťadlo sa odstránilo za zníženého tlaku, rezíduum sa vybralo v etylacetáte (3,76 l) a vode (1,76 l), vrstvy sa separovali, organická vrstva sa extrahovala vodou (1,76 l), vodné vrstvy sa skombinovali a extrahovali etylacetátom (1,76 l). Organické vrstvy sa skombinovali, extrahovali nasýteným vodným roztokom hydrogénuhličitanu sodného (1,76 l), sušili nad bezvodým síranom sodným, filtrovali a odparili v rotačnom odparovači kvôli získaniu 1-(N-t-Boc-L-alaniny)-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu, 463 g (97,2 %).

Etylacetátový roztok HCl sa pripravil priechodom bezvodého plynného HCl, použitím podpovrchovej disperznej trubice, etylacetátom (1,76 l), ochladeným na teplotu približne 0 °C. Etylacetátový roztok HCl, pripravený vyššie, sa pridal do intenzívne miešanej kašovitej suspenzie 1-(N-t-Boc-L-alaniny)-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu (462 g, 1,28 mólu) v etylacetáte (3,7 l). Pridalo sa ďalšie množstvo etylacetátu (1 l) a reakčná zmes sa nechala zahriať na teplotu okolia a miešala po dobu 22 hodín. Reakčná zmes sa filtrovala kvôli získaniu pevnej látky. Pevná látka sa suspendovala v acetonitrile (5 l), zahrievala na teplotu spätného toku a potom ochladila na teplotu približne 60 °C pred filtráciou a sušením kvôli získaniu 1-(L-alaniny)-(S)-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu, 389,8 g (94,7 %).

1-(L-alaniny)-(S)-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón (369,5 g, 1,18 mólu), hydrát hydroxybenzotriazolu (207,6 g, 1,36 mólu), Hunigova báza (N,N-diizopropyletylamín, 352,2 g, 2,71 mólu) a kyselina (S)-2-hydroxy-3-metyl-maslová (140,6 g, 1,18 mólu) v THF (4,8 l) sa skombinovali pod dusíkovou atmosférou a ochladili na teplotu nižšiu ako 5 °C. Pridal sa EDC (253,7 g, 1,3 mólu) a reakčná zmes sa nechala zahriať sa na teplotu okolia a miešala. Po uplynutí približne 25 hodín sa reakčná zmes zriedila dichlórmetánom (5,54 l) a extrahovala vodou (2,22 l). Organická vrstva sa extrahovala vodou (2,22 l), vodné vrstvy sa skombinovali a extrahovali dichlórmetánom (5,54 l). Organické vrstvy sa skombinovali, extrahovali dvakrát vodou (2,22 l), nasýteným vodným roztokom hydrogénuhličitanu sodného

(2,22 l), sušili nad bezvodým síranom sodným, filtrovali a odparili v rotačnom odparovači kvôli získaniu pevnej látky 428 g (100 %). Pevná látka sa za mierneho zahrievania (40 °C) vybrala v zmesi rozpúšťadiel obsahujúcej acetón (3,42 l) a vodu (0,856 l). Roztok sa rozdelil na 2 l časti a do každej sa pridala voda (7,19 l) za zahrievania zakaleného roztoku na teplotu 50 °C. Po skončení adície vody sa zakalený roztok nechal ochladiť na teplotu okolia kvôli získaniu pevnej látky, ktorá sa miešala vo forme kašovitej suspenzie za teploty okolia po dobu približne 14 hodín pred filtráciou a sušením kvôli získaniu zlúčeniny z názvu 310,6 g (66,2 %) vo forme dihydrátu.

Pokiaľ sa použije vo forme farmaceutického prípravku, zlúčenina podľa predloženého vynálezu sa zvyčajne podáva vo forme farmaceutickej kompozície. Preto sa v inom vyhotovení predložený vynález týka farmaceutických kompozícií, obsahujúcich účinné množstvo (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu a farmaceuticky prijateľné riedidlo.

Takéto kompozície sa používajú na inhibíciu uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidového peptidu, vrátane liečenia Alzheimerovej choroby. Predložený vynález preto zahrňuje použitie (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu na výrobu liečiva na inhibíciu uvoľňovania a/alebo syntézy amyloidového peptidu a konkrétne na liečbu Alzheimerovej choroby.

(N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón sa môže podávať radom spôsobov. Zlúčenina sa môže podávať v ľubovoľnej forme alebo móde, v ktorých je zlúčenina biologicky dostupná v účinnom množstve, vrátane orálnej a parenterálnej cesty. Napríklad zlúčenina sa môže podávať orálne, inhaláciou, subkutánne, intramuskulárne, intravenózne, transdermálne, intranazálne, rektálne, okulárne, topicky, sublinguálne, bukálné a podobne.

Pri výrobe kompozícií podľa predloženého vynálezu sa účinná zložka zvyčajne mieša s excipientom, riedi excipientom alebo uzatvára v takom nosiči, ktorý môže byť vo forme kapsule, vrečka, papiera alebo ďalšieho obalu. Zlúčenina podľa

predloženého vynálezu sa môže podávať samotná alebo vo forme farmaceutickej kompozície, to znamená, skombinovaná s farmaceuticky prijateľnými riedidlami, ako sú nosiče alebo excipienty, ktorých proporcie a povaha sú určené rozpustnosťou a chemickými vlastnosťami zlúčeniny, zvoleným spôsobom podávania a štandardnou farmaceutickou praxou (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydanie, Mack Publishing Co. (1990)).

Farmaceutické kompozície sa pripravujú spôsobmi dobre známymi vo farmaceutickom odbore. Nosič alebo excipient môže byť pevný, polotuhý alebo kvapalný materiál, ktorý môže slúžiť ako vehikulum alebo médium pre účinnú zložku. Vhodné nosiče alebo excipienty sú dobre známe v odbore. Farmaceutická kompozícia sa môže upraviť na orálne použitie, inhalácie, parenterálne alebo topické podávanie a môže sa podávať pacientovi vo forme tabliet, kapsúl, aerosólov, inhalantov, čapíkov, roztokov, suspenzií a podobne.

Kvôli účelom orálneho terapeutického podávania sa môže zlúčenina zabudovať do excipientov a použiť vo forme tabliet, pastiliek, kapsúl, elixírov, suspenzií, sirupov, oplátok, žuvačiek a podobne.

Tieto prípravky by mali obsahovať aspoň 4 % zlúčeniny podľa predloženého vynálezu, ako účinnej zložky, ale množstvo zlúčeniny sa môže meniť v závislosti od konkrétnej formy a môže byť výhodne medzi 2 % až približne 90 % hmotnosti jednotky. Množstvo zlúčeniny prítomnej v kompozícii je také, aby sa získala vhodná dávka. Výhodné kompozície a prípravky podľa predloženého vynálezu môže určiť odborník v odbore.

Tablety, pilulky, kapsule, pastilky a podobne môžu tiež obsahovať jedno alebo viacero z nasledujúcich adjuvans: väzbové činidlá ako je mikrokryštalická celulóza, tragakant alebo želatína; excipienty ako je škrob alebo laktóza, dezintegranty ako je kyselina algínová, Primogel, kukuričný škrob a podobne; lubrikanty ako je stearát horečnatý, silikónový olej alebo Sterotex; glidanty ako je koloidný oxid kremičitý; a môžu sa pridať sladidlá ako je sacharóza alebo sacharín alebo chuťové činidlá ako je pepermint, metylsalicylát alebo pomarančová príchuť. Pokiaľ dávková jednotka tvorí kapsulu, môže obsahovať okrem vyššie uvedených materiálov tiež kvapalnú nosič ako je polyetylén glykol alebo masťný olej. Iné dávkové jednotky obsahujú ďalšie

rôzne materiály, ktoré modifikujú fyzikálnu formu dávkovej jednotky, napríklad ako povlaky. Tablety alebo pilulky sa preto môžu povliecť cukrom, šelakom alebo ďalšími činidlami. Sirup môže obsahovať okrem účinnej zlúčeniny sacharózu ako sladidlo a isté konzervačné činidlá, farbivá a chuťové činidlá. Materiály použité na prípravu týchto rôznych kompozícií by mali byť farmaceuticky čisté a netoxické v použitom množstve.

Kvôli účelom parenterálneho podávania môžu byť zlúčeniny podľa predloženého vynálezu vo forme roztoku alebo suspenzie. Tieto prípravky typicky obsahujú aspoň 0,1 % zlúčeniny podľa predloženého vynálezu, ale môžu obsahovať množstvo od 0,1 do približne 90 % hmotn. Množstvo zlúčeniny prítomnej v takýchto kompozíciách je také, aby umožnilo získať vhodnú dávku. Roztoky alebo suspenzie môžu tiež obsahovať jedno alebo viacero nasledujúcich adjuvans: sterilné riedidlá ako je voda pre injekcie, soľný roztok, fixované oleje, polyetylén glykoly, glycerín, propylén glykol alebo ďalšie syntetické rozpúšťadlá; antibakteriálne činidlá ako je benzylalkohol alebo metylparabén; antioxidanty ako je kyselina askorbová alebo hydrogénsiričitán sodný; chelatačné činidlá ako je kyselina etyléndiamíntetraoctová; pufre ako sú acetáty, citráty alebo fosfáty a činidlá na úpravu tonicity ako je chlorid sodný alebo dextróza. Parenterálny prípravok môže byť uzatvorený v ampule, striekačke na jedno použitie alebo nádobke s viacerými dávkami, vyrobenej zo skla alebo plastu. Výhodné kompozície a prípravky môžu určiť odborníci v odbore.

Zlúčenina podľa predloženého vynálezu sa môže tiež podávať topicky a ak je to tak, nosič môže obsahovať roztok, masť alebo gélovú bázu. Bázy môžu napríklad obsahovať jednu alebo viacero z nasledujúcich látok: petrolátum, lanolín, polyetylén glykoly, včelí vosk, minerálny olej, riedidlá ako je voda a alkohol a emulzifikátory a stabilizátory. Topické prípravky môžu obsahovať koncentráciu zlúčeniny všeobecného vzorca I alebo jej farmaceutickej soli od približne 0,1 až približne 10 % hmotn./obj. (hmotnosť na jednotku objemu).

Ďalšie výhodné prípravky podľa predloženého vynálezu používajú transdermálne podávacie zariadenie („náplasti“). Takéto transdermálne náplasti sa môžu použiť na získanie kontinuálnej alebo diskontinuálnej infúzie zlúčeniny podľa predloženého vynálezu v kontrolovaných množstvách. Konštrukcia a použitie

transdermálnych náplastí na podávanie farmaceutických činidiel je dobre známe v odbore, pozri napríklad US patent 5,023,252, vydaný 11. júna 1991, uvedený ako referencia. Takéto transdermálne náplasti sa môžu konštruovať na kontinuálne a nárazové podávanie farmaceutických činidiel alebo na podávanie v prípade potreby.

Kvôli ďalšej ilustrácii predloženého vynálezu sú ďalej uvedené typické farmaceutické kompozície. Tieto príklady sú len ilustratívne a nemyslia sa ako akékoľvek obmedzenie rozsahu predmetu predloženého vynálezu.

### Príklad prípravku 1

Pripravujú sa tvrdé želatínové kapsule, obsahujúce nasledujúce zložky:

| Zložka            | Množstvo (mg/kapsula) |
|-------------------|-----------------------|
| Účinná zložka     | 30,0                  |
| Škrob             | 305,0                 |
| Stearát horečnatý | 5,0                   |

Vyššie uvedené zložky sa zmiešajú a plnia do tvrdých želatínových kapsúl v množstve 340 mg.

**Príklad prípravku 2**

Tablety sa pripravujú použitím nasledujúcich zložiek.

| Zložka                     | Množstvo (mg/tableta) |
|----------------------------|-----------------------|
| Účinná zložka              | 25,0                  |
| Celulóza, mikrokryštalická | 200,0                 |
| Koloidný oxid kremičitý    | 10,0                  |
| Kyselina stearová          | 5,0                   |

Zložky sa zmiešajú a lisujú kvôli vytvoreniu tabliet, každá s hmotnosťou 240 mg.

**Príklad prípravku 3**

Vyrobí sa suchý práškový inhalačný prípravok obsahujúci nasledujúce zložky:

| Zložka        | Hmotnosť % |
|---------------|------------|
| Účinná zložka | 5          |
| Laktóza       | 95         |

Účinná zložka sa zmieša s laktózou a zmes sa pridá do inhalačného prístroja pre suchý prášok.

**Príklad prípravku 4**

Tablety, každá obsahujúca 30 mg účinnej zložky, sa pripravujú nasledujúcim spôsobom:

| Zložka                                                | Množstvo (mg/tableta) |
|-------------------------------------------------------|-----------------------|
| Účinná zložka                                         | 30,0                  |
| Škrob                                                 | 45,0                  |
| Mikrokryštalická celulóza                             | 35,0                  |
| Polyvinylpyrolidón (ako 10 % roztok v sterilnej vode) | 4,0                   |
| Sodná soľ karboxymetylškrobu                          | 4,5                   |
| Stearát horečnatý                                     | 0,5                   |
| Mastenec                                              | 1,0                   |
| Celkovo                                               | 120                   |

Účinná zložka, škrob a celulóza sa preosievajú cez sito s veľkosťou ôk 20 U.S. mesh a dôkladne sa premiešajú. S výsledným práškom sa zmieša roztok polyvinylpyrolidónu a preosieva sa cez sito s veľkosťou ôk 16 U.S. mesh. Takto získané granule sa sušia za teploty 50 až 60 °C a preosievajú cez sito s veľkosťou ôk 16 U.S. mesh. Sodná soľ karboxymetylškrobu, stearát horečnatý a mastenec, vopred preosiate cez sito s veľkosťou ôk 30 U.S. mesh, sa potom pridajú ku granulám, ktoré sa po miešaní lisujú na tabletovacom stroji kvôli získaniu tabliet, každá s hmotnosťou 150 mg.

**Príklad prípravku 5**

Kapsule, každá obsahujúca 40 mg lieku, sa vyrabia nasledujúcim spôsobom:

| Zložka            | Množstvo (mg/kapsula) |
|-------------------|-----------------------|
| Účinná zložka     | 40,0                  |
| Škrob             | 109,0                 |
| Stearát horečnatý | 1,0                   |
| Celkovo           | 150,0                 |

Účinná zložka, škrob a stearát horečnatý sa zmiešajú, preosievajú cez sito s veľkosťou ôk 20 U.S. mesh a plnia do tvrdých želatínových kapsúl v množstve 150 mg.

**Príklad prípravku 6**

Čapíky, každý obsahujúci 25 mg účinnej zložky, sa vyrabia nasledujúcim spôsobom:

| Zložka                                   | Množstvo (mg) |
|------------------------------------------|---------------|
| Účinná zložka                            | 5             |
| Glyceridy nasýtených mastných kyselín do | 2 000         |

Účinná zložka sa preosieva cez sito s veľkosťou ôk 60 U.S. mesh a suspenduje v glyceridoch nasýtených mastných kyselín vopred roztavených použitím minimálneho nutného množstva tepla. Zmes sa vleje do čapíkovej formy s nominálnou kapacitou 2,0 g a nechá ochladnúť.

**Príklad prípravku 7**

Suspenzie, každá obsahujúca 50 mg lieku na 5,0 ml, sa vyrabia nasledujúcim spôsobom:

| Zložka                                | Množstvo |
|---------------------------------------|----------|
| Účinná zložka                         | 50,0 mg  |
| Xantánová guma                        | 4,0 mg   |
| Sodná soľ karboxymetylcelulózy (11 %) | 50,0 mg  |
| Mikrokryštalická celulóza (89 %)      |          |
| Sacharóza                             | 1,75 g   |
| Benzoát sodný                         | 10,0 mg  |
| Chuťové činidlo a farbivo             | q.v.     |
| Čistá voda do                         | 5,0 ml   |

Účinná zložka, sacharóza a xantánová guma sa zmiešajú, preosievajú cez sito s veľkosťou ôk 10 U.S. mesh a potom zmiešajú s vopred vyrobeným roztokom mikrokryštalickej celulózy a sodnej soli karboxymetylcelulózy vo vode. Benzoát sodný, chuťové činidlo a farbivo sa zriedia časťou vody a pridajú sa za miešania. Kvôli dosiahnutiu požadovaného objemu sa potom pridá dostatok vody.

**Príklad prípravku 8**

Kapsule, každá obsahujúca 15 mg lieku, sa vyrabia nasledujúcim spôsobom:

| Zložka            | Množstvo (mg/kapsula) |
|-------------------|-----------------------|
| Účinná zložka     | 15,0                  |
| Škrob             | 407,0                 |
| Stearát horečnatý | 3,0                   |
| Celkovo           | 425,0                 |

Účinná zložka, škrob a stearát horečnatý sa zmiešajú, preosievajú cez sito s veľkosťou ôk 20 U.S. mesh a plnia do tvrdých želatínových kapsúl v množstve 560 mg.

#### Príklad prípravku 9

Subkutánny prípravok sa môže pripraviť nasledujúcim spôsobom:

| Zložka         | Množstvo |
|----------------|----------|
| Účinná zložka  | 1,0 mg   |
| Kukuričný olej | 1 ml     |

V závislosti od rozpustnosti účinnej zložky v kukuričnom oleji sa môže použiť približne 5,0 mg alebo viac účinnej zložky (ak sa to požaduje).

### Príklad prípravku 10

Topický prípravok sa môže pripraviť nasledujúcim spôsobom:

| Zložka              | Množstvo |
|---------------------|----------|
| Účinná zložka       | 1 – 10 g |
| Emulzifikačný vosk  | 30 g     |
| Kvapalný parafín    | 20 g     |
| Biely mäkký parafín | do 100 g |

Biely mäkký parafín sa zahrieva do roztavenia. Kvapalný parafín a emulzifikačný vosk sa pridajú a miešajú do rozpustenia. Pridá sa účinná zložka a mieša, kým nevznikne disperzia. Zmes sa potom ochladí do stuhnutia.

V jednom zo svojich spôsobov sa predložený vynález týka spôsobu inhibície uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidového peptidu, zahrňujúceho podávanie pacientovi, ktorý to potrebuje, účinného množstva (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu. V konkrétnom spôsobe vyhotovenia sa predložený vynález týka spôsobu liečenia Alzheimerovej choroby, zahrňujúceho podávanie pacientovi, ktorý to potrebuje, účinného množstva (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu.

Je známe, že odborník v odbore môže ovplyvniť Alzheimerovu chorobu liečením pacienta postihnutého ochorením alebo profylakticky ošetrovať pacienta s rizikom vývoja ochorenia. Výrazy „liečenie“, a „liečba“, sa myslia tak, že sa týkajú všetkých spôsobov, v ktorých sa môže spomaliť, prerušiť, zabrzdiť, riadiť alebo zastaviť postup Alzheimerovej choroby, ale nemusí nutne znamenať úplné odstránenie všetkých symptómov. Ako také spôsoby zahrňujú prevenciu nástupu Alzheimerovej choroby u pacienta s rizikom vývoja Alzheimerovej choroby, inhibíciu postupu Alzheimerovej choroby a liečenie pokročilej Alzheimerovej choroby.

Ako sa tu používa, výraz „pacient,“ znamená teplokrvného živočícha, ako je cicavec, ktorý je postihnutý poruchou, súvisiacou s nárastom uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidového peptidu, vrátane Alzheimerovej choroby. Príklady takýchto živočíchov zahŕňujú škrečky, psy, mačky, krysy, myši, kone, hovädzi dobytok, ovce a človeka. Pacienti, ktorí potrebujú takéto liečenie, sa ľahko diagnostikujú.

Ako sa tu používa, výraz „účinné množstvo,“ zlúčeniny všeobecného vzorca I znamená množstvo, ktoré je účinné na inhibíciu uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidového peptidu a špecificky na liečenie Alzheimerovej choroby.

Ošetrojúci lekár vykonávajúci diagnózu, ako odborník v odbore, môže ľahko určiť účinné množstvo, použitím bežných techník a pozorovaním výsledkov dosiahnutých za analogických okolností. Pri určovaní účinného množstva dávky (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu musí ošetrojúci lekár, ktorý určuje diagnózu, zobrať do úvahy rad faktorov, vrátane, ale neobmedzujúcim spôsobom: silu a vlastnosti (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu; druh pacienta; jeho veľkosť, vek a všeobecný zdravotný stav; stupeň pokročilosti alebo závažnosti ochorenia; odozvu individuálneho pacienta; spôsob podávania; vlastnosti podávaných prípravkov týkajúcich sa biologickej dostupnosti; zvolený dávkový režim; použitie ďalších súčasne podávaných liekov; a ďalšie relevantné okolnosti.

Účinné množstvo (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu je zvyčajne v rozsahu od približne 0,1 miligramov na kilogram telesnej hmotnosti denne (mg/kg/deň) do približne 100 mg/kg/deň. Výhodné množstvo môže odborník v odbore ľahko určiť. Predpokladá sa, že účinné množstvo (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón anhydrátu je v rozmedzí od približne 0,1 mg/kg/deň telesnej hmotnosti do približne 100 mg/kg/deň. Výhodné množstvo môže určiť odborník v odbore.

Anhydrát (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butýryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu sa podľa predloženého vynálezu môže testovať v rôznych biologických systémoch, ktoré zahrňujú nasledujúce systémy.

## **Príklad A**

### **Bunkové triedenie pre detekciu inhibítorov tvorby amyloidu**

Rad zlúčenín všeobecného vzorca I uvedeného vyššie sa testoval na ich schopnosť inhibovať tvorbu beta-amyloidu v bunkových líniiach obsahujúcich švédsku mutáciu. Tento test používa bunky (K293 = ľudská ľadvinová bunková línia), ktoré boli stabilne transfekované génom pre amyloidový prekursorový proteín 751 (APP751), obsahujúci dvojité mutácie Lys<sub>651</sub>Met<sub>652</sub> na Asn<sub>651</sub>Leu<sub>652</sub> (číslovanie APP 751) spôsobom popísaným v medzinárodnej publikovanej patentovej prihláške č. 94/105 698 a Citron a kol. Táto mutácia sa zvyčajne nazýva švédska mutácia a bunky, označené ako „293 751 SWE“, sa umiestnili do 96-jamkových doštičiek Corning, 2 – 4 x 10<sup>4</sup> buniek na jamku v Dulbeccovom minimálnom esenciálnom médiu (Sigma, St. Louis, MO, USA) plus 10 % fetálne hovädzie sérum. Počet buniek je dôležitý na dosiahnutie výsledkov ELISA testov na beta-amyloid v lineárnom úseku testu (približne 0,2 až 2,5 ng na ml.).

Po inkubácii cez noc za teploty 37 °C v inkubátore ekvilibrovanom 10 % oxidom uhličitým sa médium odobralo a nahradilo 200 µl na jamku média obsahujúceho zlúčeninu všeobecného vzorca I (liek) po dvojhodinovú periódu pred ošetrením a bunky sa inkubovali vyššie uvedeným spôsobom. Zásobné roztoky lieku sa pripravili v 100 % dimetylsulfoxidu tak, že kvôli konečnej koncentrácii lieku použitého na ošetrovanie koncentrácia dimetylsulfoxidu nepresiahla 0,5 % a zvyčajne sa rovnala 0,1 %.

Na konci periódy pred ošetrením sa médiá opäť odobrali a nahradili médiom obsahujúcim čerstvý liek, ako bolo uvedené vyššie, a bunky sa inkubovali ďalšie dve hodiny. Po ošetrení sa doštičky centrifugovali v prístroji Beckman GPR za 1 200 ot./min. päť minút za teploty okolia na pelety zvyškov buniek z média. Z každej jamky

sa 100  $\mu$ l média alebo jeho zodpovedajúceho zriedenia prenieslo na doštičku ELISA vopred pokrytú protilátkou 266 (P. Seubert, Nature (1992), 359, 325 – 327) proti aminokyselinám 13 - 28 beta-amyloidového peptidu, ako je popísané vo zverejnenej medzinárodnej patentovej prihláške č. 94/105 698 a uchovalo pri teplote 4 °C cez noc. Test ELISA, používajúci označenú protilátku 3D6 (P. Seubert, Nature (1992), 359, 325 – 327) proti aminokyselinám 1 – 5 beta-amyloidového peptidu, sa vykonával nasledujúci deň kvôli určeniu množstva vytvoreného beta-amyloidového peptidu.

Cytotoxické účinky zlúčenín sa merali modifikáciou spôsobu podľa Hansen a kol. K bunkám, ktoré zostali na doštičke s bunkovou kultúrou, sa pridalo 25  $\mu$ l zásobného roztoku (5 mg/ml) 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromidu (MTT) (Sigma, St. Louis, MO, USA) na konečnú koncentráciu 1 mg/ml. Bunky sa inkubovali za teploty 37 °C jednu hodinu a bunková aktivita sa zastavila pridaním rovnakého objemu MTT lýzového pufru (20 % hmotn./obj.) v dodecylsulfáte sodnom v 50 % dimetylformamidu, pH 4,7). Úplná extrakcia sa dosiahla trepaním cez noc za teploty okolia. Rozdiel OD562 a OD650 sa meral na čítačke mikrodôštičiek Molecular Device UVmax ako indikátor životnosti buniek.

Výsledky testu ELISA na beta-amyloidový peptid sa vyniesli do štandardnej krivky a vyjadrili v ng/ml beta-amyloidového peptidu. Kvôli normalizácii na cytotoxicitu sa tieto výsledky delili výsledkami MTT a vyjadrili percentom výsledkov z kontrolnej vzorky bez lieku. Všetky výsledky sú stredné hodnoty a štandardné odchýlky aspoň šiestich opakovaných testov.

## **Príklad B**

### **In vivo supresia uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidu**

Tento príklad ilustruje, ako zlúčeniny podľa predloženého vynálezu sa môžu testovať na in vivo supresiu uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidu. Na tieto experimenty sa použili 3 až 4 mesiace staré PDAPP myši (Games a kol., (1995), Nature, 373, 523 – 527). V závislosti od toho, ktorá zlúčenina sa testovala, zlúčenina

bola zvyčajne v koncentrácii medzi 1 a 10 mg/ml. V dôsledku nízkej rozpustnosti zlúčenín sa tieto môžu podávať v rôznych vehikulách, ako je kukuričný olej (Safeway, South San Francisco, CA, USA); 10 % etanol v kukuričnom oleji; 2-hydroxypropyl-beta-cyklodextrín (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA); a karboxymetylcelulóza (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Myši sa subkutánne dávkovali ihlou kalibra 26 a 3 hodiny potom sa zvieratá usmrtili narkózou v CO<sub>2</sub> a krv sa odobrala srdcovou punkciou použitím tuberkulínovej striekačky/ihly 1 cc 25G 5/8,, pokrytej roztokom 0,5 M EDTA, pH 8,0. Krv sa uložila do vákuovej skúmavky Becton Dickinson obsahujúcej EDTA a centrifugovala 15 minút pri 1 400 x g za teploty 5 °C. Mozgy myší sa potom odobrali a kôra a hipokampus sa vybrali a uložili na ľad.

### 1. Mozgový test

Kvôli príprave tkaniva hipokampu a kôry pre testy ELISA sa každá mozgová oblasť homogenizovala v 10 objemoch ľadovo studeného guanidínového pufru (5,0 M guanidín – HCl, 50 mM Tris – HCl, pH 8,0) použitím motorového mažiara Kontes (Fisher, Pittsburgh PA, USA). Homogenizáty sa jemne kolísali na rotujúcej platforme tri až štyri hodiny za teploty okolia a uchovávali za teploty –20 °C pred meraním množstva beta-amyloidu.

Mozgové homogenizáty sa zriedili 1 : 10 ľadovo studeným kazeínovým pufrom (0,25 % kazeín, fosfátovo pufrovaný soľný roztok (PBS), 0,05 % azid sodný/ 20 g/ml aprotinínu/5 mM EDTA, pH 8,0, 10 g/ml leupeptínu), čím sa znížila konečná koncentrácia guanidínu na 0,5 M pred centrifugáciou pri 16 000 x g po 20 minút za teploty 4 °C. Vzorky sa ďalej zriedili, ak to bolo nutné, kvôli dosiahnutiu optimálneho rozmedzia ELISA testu, pridaním kazeínového pufru s pridaním 0,5 M hydrochloridu guanidínu. Beta-amyloidové štandardy (aminokyseliny 1 – 40 alebo 1 – 42) sa pripravili tak, že konečné zloženie zahrňovalo 0,5 M guanidín v prítomnosti 0,1 % hovädzieho sérového albumínu (BSA).

Úplný sendvičový test ELISA na beta-amyloid, určujúci beta-amyloid (aminokyseliny 1 – 40) i beta-amyloid (aminokyseliny 1 – 42) pozostáva z dvoch monoklonálnych protilátok (mAb) na beta-amyloid. Záchytná protilátka 266 (P. Seubert, Nature (1992), 359, 325 – 327) je špecifická na aminokyseliny 13 – 28 beta-

amyloidu. Protilátka 3D6 (Johnson - Wood a kol., PNAS USA (1997), 94, 1550 - 1555), ktorá je špecifická na aminokyseliny 1 – 5 beta-amyloidu, sa biotinyluje a slúži ako reportérová protilátka testu. 3D6 biotinylačná procedúra používa protokol výrobcu (Pierce, Rockford, IL, USA) pre NHS-biotínové označovanie imunoglobulínov s výnimkou, že sa použil 100 mM hydrogénuhličitan sodný, pH 8,5, ako pufo. Protilátka 3D6 nerozoznáva vylučovaný amyloidový prekursorový proteín (APP) alebo APP s plnou dĺžkou, ale detekuje len typy beta-amyloidu s amino – terminálnou kyselinou aspartovou. Test má nižší limit citlivosti približne 50 pg/ml (11 pM) a nemá krížovú reaktivitu s endogénnym myším beta-amyloidovým peptidom pri koncentráciách až do 1 ng/ml.

Konfigurácia sendvičového ELISA určujúca množstvo beta-amyloidu (aminokyseliny 1 – 42) používa mAb 21F12 (Johnson – Wood a kol., PNAS USA (1997), 94, 1550 – 1555) (ktorá rozoznáva aminokyseliny 33 – 42 beta –amyloidu) ako záchytnú protilátku. Biotinylovaná 3D6 je tiež reportérovou protilátkou tohto testu, ktorý má nižší limit citlivosti približne 125 pg/ml (28 pM).

Záchytné monoklonálne protilátky 266 a 21F12 sa nanesú v množstve 10 µg/ml do 96-jamkových imunitestovacích doštičiek (Costar, Cambridge, MA, USA) cez noc za teploty okolia. Doštičky sa potom odsajú a blokujú 0,25 % ľudským sérovým albumínom v PBS pufre aspoň 1 hodinu za teploty okolia, potom sa uchovávajú desikované za teploty 4 °C do použitia. Doštičky sa rehydratujú premývacím pufrom (Tris – pufrovaný soľný roztok, 0,05 % Tween 20) pred použitím. Vzorky a štandardy sa pridajú na doštičky a inkubujú cez noc za teploty 4 °C. Doštičky sa premývajú trikrát premývacím pufrom medzi každým krokom pokusu. Biotinylované 3D6, zriedené na 0,5 µg/ml v kazeínovom inkubačnom pufre (0,25 % kazeín, PBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) sa inkubujú v jamke 1 hodinu za teploty okolia. Do jamiek sa pridá Avidín – HRP (Vector, Burlingame, CA, USA) zriedený na 1 : 4 000 v kazeínovom inkubačnom pufre na 1 hodinu za teploty okolia. Pridá sa kolorimetrický substrát, Slow TMB-ELISA (Pierce, Cambridge, MA, USA) a nechá sa reagovať 15 minút, potom sa enzymatická reakcia zastaví pridaním 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reakčný produkt sa kvantifikuje použitím prístroja Molecular Devices UVmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA) merajúcim rozdiel absorpcie na vlnových dĺžkach 450 nm a 650 nm.

## 2. Krvný test

EDTA plazma sa zriedi 1 : 1 vo vzorkovom riedidle (0,2 gm/l fosforečnan sodný \* H<sub>2</sub>O (monobázický), 2,16 gm/l fosforečnan sodný \* 7H<sub>2</sub>O (dibázický), 0,5 gm/l timerosal, 8,5 gm/l chlorid sodný, 0,5 ml Triton X-405, 6,0 g/l hovädzí sérový albumín bez globulínu; a voda). Vzorky a štandardy vo vzorkovom riedidle sa testujú použitím úplného beta-amyloidového testu (266 záchytná/3D6 reportérová) popísaného vyššie pre mozgový test s výnimkou, že vzorkové riedidlo sa použilo namiesto kazeínových riedidiel popísaných vyššie.

Z vyššie uvedeného popisu sú odborníkovi v odbore zrejmé rôzne modifikácie a zmeny popisovaných zložení a spôsobov. Všetky takéto modifikácie spadajúce do rozsahu priložených patentových nárokov spadajú do rozsahu predloženého vynálezu.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Zlúčenina (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón.
2. Farmaceutická kompozícia, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ón a farmaceuticky prijateľné riedidlo.
3. Spôsob inhibície uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidového peptidu, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje podávanie pacientovi, ktorý to potrebuje, účinného množstva (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu.
4. Spôsob liečenia Alzheimerovej choroby, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje podávanie pacientovi, ktorý to potrebuje, účinného množstva (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu.
5. Spôsob prevencie Alzheimerovej choroby, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje podávanie pacientovi, ktorý to potrebuje, účinného množstva (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaninyl)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu.

6. Spôsob inhibície postupu Alzheimerovej choroby, **vyznačujúci sa tým**, že zahŕňa podávanie pacientovi, ktorý to potrebuje, účinného množstva (N)-((S)-2-hydroxy-3-metyl-butyryl)-1-(L-alaniny)-(S)-1-amino-3-metyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-3-benzapezín-2-ónu.
7. Zlúčenina podľa nároku 1 na použitie ako liečivo.
8. Zlúčenina podľa nároku 1 na použitie na liečenie Alzheimerovej choroby.
9. Zlúčenina podľa nároku 1 na použitie na prevenciu Alzheimerovej choroby.
10. Zlúčenina podľa nároku 1 na použitie pri inhibícii uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidového peptidu.
11. Zlúčenina podľa nároku 1 na použitie pri inhibícii postupu Alzheimerovej choroby.
12. Použitie zlúčeniny podľa nároku 1 na výrobu liečiva na inhibíciu uvoľňovania a/alebo syntézy beta-amyloidového peptidu, vrátane liečby Alzheimerovej choroby.
13. Použitie zlúčeniny podľa nároku 1 na výrobu liečiva na prevenciu Alzheimerovej choroby a/alebo inhibíciu postupu Alzheimerovej choroby.