

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области фармацевтической и органической химии и относится к соединению, ингибирующему высвобождение β -амилоидного пептида и/или его синтез.

Предпосылки создания изобретения

Некоторые лактамы, которые ингибируют высвобождение β -амилоидного пептида и/или его синтез и, соответственно, полезны при лечении болезни Альцгеймера, описаны в заявке РСТ № РСТ/US97/22986.

Настоящее изобретение относится к новому кристаллическому дигидрату (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она, его композициям, способам его использования, способам его получения. Кристаллический дигидрат по настоящему изобретению полезен для ингибиования высвобождения β -амилоидного пептида и/или его синтеза и, соответственно, полезен при лечении болезни Альцгеймера.

Поскольку (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он полезен при лечении болезни Альцгеймера, имеется необходимость получать его в чистой, стабильной и кристаллической форме для соответствия строгим фармацевтическим требованиям и техническим условиям. Новый кристаллический дигидрат по данному изобретению обладает подходящими свойствами для легкого введения в рецептуру лекарственного средства в коммерческом масштабе, например, в таблетки для перорального введения.

Способ, с помощью которого получают (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он, также должен быть удобным для эксплуатации в промышленном масштабе. Кроме того, продукт должен быть в форме, которая легко фильтруется, легко сушится и хранится удобным образом. Более того, настоящий кристаллический дигидрат должен иметь подходящие свойства для обработки и хранения.

Было установлено, что (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 получен в форме дигидрата, имеющей благоприятные свойства, и способ получения новой формы удовлетворяет желаемым отличительным особенностям, описанным выше.

Краткое изложение сущности изобретения

Данное изобретение относится к дигидрату (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 осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей дигидрат (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.

В одном из аспектов, относящихся к способам, данное изобретение относится к способу ингибиования высвобождения (β -амилоидного пептида и/или его синтеза, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества дигидрата (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 осуществления способа настоящее изобретение относится к способу лечения болезни Альцгеймера, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она. Настоящее изобретение также относится к способу профилактики или ингибиования прогрессирования болезни Альцгеймера, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению дигидрата (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 получения лекарственного средства для ингибиования высвобождения β -амилоидного пептида и/или его синтеза, включая лечение болезни Альцгеймера.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способу получения дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

Подробное описание изобретения

Как использовано в данном описании, приведенные ниже термины и значения указывают:

Термин «ее» или «энантиомерный избыток» относится к проценту, в котором один энантиомер E_1 находится в избытке в смеси двух энантиомеров (E_1+E_2), как рассчитано 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 или с помощью хиральной ВЭЖХ соединений или их производных.

Для ссылки на конкретные изомеры в данном описании использованы обозначения Канна-Прелога-Ингольда (R)- и (S)- и обозначения L- и D- для стереохимии, относящейся к изомерам глицеральдегида.

Настоящее изобретение относится к дигидрату (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, в частности, кристалличес-

скому дигидрату (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 характеристики кристаллических форм органических соединений доступен ряд методов. Например, методы включают дифференциальную сканирующую калориметрию, ЯМР спектроскопию твердого состояния, инфракрасную спектроскопию и порошковый рентгеноструктурный анализ. Среди них порошковый рентгеноструктурный анализ и ЯМР спектроскопия твердого состояния очень полезны для идентификации и распознавания отличий между кристаллическими формами.

Порошковый рентгеноструктурный анализ проводили следующим образом. Либо незначительно измельчая образец с помощью агатовой ступки и пестика, либо нет, образец загружают в держатель образца для снятия порошковой рентгенограммы. Порошковую рентгенограмму снимали с помощью рентгеновского дифрактометра на порошке Siemens D5000, оборудованного CuK_α источником ($\lambda=1,54056\text{\AA}$) и функционирующего при 50 кВ и 40 мА, с использованием размера расходящейся щели 1 мм, принимающей щели - 1 мм и детекторной щели - 0,1 мм. Каждый образец сканировали в диапазоне от 4 до 35° (20) с шагом $0,02^\circ$ и максимальной скоростью сканирования 3 с/шаг. Данные собирали с использованием твердотельного кремний-литиевого детектора Kevex. Оптимально, кремниевый стандарт проводят регулярно для проверки регулировки прибора.

Хорошо известно в области кристаллографии, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности и ширина пика дифракционных пиков могут изменяться в зависимости от ряда факторов, включая влияние предпочтительной ориентации и/или размера частиц. Там, где присутствует влияние предпочтительной ориентации и/или размера частиц, интенсивность пика может изменяться, но положения характеристических пиков полиморфа остаются неизменными. См., например, The United States Pharmacopeia (Фармакопея Соединенных Штатов) #24, National Formulary (Национальный формляр) #19, стр. 1843-1844, 2000.

Измельчение используют для сведения к минимуму изменения интенсивности у пиков некоторых описываемых в данной заявке рентгенограмм. Однако, если измельчение значительно изменяет рентгенограмму или изменяет кристаллическое состояние образца, тогда следует использовать рентгенограмму неизмельченного образца. Измельчение проводили пестиком в небольшой агатовой ступке. Ступку держали во время измельчения и к пестику применяли легкое давление.

Положение пика получали в 2θ значениях и для пиков с наиболее заметными свойствами (относительная интенсивность больше 20%) измеряли интенсивность с использованием метода выделения пиков через двойную производную.

Соответственно, настоящее изобретение относится к кристаллическому дигидрату (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она, характеризующемуся порошковой рентгенограммой, приведенной в табл. 1, в которой перечислены 20 значения и значения относительной интенсивности (I_0/I_{100}), превышающие 20%, измеренные для неизмельченного образца и для образца после 5 и 10 мин измельчения, и с использованием методологии, описанной выше, при CuK_α радиации:

Таблица 1

Без измельчения		5 минут измельчения		10 минут измельчения	
2θ (°)	I_0/I_{100} (%)	2θ (°)	I_0/I_{100} (%)	2θ (°)	I_0/I_{100} (%)
8,361	100	8,349	87,6	8,367	88,7
12,433	51,4	12,429	78,5	12,424	91,6
		13,24	27,9	13,254	30,4
15,344	49,8	15,336	100	15,352	100
		16,858	28,5	16,88	28,3
19,224	27,9	19,233	47,8	19,24	52
20,495	27,5	20,48	44,4		
20,63	38,8	20,644	43	20,601	48,9
		22,254	19,5	22,045	21,6
		22,63	27,6	22,654	34,9
		24,388	26,4	23,388	19,7
				24,387	28,2
				27,744	19
				22,237	21,2

Интенсивности образцов, измельченных в течение 5 и 10 мин, являются более представительными среди рентгенограмм, где были сделаны попытки свести к минимуму эффекты предпочтительной ориен-

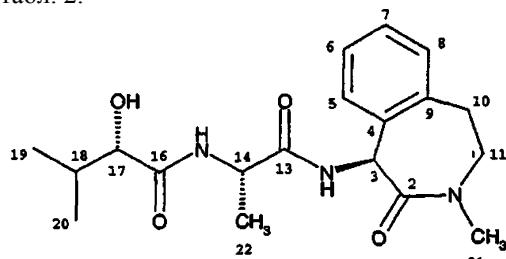
тации и/или размера частиц. Также следует отметить, что в данной таблице перечислены генерированные компьютером неокругленные цифры.

Таким образом, правильно полученный образец кристаллического дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она может быть охарактеризован рентгенограммой в виде 2Θ значений с использованием CuK_α радиации, имеющей пики, описанные в табл. 1 и, в частности, имеющей пик при 8,36, 12,43, 15,34, 19,22, 20,50 или 20,63; более конкретно, имеющей пик при 8,36, 12,43 или 15,34; пики при 8,36 и 12,43; 8,36 и 15,34; 8,36, 12,43 и 15,34; или при 8,36, 12,43, 15,34, 19,22, 20,50 и 20,63.

Кристаллический дигидрат (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она также может быть охарактеризован ЯМР спектроскопией твердого состояния. ^{13}C химические сдвиги твердого состояния отражают не только молекулярную структуру вещества, но также и электронное окружение молекулы в кристалле.

ЯМР (^{13}C) анализ для твердого состояния может быть осуществлен с использованием ^{13}C круговая поляризация/магический угол вращения (CP/MAS). Спектры ЯМР (ЯМР для твердого состояния или ЯМР-ТС) получали с использованием спектрометра Varian Unity 400 МГц, функционирующего при частоте для углерода, составляющей 100,580 МГц, и оборудованного полным набором принадлежностей для твердого состояния и 7 мм зондом Varian VT CP/MAS. Параметры режима были следующими: 90° ширина протонного электронного импульса 4,0 мкс, время контакта 1,0 мс, время повтора импульса 5 с, MAS частота 7,0 КГц, ширина спектра 50 КГц и время регистрации 50 мс. Химические сдвиги относили к метильной группе внешнего стандарта гексаметилбензола ($\delta=17,3$ м.д.), то есть, заменой образца на гексаметилбензол.

Данные химических сдвигов для дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она (на основании отнесения пиков, ниже) приведены в нижеследующей табл. 2.



Положение	Раствор в ДМСО	Дигидрат (твердый)
2, 13, 16	169,27, 171,73, 172,89	169,9*, 174,1*, 176,7*
3, 11, 14	51,45, 47,05, 47,72	46,9, 51,3
4	134,14	134,8*
5, 6	124,18, 125,99	124,0
7	127,19	127,9, 128,9
8	130,38	132,1
9	135,32	136,9*
10, 18	30,73, 31,29	31,1
17	75,01	75,6
19, 20, 22	15,99, 18,66, 19,13	16,6*, 21,4*
21	34,18	35,3*

Звездочка (*) обозначает пики, появляющиеся в прерывисто-разорванном спектре.

Таким образом кристаллический дигидрат (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она может быть охарактеризован ^{13}C ядерным магнитным резонансом для твердого состояния, имеющим химический сдвиг (м.д.): 16,6; 176,7, 174,1, 169,9, 136,9, 134,8, 132,1, 127,9, 128,9, 124,0, 75,6, 51,3, 46,9, 35,3, 31,1, 21,4 или 16,6; более конкретно, 75,6, 35,3, 21,4 или 16,6; любые два из 75,6, 35,3, 21,4 и 16,6; 75,6, 35,3, 21,4 и 16,6; или при 176,7, 174,1, 169,9, 136,9, 134,8, 132,1, 127,9, 128,9, 124,0, 75,6, 51,3, 46,9, 35,3, 31,1, 21,4 и 16,6.

В другом варианте осуществления данное изобретение обеспечивает способ получения дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она, включающий кристаллизацию (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она из водных растворителей в условиях, приводящих к дигидрату (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

Точные условия, при которых образуется дигидрат $(N)-((S)-2\text{-гидрокси-3\text{-метилбутирил}})-1\text{-}(L\text{-аланинил})-(S)-1\text{-амино-3\text{-метил-2,3,4,5\text{-тетрагидро-1H-3\text{-бензазепин-2\text{-она}}}}$, могут быть определены эмпирически и возможно только привести ряд способов, которые как было установлено, являются подходящим на практике.

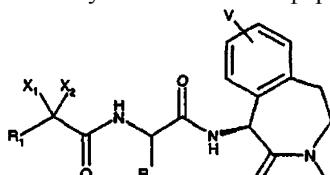
Таким образом, например, дигидрат $(N)-((S)-2\text{-гидрокси-3\text{-метилбутирил}})-1\text{-}(L\text{-аланинил})-(S)-1\text{-амино-3\text{-метил-2,3,4,5\text{-тетрагидро-1H-3\text{-бензазепин-2\text{-она}}}}$ может быть получен кристаллизацией в контролируемых условиях. Кристаллизация из раствора и способы суспензирования рассматриваются, как охватываемые объемом настоящего способа. В частности, дигидрат по настоящему изобретению может быть получен кристаллизацией из водного растворителя. Подходящим растворителем является такой, который способен содержать достаточное количество воды при используемых концентрациях для образования настоящего дигидрата. Предпочтительными растворителями являются те, которые смешиваются с водой, такие как ацетон, низшие спирты (такие как метанол, этанол и изопропанол), уксусная кислота и ацетонитрил. На практике было установлено, что предпочтительным является водный ацетон. Для данного водного растворителя количество используемой воды будет зависеть от относительной растворимости $(N)-((S)-2\text{-гидрокси-3\text{-метилбутирил}})-1\text{-}(L\text{-аланинил})-(S)-1\text{-амино-3\text{-метил-2,3,4,5\text{-тетрагидро-1H-3\text{-бензазепин-2\text{-она}}}}$ в растворителе по сравнению с водой и от того, используется ли методика кристаллизации или суспензирования.

Кристаллизацию обычно проводят, растворяя $(N)-((S)-2\text{-гидрокси-3\text{-метилбутирил}})-1\text{-}(L\text{-аланинил})-(S)-1\text{-амино-3\text{-метил-2,3,4,5\text{-тетрагидро-1H-3\text{-бензазепин-2\text{-она}}}}$ в водном растворителе, а затем оставляя раствор охлаждаться при добавлении или без добавления большего количества воды, получая твердое вещество.

Обычно кристаллизацию проводят при первоначальной температуре от примерно 40°C до температуры кипения выбранного водного растворителя с обратным холодильником. Смесь затем охлаждают, получая кристаллический дигидрат. Выигрышным может оказаться внесение затравки для кристаллизации. Предпочтительно кристаллизационный раствор охлаждают медленно. Наиболее удобно охлаждать кристаллизационный раствор до температуры окружающей среды до -20°C.

Также предложены способы получения лактамов, включая $(N)-((S)-2\text{-гидрокси-3\text{-метилбутирил}})-1\text{-}(L\text{-аланинил})-(S)-1\text{-амино-3\text{-метил-2,3,4,5\text{-тетрагидро-1H-3\text{-бензазепин-2\text{-она}}}}$, и способ получения промежуточных продуктов их синтеза.

Более конкретно, предложен способ получения лактамов формулы I



Формула I

где

R_1 представляет алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкенил, замещенный алкил, замещенный алкенил, замещенный алкинил, замещенный циклоалкил, замещенный циклоалкенил, арил, гетероарил или гетероциклик;

R_2 представляет алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклик;

R_3 представляет алкил,

X_1 представляет водород, гидрокси или фтор,

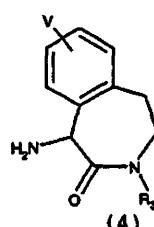
X_2 представляет водород, гидрокси или фтор, или

X_1 и X_2 вместе образуют оксогруппу; и

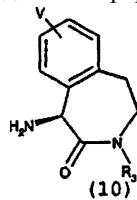
V представляет от 1 до 3 групп, независимо выбранных из группы, включающей водород, гидрокси, ацил, ацилокси, алкил, замещенный алкил, аллокси, замещенный аллокси, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, амино, аминоацил, алкарил, арил, арилокси, карбоксил, карбоксиалкил, циано, галоген, нитро, гетероарил, тиоаллокси, замещенный тиоаллокси и тригалогенметил;

включающему:

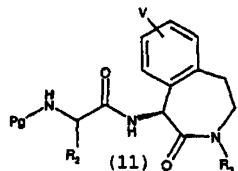
(a1) разделение лактама формулы (4)



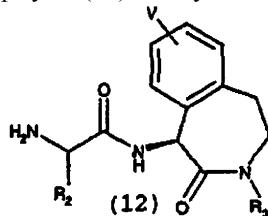
где R_3 и V являются такими, как определено для соединения формулы I, путем дробной кристаллизации, подвергая дробной кристаллизации его дibenзоилтартрат, соли (R)-(-)-10-камфорсульфоновой кислоты и (D)-(-)-миндальной кислоты, с получением соединения формулы (10)



(b) конденсацию с подходящей аминозащищенной аминокислотой формулы $PgNH-CHR_2-C(O)-A$, где R_2 является таким, как определено для соединения формулы I, и A представляет активирующую группу, например, $-OH$, $-Br$ или $-Cl$, и Pg представляет защитную группу амина, с получением соединения формулы (11)



(c) снятие защиты в соединении формулы (11) с получением соединения формулы (12); и



(d) конденсацию соединения формулы (12) с подходящим соединением формулы $R_1CX_1X_2-C(O)-A_1$, где R_1 , X_1 и X_2 являются такими, как определено для соединения формулы I, и A_1 представляет активирующую группу, например, $-OH$, $-Br$ или $-Cl$, или

(a2) конденсацию соединения формулы (10) с соединением формулы $R_1CX_1X_2-C(O)-NH-CHR_2-C(O)-A$, где R_1 , R_2 , X_1 и X_2 являются такими, как определено для соединения формулы I, и A представляет активирующую группу, например, $-OH$, $-Br$ или $-Cl$.

Как указано в данном описании, приведенные ниже термины имеют следующие значения:

«Алкил» означает одновалентные алкильные группы, предпочтительно имеющие от 1 до 10 атомов углерода и более предпочтительно 1-6 атомов углерода. Данный термин проиллюстрирован такими группами, как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, н-гексил и тому подобное.

Термин « C_1-C_4 алкил» относится к одновалентным алкильным группам, предпочтительно имеющим от 1 до 4 атомов углерода. Данный термин проиллюстрирован такими группами, как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил.

«Замещенный алкил» относится к алкильной группе, предпочтительно содержащей от 1 до 10 атомов углерода, имеющей от 1 до 5 заместителей, предпочтительно 1-3 заместителя, выбранных из группы, состоящей из аллокси, замещенного аллокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амино, аминоацила, аминоацилокси, циано, галогена, гидроксила, карбоксила, кето, тиокето, карбоксиалкила, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гидроксиамино, аллоксиамино, нитро, $-SO$ -алкила, $-SO$ -замещенного алкила, $-SO$ -арила, $-SO$ -гетероарила, $-SO_2$ -алкила, $-SO_2$ -замещенного алкила, $-SO_2$ -арила, $-SO_2$ -гетероарила,mono- и диалкиламино, mono- и ди(замещенный алкил)амино, mono- и диариламино, mono- и дигетероариламино, mono- и дигетероцикликамино, и несимметричных дизамещенных аминов, имеющих различные заместители, выбранные из алкила, замещенного алкила, арила, гетероарила и гетероциклила.

«Алкилен» относится к двухвалентным алкиленовым группам, предпочтительно имеющим от 1 до 10 атомов углерода и более предпочтительно 1-6 атомов углерода. Данный термин проиллюстрирован такими группами, как метилен ($-CH_2-$), этилен ($-CH_2CH_2-$), изомерами пропилена (например, $-CH_2CH_2CH_2$ и $-CH(CH_3)CH_2-$) и тому подобное.

«Замещенный алкилен» относится к алкиленовой группе, предпочтительно содержащей от 1 до 10 атомов углерода, содержащей от 1 до 3 заместителей, выбранных из группы, состоящей из аллокси, замещенного аллокси, ацила, ациламино, ацилокси, амино, аминоацила, аминоацилокси, циано, галогена, гидроксила, карбоксила, кето, тиокето, карбоксиалкила, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, гетероарила, гетероциклила, нитро, mono- и диалкиламино, mono- и ди(замещенный алкил)амино, mono- и диариламино, mono- и дигетероариламино, mono- и дигетероцикликамино, и несимметричных

дизамещенных аминов, имеющих различные заместители, выбранные из алкила, замещенного алкила, арила, гетероарила и гетероциклила. Дополнительно, такие замещенные алкиленовые группы включают те группы, в которых 2 заместителя в алкиленовой группе сконденсированы с образованием одной или нескольких циклоалкильных, арильных, гетероциклических или гетероарильных групп, конденсированных с алкиленовой группой. Предпочтительно такие конденсированные циклоалкильные группы содержат от 1 до 3 конденсированных кольцевых структур.

«Алкенилен» относится к двухвалентным алкениленовым группам, предпочтительно имеющим от 2 до 10 атомов углерода и более предпочтительно 2-6 атомов углерода. Данный термин проиллюстрирован такими группами как этенилен ($-\text{CH}=\text{CH}-$), изомеры пропенилена (например, $-\text{CH}_2=\text{CH}=\text{CH}-$ и $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-$) и тому подобное.

«Замещенный алкенилен» относится к алениленовой группе, предпочтительно состоящей из 2-10 атомов углерода, содержащей от 1 до 3 заместителей, выбранных из группы, состоящей из алcoxси, замещенного алcoxси, ацила, ациламино, ацилокси, амино, аминоацила, аминоацилокси, циано, галогена, гидроксила, карбоксила, кето, тиокето, карбоксиалкила, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, гетероарила, гетероциклила, нитро, моно- и диалкиламино, моно- и ди(замещенный алкил)амино, моно- и диариламино, моно- и дигетероариламино, моно- и дигетероциклизамино, и несимметричных дизамещенных аминов, имеющих различные заместители, выбранные из алкила, замещенного алкила, арила, гетероарила и гетероциклила. Дополнительно, такие замещенные алкениленовые группы включают те, в которых 2 заместителя в алкениленовой группе сконденсированы с образованием одной или нескольких циклоалкильных, арильных, гетероциклических или гетероарильных групп, конденсированных с алкениленовой группой.

«Алкарил» относится к -алкиленарильным группам, предпочтительно имеющим от 1 до 8 атомов углерода в алкиленовом фрагменте и от 6 до 10 атомов углерода в арильном фрагменте. Такие алкарильные группы проиллюстрированы бензилом, фенетилом и тому подобное.

«Алcoxси» относится к группе «алкил-О-». Предпочтительные алcoxсигруппы включают, в качестве примера, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, трет-бутокси, втор-бутокси, н-пентокси, н-гексокси, 1,2-диметилбутилокси и тому подобное.

«Замещенный алcoxси» относится к группе «замещенный алкил-О-», где замещенный алкил является таким, как определено выше.

«Алкилалcoxси» относится к группе «-алкилен-О-алкил», которая включает, в качестве примера, метиленметокси ($-\text{CH}_2\text{OCH}_3$), этиленметокси ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$), н-пропиленизопропокси ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$), метилен-трет-бутокси ($-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_3$) и тому подобное.

«Алкилтиоалcoxси» относится к группе «-алкилен-S-алкил», которая включает, в качестве примера, метилентиометокси ($-\text{CH}_2\text{SCH}_3$), этилентиометокси ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$), н-пропилентиоизопропокси ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}(\text{CH}_3)_2$), метилентио-трет-бутокси ($-\text{CH}_2\text{SC}(\text{CH}_3)_3$) и тому подобное.

«Алкенил» относится к алкенильным группам, предпочтительно имеющим от 2 до 10 атомов углерода и, более предпочтительно, от 2 до 6 атомов углерода и имеющим по крайней мере 1, и предпочтительно 1-2 места, алкенильной ненасыщенности.

Предпочтительные алкенильные группы включают этенил ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), н-пропенил ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), изопропенил ($-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$) и тому подобное.

«Замещенный алкенил» относится к алкенильной группе, как определено выше, имеющей от 1 до 3 заместителей, выбранных из группы, состоящей из алcoxси, замещенного алcoxси, ацила, ациламино, ацилокси, амино, аминоацила, аминоацилокси, циано, галогена, гидроксила, карбоксила, кето, тиокето, карбоксиалкила, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, гетероарила, гетероциклила, нитро, $-\text{SO}$ -алкила, $-\text{SO}$ -замещенного алкила, $-\text{SO}$ -арила, $-\text{SO}$ -гетероарила, $-\text{SO}_2$ -алкила, $-\text{SO}_2$ -замещенного алкила, $-\text{SO}_2$ -арила, $-\text{SO}_2$ -гетероарила, моно- и диалкиламино, моно- и ди(замещенный алкил)амино, моно- и диариламино, моно- и дигетероариламино, моно- и дигетероциклизамино, и несимметричных дизамещенных аминов, имеющих различные заместители, выбранные из алкила, замещенного алкила, арила, гетероарила и гетероциклила.

«Алкинил» относится к алкинильным группам, предпочтительно имеющим от 2 до 10 атомов углерода и, более предпочтительно, 2-6 атомов углерода и имеющим по крайней мере 1, и предпочтительно 1-2 места алкинильной ненасыщенности. Предпочтительные алкинильные группы включают этинил ($-\text{C}\equiv\text{CH}$), пропаргил ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) и тому подобное.

«Замещенный алкинил» относится к алкинильной группе, как определено выше, имеющей от 1 до 3 заместителей, выбранных из группы, состоящей из алcoxси, замещенного алcoxси, ацила, ациламино, ацилокси, амино, аминоацила, аминоацилокси, циано, галогена, гидроксила, карбоксила, кето, тиокето, карбоксиалкила, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, гетероарила, гетероцикла, нитро, $-\text{SO}$ -алкила, $-\text{SO}$ -замещенного алкила, $-\text{SO}$ -арила, $-\text{SO}$ -гетероарила, $-\text{SO}_2$ -алкила, $-\text{SO}_2$ -замещенного алкила, $-\text{SO}_2$ -арила, $-\text{SO}_2$ -гетероарила, моно- и диалкиламино, моно- и ди(замещенный алкил)амино, моно- и диариламино, моно- и дигетероариламино, моно- и дигетероциклизамино, и несимметричных дизамещенных аминов, имеющих различные заместители, выбранные из алкила, замещенного алкила, арила, гетероарила и гетероциклила.

«Ацил» относится к группам алкил-С(О)-, замещенный алкил-С(О)-, циклоалкил-С(О)-, замещенный циклоалкил-С(О)-, арил-С(О)-, гетероарил-С(О)- и гетероциклик-С(О), где алкил, замещенный алкил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклик являются такими, как определено в данном описании.

«Ациламино» относится к группе -С(О)NRR, где каждый R независимо представляет водород, алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклик, где алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклик являются такими, как определено в данном описании.

«Аминоацил» относится к группе -NRC(О)R, где каждый R независимо представляет водород, алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклик, где алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклик являются такими, как определено в данном описании.

«Аминоацилокси» относится к группе -NRC(О)OR, где каждый R независимо представляет водород, алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклик, где алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклик являются такими, как определено в данном описании.

«Ацилокси» относится к группам алкил-С(О)O-, замещенный алкил-С(О)O-, циклоалкил-С(О)O-, арил-С(О)O-, гетероарил-С(О)O- и гетероциклик-С(О)O, где алкил, замещенный алкил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклик являются такими, как определено в данном описании.

«Арил» относится к ненасыщенной ароматической карбоциклической группе из 6-14 атомов углерода, имеющей единственное кольцо (например, фенил) или поликонденсированные кольца (например, нафтил или антрил). Предпочтительные арилы включают фенил, нафтил и тому подобное.

Если другое не ограничивается определением для арильного заместителя, такие арильные группы необязательно могут быть замещены 1-5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из ацилокси, 1-5 и предпочтительно 1-3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из гидрокси, ацила, алкила, алкокси, алкенила, алкинила, замещенного алкила, замещенного алкокси, замещенного алкенила, замещенного алкинила, амино, аминоацила, ациламино, алкарила, арила, арилокси, азидо, карбоксила, карбоксиалкила, циано, галогена, нитро, гетероарила, гетероциклила, аминоацилокси, оксиациламино, тио-алкокси, замещенного тиоалкокси, тиоарилокси, тиогетероарилокси, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO₂-алкила, SO₂-замещенного алкила, -SO₂-арила, -SO₂-гетероарила, тригалогенметила,mono- и диалкиламино, mono- и ди(замещенный алкил)амино, mono- и диариламино, mono- и дигетероариламино, mono- и дигетероцикликамино, и несимметричных дизамещенных аминов, имеющих различные заместители, выбранные из алкила, замещенного алкила, арила, гетероарила и гетероциклила, и тому подобное. Предпочтительные заместители включают алкил, алкокси, галоген, циано, нитро, тригалогенметил и тиоалкокси.

«Арилокси» относится к группе арил-О-, где арильная группа является такой, как определено выше, включая необязательно замещенные арильные группы, такие как также определено выше.

«Карбоксилкил» относится к группе «-С(О)Oалкил», где алкил является таким, как определено выше.

«Циклоалкил» относится к циклическим алкильным группам из 3-12 атомов углерода, имеющим единственное циклическое кольцо, или несколько соединенных вместе колец, включая конденсированные, мостиковые и спиробициклические и полициклические соединения. Такие циклоалкильные группы включают, в качестве примера, отдельные кольцевые структуры, такие как циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклооктил и тому подобное, или структуры из нескольких колец, такие как адамантил и тому подобное.

«Замещенный циклоалкил» относится к циклоалкильным группам, имеющим от 1 до 5 (предпочтительно 1-3) заместителей, выбранных из группы, состоящей из гидрокси, ацила, ацилокси, алкила, замещенного алкила, алкокси, замещенного алкокси, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, амино, аминоацила, алкарила, арила, арилокси, кето, тиокето, карбоксила, карбоксиалкила, циано, галогена, нитро, гетероарила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, тригалогенметила и тому подобное.

«Циклоалкенил» относится к циклическим алкенильным группам из 4-8 атомов углерода, имеющим единственное циклическое кольцо и по крайней мере одно место внутренней ненасыщенности. Примеры подходящих циклоалкенильных групп включают, например, циклобут-2-енил, циклопент-3-енил, циклоокт-3-енил и тому подобное.

«Замещенный циклоалкенил» относится к циклоалкенильным группам, имеющим от 1 до 5 заместителей, выбранных из группы, состоящей из гидрокси, ацила, ацилокси, алкила, замещенного алкила, алкокси, замещенного алкокси, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, амино, аминоацила, алкарила, арила, арилокси, кето, тиокето, карбоксила, карбоксиалкила, циано, галогена, нитро, гетероарила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, тригалогенметила и тому подобное.

«Гало» или «галоген» относится к фтору, хлору, брому и иоду, и предпочтительно представляет собой либо фтор, либо хлор.

«Гетероарил» относится к ароматической карбоциклической группе из 1-15 атомов углерода и 1-4 гетероатомов, выбранных из кислорода, азота и серы, по крайней мере в одном кольце (если имеется больше одного кольца).

Если другое не ограничивается определением для гетероарильного заместителя, такие гетероарильные группы необязательно могут быть замещенными 1-5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, замещенного алкила, алкокси, замещенного алкокси, арила, арилокси, галогена, нитро, гетероарила, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, тиоарилокси, тригалогенметила и тому подобное. Такие гетероарильные группы могут иметь единственное кольцо (например, пиридил или фурил) или поликонденсированные кольца (например, индолизинил или бензотиенил), включая конденсированные, мостиковые и спиробициклические или полициклические соединения. Предпочтительные гетероарилы включают пиридил, пирролил и фурил.

«Гетероцикл» или «гетероциклик» относится к одновалентной насыщенной или ненасыщенной группе, имеющей единственное кольцо или несколько соединенных колец, включая конденсированные, мостиковые и спиробициклические или полициклические соединения, имеющие от 1 до 15 атомов углерода и от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из азота, серы или кислорода, в кольце.

Если другое не ограничивается определением для гетероциклического заместителя, такие гетероциклические группы необязательно могут быть замещены 1-5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, замещенного алкила, алкокси, замещенного алкокси, арила, арилокси, галогена, нитро, гетероарила, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, тиоарилокси, тригалогенметила и тому подобное. Такие гетероциклические группы могут иметь единственное кольцо или поликонденсированные кольца. Предпочтительные гетероциклы включают морфолино, пиперидинил и тому подобное.

Примеры азотсодержащих гетероциклов и гетероарилов включают, но не ограничиваются ими, пиррол, имидазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиридин, индолизин, изоиндол, индол, индазол, пурин, хинолизин, изохинолин, хинолин, фталазин, нафтилпиридин, хиноксалин, хиназолин, циннолин, птеридин, карбазол, карболин, фенантридин, акридин, фенантролин, изотиазол, феназин, изоксазол, феноксазин, фенотиазин, имидазолидин, имидазолин, пиперидин, пиперазин, индолин, морфолино, пиперидинил, тетрагидрофуранил и тому подобное, а также N-алкокси-азот содержащие гетероциклы.

«Оксиациламино» относится к группе -OC(O)NRR, где каждый R независимо представляет водород, алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклик, где алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил и гетероциклик являются такими, как определено в данном описании.

«Тиол» относится к группе -SH.

«Тиоалкокси» относится к группе -S-алкил.

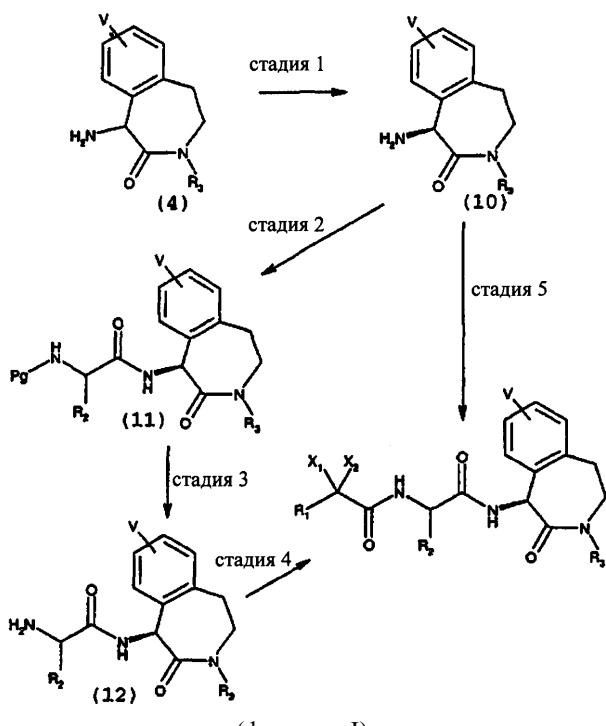
«Замещенный тиоалкокси» относится к группе -S-замещенный алкил.

«Тиоарилокси» относится к группе арил-S-, где арильная группа является такой, как определено выше, включая необязательно замещенные арильные группы, также определенные выше.

«Гетероарилокси» относится к группе гетероарил-O, где гетероарильная группа является такой, как определено выше, включая необязательно замещенные арильные группы, такие как также определено выше.

Также предложены стереоспецифические способы получения лактамов, соединений формулы I, включая (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 способы получения их хиральных промежуточных продуктов. Такие способы описаны на схеме А.

Схема А



(формула I)

На схеме А, стадия 1, показано стереохимическое разделение подходящего лактама формулы (4) с получением лактама формулы (10). Как будет по достоинству оценено квалифицированным специалистом, настоящий способ не ограничен непременно получением одного изомера. Скорее настоящие способы дают возможность получения любого специфического энантиомера лактамов и являются особенно подходящими для получения изомеров 1-амино-3-алкил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-онов.

Поскольку более высокая биологическая активность присуща (S)-изомеру 2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-онового фрагмента, настоящее изобретение наиболее полезно для получения по существу чистого (S)-изомера.

Как использовано в данном описании термин «по существу чистый» относится к энантиомерной чистоте (R)- или (S)-лактама и, в частности, (R)- и (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она. Согласно настоящему изобретению может быть получен по существу чистый (S)-1-амино-3-алкил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он, содержание в котором (S)-энантиомера составляет больше 80%, предпочтительно больше 90%, более предпочтительно больше 95%, наиболее предпочтительно больше 97%.

Например, индивидуальные изомеры соединения формулы (4) могут быть разделены дробной кристаллизацией дibenзоилтартрата, солей (R)-(-)-10-камфорсульфоновой кислоты и (D)-(-)-миндальной кислоты. Предполагается, что большой ряд дibenзоилтартратов является подходящим для данной цели. В частности, дibenзоиловые сложные эфиры, имеющие пара-заместитель, выбранный из группы, состоящей из водорода, галогена, C₁-C₄алкила и C₁-C₄алкокси, являются предпочтительными, при этом п-толуоилтартрат является наиболее предпочтительным. Ди-п-толуоил-L-тартрат используется для получения (S)-изомера.

В предпочтительном варианте осуществления схемы А, стадия 1, соединение формулы (4) представляет собой соединение, в котором V представляет водород, и R₃ представляет C₁-C₄алкил, включая метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил и втор-бутил; и наиболее предпочтительным является применение соединений формулы (4), в которых V представляет водород, и R₃ представляет метил.

В соответствии с настоящим способом соединение формулы (4) подвергают взаимодействию с выбранной кислотой. Обычно можно использовать от примерно 0,4 молярных эквивалентов до большего избытка выбранной кислоты, при этом предпочтительным является использованием от 0,4 до 1,5 молярных эквивалентов и более предпочтительно от примерно 0,5 до 1,1 молярных эквивалентов.

Способ обычно осуществляют посредством кристаллизации кислотно-аддитивной соли из раствора. В частности, подходящими являются 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, при этом метанол, этанол и изопропанол являются предпочтительными. Может быть выгодно использование антирастворителя. Как использовано в данном описании, термин «антирастворитель» относится к растворителю, в котором соль существенно менее растворима, чем в «растворителе».

Предпочтительно, когда используют антирастворитель, он смешивается с выбранным растворителем. Подходящие антирастворители включают 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, циклогексан и тому подобное.

Когда настоящий способ осуществляют кристаллизацией кислотно-аддитивной соли из рацемической смеси, следует быть осторожным при использовании антирастворителя, чтобы избежать кристаллизации соли нежелательной диастереомерной соли.

Обычно кристаллизацию проводят при первоначальной температуре от примерно 40°C до температуры кипения с обратным холодильником выбранного растворителя(ей) и при первоначальных концентрациях от примерно 0,05 молярной до примерно 0,25 молярной. Смесь затем охлаждают с получением соли. Может быть выгодно использование затравки для кристаллизации. Перемешивание первоначального осадка в течение от примерно 4 до 48 ч может быть выгодно. Предпочтительно кристаллизационный раствор охлаждают медленно. Кристаллизационную смесь наиболее легко охлаждают до температуры в диапазоне от температуры окружающей среды до примерно -20°C. Соль может быть собрана с использованием методик, хорошо известных в данной области, включая фильтрование, декантацию, центрифugирование, упаривание, сушку и тому подобное. Соединение формулы (10) может быть использовано непосредственно в качестве кислотно-аддитивной соли выбранной кислоты. Альтернативно, перед использованием соединение формулы (10) может быть выделено в виде кислотно-аддитивной соли с другой кислотой с помощью кислотного обмена или может быть выделено в виде основания с помощью экстракции в основных условиях, что хорошо известно и принято в данной области.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретение относится к динамическому разделению (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она до значительной энантиомерной чистоты, включающему кристаллизацию 1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она в виде его кислотно-аддитивной соли с кислотой, выбранной из группы, включающей ди-*p*-толил-Л-винную кислоту, (R)-(-)-10-камфорсульфоновую кислоту и (D)-(-)-миндалевую кислоту, в виде динамического процесса в присутствии ароматического альдегида. Динамический процесс имеет то преимущество, что 1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он претерпевает превращение в единственный изомер во время кристаллизации, таким образом улучшая выход и исключая поток отходов, который включает нежелательный изомер.

Предполагается, что большое число альдегидов является подходящим для настоящего способа, было установлено, что ряд альдегидов является особенно подходящим для практического осуществления. Конкретно, было установлено, что салициловые кислоты являются предпочтительными и салициловый альдегид, 5-нитросалициловый альдегид и 3,5-дихлорсалициловый альдегид являются более предпочтительными в настоящем способе динамического разделения.

Соответственно, когда настоящий способ осуществляют в виде динамического разделения 1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он подвергают контакту с выбранной кислотой в присутствии альдегида. Обычно для динамического разделения используют от 0,9 до 1,2 молярных эквивалентов кислоты, при этом использование 1 молярного эквивалента является предпочтительным. Альдегид обычно используют в катализическом количестве. Обычно используют примерно от 0,5 до 0,001 молярного эквивалента альдегида, при этом использование от примерно 0,1 до примерно 0,01 молярного эквивалента является предпочтительным.

Динамический способ обычно осуществляют в растворителе или в растворителе без антирастворителя, как описано выше. Смесь 1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она, выбранной кислоты и альдегида перемешивают, давая возможность превращаться в требуемый изомер. Обычно данное превращение проводят при температуре в диапазоне от температуры окружающей среды до температуры кипения растворителя с обратным холодильником. Обычно для превращения требуется от 6 до 48 ч.

Квалифицированный специалист в данной области будет учитывать, что когда настоящий способ осуществляют в виде динамического разделения, применение кислотно-аддитивной соли (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она может осложниться присутствием небольшого количества альдегида в выделенном продукте. Таким образом, после динамического разделения является предпочтительным, чтобы (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он был выделен солевым обменом, предпочтительно в виде гидрохлоридной соли, перед его применением или образованием основания.

Как будет понятно специалистам в данной области, соединения формулы (10) могут использоваться в ряде способов получения соединений, полезных для лечения болезни Альцгеймера. Такие способы описаны в заявке РСТ № РСТ/US97/22986, поданной 2 декабря 1997 г., и описаны ниже. Способы настоящего изобретения отличаются тем, что в них получают соединения формулы I, пользуясь преимуществом оптического разделения, представленного на схеме А, стадия 1.

На схеме А, стадия 2, представлена реакция конденсации подходящей защищенной по аминогруппе аминокислоты формулы PgNH-CHR₂-C(O)-A и подходящего лактама формулы (10). Подходящими ами-

нокислотами, защищенными по аминогруппе, являются такие, в которых Pg представляет защитную группу амина, R₂ является таким, как требуется в конечном продукте формулы I, и A представляет активирующую группу, например, -OH или -Cl, способные конденсироваться с аминогруппой соединения формулы (10). Такие защищенные по аминогруппе аминокислоты легко доступны специалисту в данной области.

Предпочтительными защищенными по аминогруппе аминокислотами формулы PgNH-CHR₂-C(O)-A являются такие, в которых Pg представляет трет-бутилсикарбонил и бензилоксикарбонил, R₂ представляет метил, и которые имеют стереохимию L-аминокислоты.

Реакция конденсации, указанная на реакционной схеме А, стадия 2, включает реакцию, проводимую для синтеза пептида и также можно применять используемые при этом синтетические методы. Такие методы описаны подробно для схемы 1, стадия 1.

На реакционной схеме А, стадия 3 представлено снятие защитной группы в соединении формулы (11) с получением соединения формулы (12). Такие снятия защиты для групп, защищающих аминогруппу, хорошо известны и приняты в данной области.

На реакционной схеме А, стадия 4, представлена реакция конденсации подходящего соединения формулы (13), R₁CH₁X₂-C(O)-A₁, и соединения формулы (12) с получением соединения формулы I. Подходящие соединения формулы (13) представляют собой соединения, в которых R₁, X₁ и X₂ являются такими, которые требуются в конечном продукте формулы I, и хорошо известны в данной области, включая заявку РСТ № РСТ/US97/22986, поданную 22 декабря 1997, и как описано в данном описании. Подходящее соединение формулы (13) также может иметь стереохимию, которая требуется в конечном продукте формулы I. Реакцию конденсации, представленную на схеме 3, проводят с использованием кислоты формулы (13) (соединения, в которых A₁ представляет -OH) или полученного из нее галогенангидрида кислоты (соединения, в которых A₁ представляет -Cl или -Br) способом, аналогичным указанному на схеме 1, стадия 1.

Альтернативный способ получения соединений формулы I изображен на схеме А, стадия 5, где показана реакция конденсации подходящего соединения формулы (10) и подходящего соединения формулы (14), R₁CH₁X₂-C(O)-NH-CHR₂-C(O) A₂, непосредственно приводящая к соединению формулы I. Подходящим соединением формулы (10) является такое, которое описано для стадии 2. Подходящим соединением формулы (14) является такое соединение, в котором R₁, X₁, X₂ и R₂ являются такими, как требуется для конечного продукта формулы I. Подходящим соединением формулы (14) также является соединение, стереохимия которого является такой, которая требуется для конечного продукта формулы I.

Соединения формулы (14) легко получают конденсацией карбоксизащищенных аминокислот, H₂N-CHR₂-C(O)OPg₁, с соединениями формулы (13), как описано выше. Кроме того, такие реакции конденсации хорошо известны в данной области и дают продукт, который после снятия защитной группы приводит к соединению формулы (14).

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано с помощью следующих примеров и получений. Данные примеры и получение являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения изобретения каким-либо образом.

Термины, использованные в примерах и получении, имеют их обычные значения, если не указано другого. Например, «°С» относится к градусам Цельсия; «ммоль» означает миллимоль или миллимоли; «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-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она

К суспензии гидрида натрия (1,1 экв.) в 15 мл сухого ДМФ добавляли 4,5,6,7-тетрагидро-2Н-3-бензазепин-2-он (0,0042 моль) в виде раствора в 10 мл ТГФ. Затем добавляли метилиодид (примерно 2 эквивалента). Когда по ТСХ реакция завершалась, реакционную смесь выливали на лед и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой, затем насыщенным раствором соли. Органический слой затем сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали ВЭЖХ (LC 2000), элюируя системой этилацетат/гексан, и получали 3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-бензазепин-2-он.

3-Метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-бензазепин-2-он (1 эквивалент) растворяли в ТГФ и добавляли изоамилнитрит (1,2 эквивалента). Смесь охлаждали до 0°С на ледяной бане. Добавляли по каплям NaHMDS (1,1 эквивалента, 1М в ТГФ). После перемешивания в течение 1 ч или до завершения реакции смесь концентрировали, затем подкисляли 1н. водным раствором хлористо-водородной кислоты и экстрагировали этилацетатом. Органическую часть сушили и концентрировали, получая неочищенный продукт, который очищали хроматографией на силикагеле и получали 1-гидроксимино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он: масс-спектроскопия (M+H)⁺, 205,1.

1-Гидроксимино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он растворяли в смеси EtOH/NH₃ (20:1) и гидрировали в автоклаве с использованием никеля Ренея и водорода (500 фт/кв.дюйм/3447 КПа) при 100°С в течение 10 ч. Полученную смесь фильтровали и концентрировали, получая масло, которое очищали хроматографией на силикагеле и получали указанное в заголовке соединение.

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

В 20 л колбу Мортона добавляли МТВЕ (5,52 л, 7 объемов) и диметилацеталь (N-метиламино)ацетальдегида (614 г, 5 моль) с образованием раствора при комнатной температуре. В реакционную колбу Мортона добавляли раствор бикарбоната натрия, полученного добавлением бикарбоната натрия (546 г, 6,5 моль) к воде (6,31 л, 8 объемов). Смесь охлаждали не менее чем до 10°C и к охлажденной реакционной смеси в течение 1 ч добавляли по каплям раствор фенилацетилхлорида (789 г, 5 моль) в МТВЕ (789 мл). После добавления реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. На данной стадии ВЭЖХ анализ показал, что реакция завершилась. Экстракционная обработка с использованием МТВЕ (4 объема), сушка безводным сульфатом магния с последующим концентрированием на роторном испарителе давала 1,187 кг (98%) N-метил-N-(2,2-диметоксиэтил)фенилацетамида в виде жидкости, $(M+H)^+ = 237,9$. В 5 л колбу Мортона в сильном токе азота добавляли H_2SO_4 (1,42 л) и добавляли по каплям в реакционную колбу N-метил-N-(2,2-диметоксиэтил)фенилацетамид, что приводило к экзотермическому подъему температуры (от 22 до 78°C). Полученную реакционную смесь затем нагревали до 110°C в течение 3 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и переносили в 20 л колбу Мортона. При температуре ниже 10°C реакционную смесь гасили водным раствором гидроксида натрия (9,18 л, 5н.). Экстракционная обработка этилацетатом (2х2, 85 л), сушка сульфатом натрия с последующим концентрированием до твердого вещества давали 520 г (73,5%) 3-метил-6,7-дигидро-2Н-3-бензазепин-2-она в виде твердого вещества. Данное вещество может быть перекристаллизовано из МТВЕ, для повышения чистоты, давая твердое вещество. Т.пл. 81-82°C; $(M+H)^+ = 174,2$.

Раствор 3-метил-6,7-дигидро-2Н-3-бензазепин-2-она (113,8 г, 0,657 моль) в ТГФ (0,5 л) охлаждали до 0°C и добавляли по каплям изоамилнитрил (100,75 г, 0,86 моль). К полученной смеси добавляли LiHMDS (1н. раствор в ТГФ, 854 мл, 0,854 моль) с такой скоростью, чтобы температура реакционной смеси оставалась ниже 10°C. После добавления реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2-3 ч, контролируя ход реакции с помощью ВЭЖХ. По завершении реакции смесь охлаждали до 0°C и pH доводили от 12 до 2-3 с использованием водной HCl (2н.). Полученный осадок перемешивали в течение 12-16 ч, затем выделяли фильтрованием и сушили, получая 86,3 г (64,9%) 1-гидроксимино-3-метил-6,7-дигидро-2Н-3-бензазепин-2-она; т.пл. 225-226°C; $(M+H)^+ = 203,0$.

Раствор 1-гидроксимино-3-метил-6,7-дигидро-2Н-3-бензазепин-2-она (35 г, 0,173 моль) в этаноле (525 мл) добавляли 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 гидрировали при 50°C и 250 фт/кв.дюйм (1723 КПа) до завершения реакции. Реакционную смесь фильтровали через слой целита с использованием этанола в качестве растворителя и фильтрат концентрировали до 90 мл. К концентрату добавляли воду (350 мл) и полученный раствор дополнительно концентрировали до примерно 200 мл. К водному раствору добавляли дихлорметан (350 мл) и доводили pH до 11-11,5 водным гидроксидом натрия (1н). Органическую часть отделяли и водную часть экстрагировали дихлорметаном (175 мл). Объединенные экстракты концентрировали, получая остаток, который кристаллизовался при хранении, давая указанное в заголовке соединение: т.пл. 69-81 °C; $(M+H)^+ = 191,0$.

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

В колбу Мортона объемом 22 л добавляли дихлорметан (4,73 л, 8 объемов), N-метилфенетиламин (591 г, 4,33 моль), и водный раствор бикарбоната натрия (436,7 г, 5,2 моль в 4,73 л воды). Смесь охлаждали до температуры ниже 5°C и добавляли по каплям к охлажденной реакционной смеси в течение 70 мин раствор хлорацетилхлорида (513,7 г, 4,55 моль) в дихлорметане (887 мл). После добавления ВЭЖХ анализ показал, что реакция завершилась. Слои разделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом магния и концентрировали на роторном испарителе, получая 915,7 г (99,8%) N-метил-N-(2-фенилэтил)-1-хлорацетамида: $(M+H)^+ = 212,1$.

В колбу объемом 12 л в атмосфере азота добавляли N-метил-N-(2-фенилэтил)-1-хлорацетамид (883,3 г, 4,17 моль) и орто-дихлорбензол (6,18 л). Добавляли хлорид алюминия (1319 г, 10,13 моль), что вызывало экзотермическую реакцию (22-50°C).

Полученную реакционную смесь затем нагревали до 165°C в течение 2,5 ч, затем охлаждали до комнатной температуры в течение примерно 14 ч. Реакционную смесь охлаждали примерно до 0°C и добавляли в холодную воду (8,86 л, примерно 5°C) четырьмя порциями для поддержания экзотермической реакции до примерно 40°C. Слои разделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном (7,07 л) и слои разделяли. Органические слои объединяли и экстрагировали водной хлористоводородной кислотой (8,83 л, 1н.) , а затем насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (7,07 л), сушили над сульфатом магния, объединяли с силикагелем (883 г) и наносили на колонку с силикагелем (3,53 кг, со стеклянным пористым фильтром, заполненная в виде суспензии в дихлорметане). Колонку элюировали дихлорметаном до тех пор пока не собирали 25 л, а затем этилацетатом, получая продукт. Фракции, содержащие продукт, упаривали, получая 3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он в виде желто-коричневого твердого вещества, 608 г (83%).

В колбу объемом 22 л в атмосфере азота помещали 3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он (606 г, 3,46 моль) и изоамилнитрит (543 г, 4,5 моль) в ТГФ (7,88 л). Смесь охлаждали примерно до 0°C

перед добавлением LiHMDS (1н. раствор в ТГФ, 4,5 л, 04,5 моль) с такой скоростью, чтобы температура оставалась ниже 7°C. После добавления реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение примерно 2 ч, контролируя степень протекания реакции с помощью ВЭЖХ. После завершения реакции смесь охлаждали примерно до 0°C и pH доводили от 12 до примерно 2-1 добавлением водной HCl (2н.). Полученный остаток перемешивали в течение примерно 6 ч перед выделением фильтрованием и сушкой, получая 1-гидроксиимино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он 604,7 г (85,6%).

1-Гидроксиимино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он (625 г, 3,06 моль) и этанол 3А (15,6 л) в виде суспензии в разбавленной HCl (концентрированная водная хлористо-водородная кислота, 312 г в 320 мл воды) добавляли в автоклав вместе с палладием на углероде (10%, 120 г). Полученную смесь гидрировали при 50°C и 250 фт/кв.дюйм (1723 КПа) при интенсивном перемешивании до завершения реакции (примерно 4 ч). Реакционную смесь фильтровали через слой целита с использованием этанола в качестве растворителя и фильтрат концентрировали, получая твердое вещество. Твердое вещество обрабатывали дихлорметаном (6 л) и добавляли 1н. водный раствор гидроксида натрия до тех пор, пока pH водного слоя не достигал значения между 11-11,5. Смесь перемешивали, слои разделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном (2л). Органические слои сушили над сульфатом магния, фильтровали, упаривали на роторном испарителе, получая указанное в заголовке соединение 477 г (81,9%).

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

1-Амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он (1,544 г, 8,12 ммоль) осторожно нагревали в 15 мл метанола с образованием раствора. В другой колбе ди-п-толуоил-1-винную кислоту (3,12 г, 8,08 ммоль) растворяли в 15 мл метанола и добавляли пипеткой к теплому раствору амина. Смесь нагревали по мере осаждения твердых веществ. Дополнительно добавляли 30 мл метанола для получения раствора, который нагревали при кипении с обратным холодильником в течение 30-40 мин и затем медленно охлаждали до температуры окружающей среды, получая твердое вещество. После перемешивания в течение примерно 18 ч твердое вещество собирали фильтрованием и сполоскивали небольшим количеством холодного метанола, получая 2,24 г соли ди-п-толуоил-L-винной кислоты (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она (96% выход, 94,7% ее).

Соль ди-п-толуоил-L-винной кислоты (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она (11,83 г, 20,5 ммоль) растворяли в 45 мл водного 1,0 н. раствора гидроксида натрия и экстрагировали метиленхлоридом (3х25 мл). Объединенные слои метиленхлорида промывали 35 мл водного 1,0 н. раствора гидроксида натрия, затем насыщенным раствором соли и сушили над безводным MgSO₄. Удаление растворителя в вакууме давало указанное в заголовке соединение (3,38 г) в виде бесцветного масла (87% выход, 93,2% ее).

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

1-Амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он (6,0 г, 31,5 ммоль) осторожно нагревали в 75 мл метанола до образования раствора и объединяли с раствором ди-п-толуоил-L-винной кислоты (12,2 г, 31,5 ммоль) в 75 мл теплого метанола. В раствор вносили затравку для кристаллизации, и образовалось твердое вещество. Дополнительно добавляли 100 мл метанола и смесь оставляли перемешиваться. После перемешивания в течение примерно 18 ч твердое вещество собирали фильтрованием и промывали небольшим количеством холодного метанола, получая 6,7 г твердого вещества. Твердое вещество объединяли с метанолом (200 мл) и перемешивали. Через 18 ч твердое вещество собирали, получая соль ди-п-толуоил-L-винной кислоты (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она (4,4 г). Выделение основания способом, описанным в примере 4, давало указанное в заголовке соединение (96% ее).

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

В сосуде, емкостью 22 л, в токе азота нагревали (примерно 40°C) 1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он (438 г, 2,3 моль) для получения раствора в метаноле (4,38 л). В другой колбе ди-п-толуоил-L-винную кислоту (889,7 г, 2,3 моль) растворяли в 4,38 л метанола и нагревали примерно до 40°C, после чего добавляли раствор 1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она. Нагревание продолжали и добавляли дополнительно 6,13 л метанола, затем смесь кипятили с обратным холодильником в течение примерно 45 мин, а затем медленно охлаждали до температуры окружающей среды, получая твердое вещество. После перемешивания в течение примерно 18 ч твердое вещество собирали фильтрованием и промывали небольшим количеством маточного раствора и, после сушки на воздухе, примерно 2 л этилацетата, получая 561,6 г соли ди-п-толуоил-L-винной кислоты (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она. Объединяли соль ди-п-толуоил-L-винной кислоты (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она, дихлорметан (6,57 л) и 1н. водный раствор гидроксида натрия (6,57 л) и перемешивали. Слои разделяли и органический слой дважды экстрагировали 1н водным раствором гидроксида натрия (3,28 л), один раз насыщенным раствором соли (2,46 л), после чего сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали 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-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

1-Амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он (31,9 г, 168 ммоль) суспендировали примерно в 300 мл изопропилацетата и нагревали до 45°C. В отдельной колбе (R)-(-)-D-миндальную кислоту (25,0 г, 164 ммоль) нагревали примерно в 130 мл изопропилового спирта до образования раствора, который добавляли к полученной выше суспензии 1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он/изопропилацетат, получая раствор, в котором быстро образовывался осадок. Смесь перемешивали при 45°C в течение примерно 3 ч. К теплому раствору добавляли 5-нитросалициловый альдегид (2-гидрокси-5-нитробензальдегид) (1,40 г, 8,38 ммоль, 5 мол.%) и смесь перемешивали при 45°C. Примерно через 14 ч суспензию охлаждали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение 2 ч, после чего твердые вещества отфильтровывали, промывали 70 мл холодного изопропилацетата и сушили в вакуумной печи при 40°C, получая 46,62 г соли (R)-миндальной кислоты (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она (82,9% выход, 98,4% ее).

Соль (R)-миндальной кислоты (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она (2,42 г, 7,06 ммоль, 98,4% ее) суспендировали в 25 мл этилацетата при температуре окружающей среды. Добавляли концентрированную водную хлористо-водородную кислоту (1,1 мл, примерно 11,2 ммоль) и смесь нагревали до 50°C при интенсивном перемешивании в течение 3,5 ч. Суспензию охлаждали до температуры окружающей среды и фильтровали, промывали метил-трет-бутиловым эфиром (примерно 10 мл), получая 1,48 г указанного в заголовке соединения (92,5% выход, 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 загружали N-трет-Вос-L-аланин (1,0 эквив.), гидрат гидроксибензотриазола (примерно 1,1 эквив.) и (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он (1,0 эквив.) в ТГФ в атмосфере азота. К хорошо перемешиваемой смеси прибавляли основание Ханига (N,N-дизопропилэтиламин, 1,1 эквив.) с последующим добавлением EDC (1,1 эквив.). После перемешивания в течение от 4 до 17 ч при температуре окружающей среды растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток помещали в этилацетат и воду, промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, 1н. водной HCl, насыщенным раствором соли, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении, получая 1-(N-трет-Вос-L-аланинил)амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он: масс-спектроскопия (M+H)⁺, 362,3.

Ток безводного газообразного HCl пропускали через перемешиваемый раствор 1-(N-трет-Вос-L-аланинил)амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она в 1,4-диоксане (0,03-0,09М), охлаждали на ледяной бане до примерно 10°C в атмосфере азота в течение 10-15 мин. Раствор накрывали, затем охлаждающую баню убирали и раствор оставляли нагреваться до температуры окружающей среды при перемешивании в течение 2-8 ч, контролируя 1,0 по ТСХ расходование исходного вещества. Раствор концентрировали, получая 1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он, который использовали без дополнительной очистки.

В колбу загружали 1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он (1,0 эквив.), гидрат гидроксибензотриазола (1,1 эквив.) и (S)-2-гидрокси-3-метилмасляную кислоту (1,0 эквив.) в ТГФ в атмосфере азота. К хорошо перемешиваемой смеси прибавляли основание Ханига (N,N-дизопропилэтиламин, 1,1 эквив.) с последующим добавлением EDC (1,1 эквив.). После перемешивания в течение от 4 до 17 ч при температуре окружающей среды растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток помещали в этилацетат (или подобный растворитель) и воду, промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, 1н HCl, насыщенным раствором соли, сушили над безводным сульфатом натрия и растворитель удаляли при пониженном давлении, получая указанное в заголовке соединение.

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

В круглодонную колбу загружали N-трет-Вос-L-аланин (24,95 г, 1,32 моль), гидрат гидроксибензотриазола (232,2 г, 1,52 моль) и (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она (250,8 г, 1,32 моль) в ТГФ (3,76 л) в атмосфере азота. Смесь охлаждали до температуры ниже 5°C перед добавлением основания Ханига (N,N-дизопропилэтиламин, 188,4 г, 1,45 моль) с последующим добавлением EDC (283,7 г, 1,45 моль). После перемешивания в течение 6 ч реакционную смесь нагревали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение 14 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток помещали в этилацетат (3,76 л) и воду (1,76 л), слои разделяли, органический слой экстрагировали водой (1,76 л), водные слои объединяли и экстрагировали этилацетатом (1,76 л). Органические слои объединяли, экстрагировали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (1,76 л), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали на роторном испарителе, получая 1-(N-трет-Вос-L-аланинил)амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он, 463 г (97,2%).

Получали раствор HCl в этилацетате, пропуская безводный газообразный HCl через этилацетат (1,76 л), охлажденный примерно до 0°C, с помощью расположенной под поверхностью дисперсионной трубки. Полученный выше раствор HCl в этилацетате добавляли к интенсивно перемешиваемой суспен-

зии 1-(N-трет-Бок-L-аланинил)амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она (462 г, 1,28 моль) в этилацетате (3,7 л). Добавляли дополнительное количество этилацетата (1л) и реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 22 ч. Реакционную смесь фильтровали, получая твердое вещество. Твердое вещество суспендировали в ацетонитриле (5 л), кипятили с обратным холодильником, а затем охлаждали примерно до 60°C, фильтровали и сушили, получая 1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он (389,8 г, 94,7%).

1-(L-Аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он (369,5 г, 1,18 моль), гидрат гидроксибензотриазола (207,6 г, 1,36 моль), основание Ханига (N,N-диизопропилэтамин, 352,2 г, 2,71 моль) и (S)-2-гидрокси-3-метилмасляную кислоту (140,6 г, 1,18 моль) в ТГФ (4,8 л) объединяли в атмосфере азота и охлаждали до температуры ниже 5°C. Добавляли EDC (253,7 г, 1,3 моль) и реакционную смесь оставляли нагреваться до температуры окружающей среды при перемешивании. Примерно через 25 ч реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (5,54 л) и экстрагировали водой (2,22 л). Органический слой экстрагировали водой (2,22 л), водные слои объединяли и экстрагировали дихлорметаном (5,54 л). Органические слои объединяли, дважды экстрагировали водой (2,22 л), насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (2,22 л), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаковали на роторном испарителе, получая указанное в заголовке соединение 428 г (100%).

Пример 10. Синтез дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она

Твердый (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-он помещали в ацетон (3,42 л) и воду (0,856 л) при слабом нагревании (40°C). Раствор разделяли на две ~2л порции и в каждую добавляли воду (7,19 л) по мере нагревания мутного раствора до 50°C. После завершения прибавления воды матовый раствор оставляли охлаждаться до температуры окружающей среды, получая твердое вещество, которое перемешивали в виде суспензии при температуре окружающей среды в течение примерно 14 ч, после чего отфильтровывали и сушили, получая указанное в заголовке соединение, 310,6 г (66,2%).

При использовании в качестве лекарственного средства, соединение по настоящему изобретению обычно вводят в виде фармацевтической композиции. Таким образом, в другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество кристаллического дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она и фармацевтически приемлемый разбавитель. Такие композиции используют для ингибирования высвобождения и/или синтеза β -амилоидного пептида, включая лечение болезни Альцгеймера. Таким образом, настоящее изобретение охватывает применение кристаллического дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она для получения лекарственного средства для ингибирования высвобождения и/или синтеза β -амилоидного пептида, и, в частности, включая лечение болезни Альцгеймера.

Кристаллический дигидрат (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она можно вводить различными путями. Настоящее соединение можно вводить в любой форме и любым способом, который делает соединение биодоступным в эффективном количестве, включая пероральный и парентеральный пути. Например, настоящее соединение можно вводить перорально, путем ингаляции, подкожно, внутримышечно, внутривенно, чрескожно, внутриназально, ректально, внутриглазно, местно, сублингвально, буквально (внутрищечно) и тому подобное.

При изготовлении композиций данного изобретения активный ингредиент обычно смешивают с эксципиентом, разбавляют эксципиентом или включают в такой носитель, который может быть в виде капсулы, саше, бумаги или другого контейнера. Соединение настоящего изобретения можно вводить по отдельности или в виде фармацевтической композиции, то есть объединенное с фармацевтически приемлемыми разбавителями, такими как носители или эксципиенты, доля и природа которых определяются растворимостью и химическими свойствами настоящего соединения, выбранным путем введения и стандартной фармацевтической практикой (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (1990)).

Настоящие фармацевтические композиции получают способом, хорошо известным в области фармацевтики. Носитель или эксципиент могут представлять собой твердое, полутвердое или жидкое вещество, которое может служить носителем или средой 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 вводиться пациенту в виде таблеток, капсул, аэрозолей, ингаляций, суппозиториев, раствора, суспензий и тому подобное.

В целях перорального терапевтического введения соединения могут быть объединены с эксципиентами и использованы в форме таблеток, пилюль, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток, жевательных резинок и тому подобное. Данные препараты будут содержать по крайней мере 4% соединения настоящего изобретения - активного ингредиента, но его количество будет изменяться в зависимости от

конкретной формы и обычно может составлять от 2 до примерно 90% по массе от единичной формы. Количество соединения, присутствующего в композициях, является таким, что будут получать подходящую дозированную форму. Предпочтительные композиции и препараты согласно настоящему изобретению могут определяться специалистом в данной области.

Таблетки, пилули, капсулы, таблетки и тому подобное, также могут содержать один или несколько из следующих адьювантов: связующие вещества, такие как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин, эксципиенты, такие как крахмал или лактоза, дезинтегрирующие агенты, такие как альгиновая кислота, Примогель, кукурузный крахмал и тому подобное; лабриканты, такие как стеарат магния, силиконовое масло или Sterotex; глиданты, такие как коллоидный диоксид кремния, и могут быть добавлены подсластители, такие как сахароза или сахарин, или вкусовой агент, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновая отдушка. Когда единичная дозированная форма представляет собой капсулу, она может содержать, в дополнение к веществам указанного выше типа жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или жирное (нелетучее) масло. Другие единичные дозированные формы могут содержать другие различные материалы, которые модифицируют физическую форму дозированной единицы, например, в виде оболочек. Так, таблетки или пилули могут быть покрыты сахаром, шеллаком или другими покрывающими оболочкой агентами. Сироп может содержать, в дополнение к настоящим соединениям, сахарозу в качестве подсластителя и некоторые консерванты, красители и красящие вещества и отдушки. Вещества, используемые при получении таких различных композиций, должны быть фармацевтически чистыми и нетоксичными в используемых количествах.

В целях парентерального введения соединение настоящего изобретения может быть введено в раствор или суспензию. Такие препараты обычно содержат по крайней мере 0,1% соединения по изобретению, но количество может изменяться от 0,1 до примерно 90% по массе.

Количество соединения, присутствующего в таких композициях является таким, что получают подходящие дозировки. Растворы или суспензии также могут включать одни или несколько из следующих адьювантов: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, физиологический раствор, жирные (нелетучие) масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетракарбусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или сосуды с многократными дозировками из стекла или пластика. Предпочтительные композиции и препараты могут быть определены специалистом в данной области.

Соединение настоящего изобретения также можно применять местно и при этом носитель может соответствующим образом включать раствор, мазь или гелевую основу. Основа, например, может включать одно или несколько из следующего: вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, 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).

В другой предпочтительной композиции по настоящему изобретению используются чрескожные устройства доставки («пластыри»). Такие чрескожные пластиры можно использовать для обеспечения непрерывного или прерывистого введения соединения настоящего изобретения в контролируемых количествах. Конструкция и применение чрескожных пластырей для доставки фармацевтических агентов хорошо известны в данной области. См., например, патент США 5023252, выданный 11 июня 1991, включенный в настоящее описание в качестве ссылки. Такие пластиры могут быть разработаны для непрерывной, пульсирующей доставки или доставки по требованию фармацевтических агентов.

Для более полной иллюстрации применения на практике данного изобретения ниже описаны типичные фармацевтические композиции. Примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения каким-либо образом объема изобретения.

Пример композиции 1

Получают твердые желатиновые капсулы, содержащие следующие ингредиенты:

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

Указанные выше ингредиенты смешивают и заполняют ими твердые желатиновые капсулы в количестве 340 мг.

Пример композиции 2

Получают состав таблетки с использованием следующих ингредиентов

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

Компоненты смешивают и прессуют с образованием таблеток, каждая весом 240 мг.

Пример композиции 3

Получают рецептуру сухого порошка для ингаляции, содержащего следующие компоненты:

Ингредиент	Вес %
Активный ингредиент	5
Лактоза	95

Пример композиции 4

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
Микрокристаллическая целлюлоза	35,0 мг
Поливинилпирролидон (в виде 10%-ного раствора в стерильной воде)	4,0 мг
Карбоксиметилкрахмал натрия	4,5 мг
Стеарат магния	0,5 мг
Тальк	1,0 мг
Всего	120 мг

Активный ингредиент, крахмал и целлюлозу пропускают через сите №20 меш U.S. и тщательно смешивают. Раствор поливинилпирролидона смешивают с полученными порошками, которые затем пропускают через сите 16 меш U.S. Полученные таким образом гранулы сушат при 50-60°C и пропускают через сите 16 меш U.S. Затем карбоксиметилкрахмал натрия, стеарат магния и тальк, предварительно пропущенные через сите 30 меш U.S., добавляют к гранулам, которые после смешивания прессуют на таблеттирующей машине, получая таблетки, каждая весом 150 мг.

Пример композиции 5

Капсулы, каждая из которых содержит 40 мг лекарственного средства, получают 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 сите 20 меш U.S. и заполняют твердые желатиновые капсулы в количестве по 150 мг в каждую.

Пример композиции 6

Суппозитории, каждый из которых содержит 25 мг активного ингредиента, получают следующим образом:

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

Активный ингредиент пропускают через сите 60 меш U.S. и супенцируют в глицеридах насыщенных жирных кислот, предварительно расплавленных с использованием минимально необходимого тепла. Смесь затем выливают в форму для суппозиториев номинальной емкостью 2,0 г и оставляют охлаждаться.

Пример композиции 7

Суспензии, каждая из которых содержит 50 мг лекарственного средства 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
Отдушка и краситель	Достат. количество
Очищенная вода до	5,0 мл

Активный ингредиент. Сахарозу и ксантановую камедь смешивают, пропускают через сито 10 меш U.S., а затем смешивают с предварительно полученным раствором микрокристаллической целлюлозы и натрийкарбоксиметилцеллюлозы в воде. Бензоат натрия, отдушку и краситель разбавляют небольшим количеством воды и добавляют при перемешивании. Затем добавляют достаточное количество воды для получения требуемого объема.

Пример композиции 8

Капсулы, каждая из которых содержит 15 мг лекарственного средства, получают 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 U.S. и заполняют твердые желатиновые капсулы в количестве по 560 мг в каждую.

Пример композиции 9

Подкожный состав может быть получен 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 можно использовать, при желании вплоть до 5,0 мг или более активного ингредиента.

Пример композиции 10

Состав для местного применения может быть получен 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. Жидкий парафин и эмульгирующий воск вводят и перемешивают до растворения. Добавляют активный ингредиент и перемешивание продолжают до получения дисперсии. Затем смесь охлаждают до отвердения.

В одном из аспектов, касающихся способов, данное изобретение относится к способу ингибирования высвобождение β -амилоидного пептида и/или его синтеза, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества кристаллического дигидрата (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 осуществления способа, настоящее изобретение относится к способу лечения болезни Альцгеймера, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества кристаллического дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

Также понятно, что специалист в данной области может воздействовать на болезнь Альцгеймера лечением пациента, пораженного в настоящее время заболеванием, или профилактическим лечением пациента при риске развития заболевания. Таким образом, термин «лечение» и «лечить» предназначены для названия всех процессов, включающих замедление, прерывание, приостановку, контролирование или остановку прогрессирования заболевания Альцгеймера, но не обязательно указывает на общее устранение всех симптомов. Как таковые, настоящие способы включают предотвращение начала болезни Альцгеймера у пациента при риске развития болезни Альцгеймера, ингибирование прогрессирования болезни Альцгеймера и лечение развитой болезни Альцгеймера.

Как использовано в данном описании, термин «пациент» относится к теплокровным животным, таким как млекопитающие, которые поражены заболеванием, связанным с повышенным высвобождением и/или синтезом β -амилоидного пептида, включая болезнь Альцгеймера. Понятно, что морские свинки собаки, кошки, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, овцы и люди являются примерами животных, охватываемых данным термином. Пациенты, нуждающиеся в таком лечении, легко диагностируются.

Как использовано в данном описании, термин «эффективное количество» соединения формулы I относится к количеству, которое эффективно для ингибирования высвобождения и/или синтеза β -амилоидного пептида и, конкретно, при лечении болезни Альцгеймера.

Эффективное количество легко может быть определено лечащим врачом-диагностом, как специалистом в данной области, с использованием обычных методик и наблюдения за результатами, полученными в аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества, дозы кристаллического дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она, лечащим врачом-диагностом рассматривается ряд факторов, включая, но не ограничиваясь этим: эффективность и характеристики (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 развития или серьезность заболевания; ответную реакцию индивидуального пациента; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранный режим дозировки; применение другого сопутствующего лечения; и другие значимые обстоятельства.

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

Дигидрат (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 настоящему изобретению может быть протестирован в различных биологических системах, включая следующие.

Пример А

Клеточный скрининг для выявления ингибиторов продуцирования β -амилоида.

Многочисленные указанные выше соединения формулы I были проанализированы на их способность ингибировать продуцирование (β -амилоида в клеточной линии, обладающей Шведской мутацией. В таком скрининговом анализе используются клетки (K293 = клеточная линия почки человека), которые были стабильно трансфицированы геном для амилоидного белка-предшественника 751 (APP751), содержащим двойную мутацию Lys₆₅₁Met₆₅₂ на Asn₆₅₁Leu₆₅₂ (APP751 нумерация), способом, описанным в публикации Международной патентной заявки № 94/10569 и Citron и др. Такая мутация обычно называется Шведской мутацией, и клетки, обозначенные как «293751 SWE», помещали в 96-луночные планшеты Corning из расчета 2-4x10⁴ клеток на лунку в минимальной основной среде Dulbecco (Sigma, St.Louis, MO) плюс 10% фетальной телячьей сыворотки. Число клеток является важным для получения результатов для β -амилоида с помощью анализа ELISA в линейном диапазоне аналирования (~0,2-2,5 нг на мл).

После инкубации в течение ночи при 37°C в инкубаторе, уравновешенном 10% диоксида углерода, среду удаляли и заменяли 200 мкл соединения формулы I (лекарственное средство), содержащем среду, на лунку для двухчасового периода предварительной обработки, и клетки инкубировали, как указано выше. Исходные растворы лекарственного средства получали в 100% диметилсульфоксиде, так чтобы при конечной концентрации лекарственного средства, использованной при обработке, концентрация диметилсульфоксида не превышала 0,5% и фактически обычно равнялась 0,1%.

В конце периода предварительной обработки среду опять удаляли и заменяли свежим лекарственным средством, содержащим среду, как указано выше, и клетки инкубировали дополнительно в течение 2 ч. После обработки, планшеты центрифугировали в Beckman GRP при 1200 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре для получения осадка клеточного дебриса из кондиционированной среды. Из каждой лунки 100 мкл кондиционированной среды или подходящих разведений переносили в ELISA планшет, предварительно покрытый антителом 266 [P.Seubert, Nature (1992) 359:325-327] против аминокислот 13-28 β -амилоидного пептида, как описано в публикации Международной патентной заявки №

94/10569, и хранили в течение ночи при 4°C. Анализ ELISA с использованием меченого антитела 3D6 [P.Seubert, *Nature* (1992) 369:325-327] против аминокислот 1-5 β-амилоидного пептида проводили на следующий день для измерения количества продуцированного β-амилоидного пептида.

Цитотоксическое действие соединений измеряли с помощью модификации способа Хансена (Hansen et al.). К клеткам, оставшимся в планшете тканевой культуры, добавляли 25 мкл исходного раствора (5 мг/мл) бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) (Sigma, St.Louis, MO) до конечной концентрации 1 мг/мл. Клетки инкубировали при 37°C в течение одного часа и клеточную активность останавливали, добавляя равный объем МТТ лизисного буфера (20% мас./об. додецилсульфата натрия в 50% диметилформамиде, pH 4,7). Полной экстракции достигали путем встряхивания в течение ночи при комнатной температуре. В качестве индикатора жизнеспособности клеток измеряли различие в ОП_{562нм} и ОП_{650нм} с использованием Molecular Device UV_{max} микропланшетного ридера.

Результаты ELISA анализа β-амилоидного пептида удовлетворяли стандартной кривой и их выражали в нг/мл β-амилоидного пептида. Для нормализации цитотоксичности данные результаты делили на МТТ результаты и выражали как процент результатов от контроля без лекарственного средства. Все результаты являются усредненными и стандартное отклонение приведено по крайней мере для шести повторных анализов.

Пример В. Подавление *in vivo* высвобождения и/или синтеза β-амилоида

Данный пример иллюстрирует, каким образом соединение данного изобретения может быть протестировано на подавление *in vivo* высвобождения и/или синтеза β-амилоида. Для данных экспериментов использовали мышей PDAPP возраста 3-4 месяца [Games et al., (1995), *Nature* 373:523-527]. В зависимости от того, какое соединение тестируется, соединение обычно вводят в композицию в диапазоне между 1 и 10 мг/мл. Вследствие фактора низкой растворимости соединений, они могут быть введены с различными носителями, такими как кукурузное масло (Safeway, South San Francisco, CA); 10% этанол в кукурузном масле; 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин (Research Biochemicals International, Natick, MA); и карбоксиметилцеллюлоза (Sigma Chemical Co., St.Louis Mo).

Дозировку вводили мышам подкожно с использованием иглы 26 размера и через 3 ч животных подвергали эвтаназии с помощью CO₂ наркоза и отбирали кровь с помощью сердечной пункции с использованием 1 см³ 25G 5/8" туберкулинового шприца/иглы, покрытого раствором 0,5M ЭДТУ, pH 8,0. Кровь помещали в вакуумированную трубку Becton-Dickinson, содержащую ЭДТУ, и вращали в течение 15 мин при 1500g при 5°C. Затем удаляли мозг мышей и кору головного мозга и гиппокамп иссекали и помещали на лед.

1. Анализ мозга

Для получения гиппокампальной ткани и ткани коры головного мозга для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) каждую часть мозга гомогенизировали в 10 объемах ледяного холодного гуанидинового буфера (5,0 M гуанидин-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) с использованием моторизированного пестика Kontes (Fisher, Pittsburgh, PA). Гомогенаты осторожно качали на вращающейся платформе в течение трех-четырех часов при комнатной температуре и хранили при -20°C перед количественной оценкой β-амилоида.

Гомогенаты мозга разводили 1:10 ледяным холодным казеиновым буфером [0,25% казеин, забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS), 0,05% азота натрия, 20 мкг/мл апоптина, 5 mM ЭДТУ, pH 8,0, 10 мкг/мл лейпептина], снижая таким образом конечную концентрацию гуанидина до 0,5M, перед центрифугированием при 16000g в течение 20 мин при 4°C. Образцы дополнительно разводили, при необходимости, для достижения оптимального диапазона для ELISA измерений добавлением казеинового буфера с 0,5M добавленного гидрохлорида гуанидина. Стандарты β-амилоида (1-40 или 1-42 аминокислоты) получали таким образом, что конечная композиция соответствовала 0,5M гуанидина в присутствии 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Общий β-амилоидный сэндвич ELISA, дающий количественную оценку как для β-амилоида (а 1-40), так и β-амилоида (а 1-42), состоял из двух моноклональных антител (mAb) к β-амилоиду. Иммобилизованное антитело, 266 [P.Seubert, *Nature* (1992) 359: 325-327] является специфичным к 13-28 аминокислотам β-амилоида. Антитело 3D6 [Johnson-Wood et al., *PNAS USA* (1997) 94:1550-1555], специфичное к 1-5 аминокислотам β-амилоида, биотинилируют, и оно служит антителом-репортером в анализе. В процедуре биотинилирования 3D6 используется протокол производителя (Pierce, Rockford IL) для NHS-биотин мечения иммуноглобулинов, за исключением того, что используют 100 mM бикарбонатнатриевый буфер, pH 8,5. 3D6 антитело не распознает секретированный амилоидный белок-предшественник (APP) или APP полной длины, но обнаруживает только разновидности β-амилоида с амино-концевой аспарагиновой кислотой. Анализ имеет нижний предел чувствительности ~50 пг/мл (11 пМ) и не показывает перекрестной реактивности к эндогенному мышенному β-амилоидному пептиду при концентрациях вплоть до 1 нг/мл.

В конфигурации сэндвич ELISA, дающего количественную оценку для β-амилоида (аа 1-42), используется mAb 21F12 [Johnson-Wood et al., *PNAS USA* (1997) 94:1550-1555] (которое распознает 33-42 аминокислоты β-амилоида) в качестве иммобилизованного антитела. Биотинилированный 3D6 также

является антителом-репортером в данном анализе, который имеет более низкий предел чувствительности ~125 пг/мл (28 пМ).

Иммобилизованные mAb 266 и 21F12 наносили в виде покрытия при концентрации 10 мкг/мл на 96-луночные планшеты для иммуноанализа (Costar, Cambridge MA) в течение ночи при комнатной температуре. Из планшетов затем удаляли жидкость и блокировали 0,25% сывороточным альбумином человека в PBS буфере в течение по крайней мере 1 ч при комнатной температуре, затем хранили высушеными при 4°C до использования. Планшеты повторно гидратировали промывным буфером (Tris-забуференный физиологический раствор, 0,05% Tween 20) перед употреблением. Образцы и стандарты добавляли в лунки планшетов и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 3 раза промывочным буфером перед каждой стадией анализа. Биотинилированный 3D6, разведенный до концентрации 0,5 мкг/мл в казеиновом инкубационном буфере (0,25% казеина, PBS, 0,05% Tween 20, pH 7,4) инкубировали в лунке в течение 1 ч при комнатной температуре. Авидин-HRP (Vector, Burlingame CA), разведенный 1:4000 в казеиновом инкубационном буфере добавляли в лунки для выдерживания в течение 1 ч при комнатной температуре. Добавляли колориметрический субстрат, Slow TMB-ELISA (Pierce, Cambridge MA) и оставляли взаимодействовать в течение 15 мин, после чего ферментативную реакцию останавливали добавлением 2н. H₂SO₄. Продукт реакции оценивали количественно с использованием Molecular Device Vmax (Molecular Devices, Menlo Park CA), измеряя различие в оптической плотности при 450 нм и 650 нм.

2. Анализ крови

ЭДТУ плазму крови разводили 1:1 в разбавителе для образцов (0,2 г/л фосфат натрия·H₂O (одноосновный), 2,16 г/л фосфат натрия·7H₂O (двуосновный), 0,5 г/л тимерозал, 8,5 г/л хлорид натрия, 0,5 мл Тритон X-405, 6,0 г/л не содержащий глобулина бычий сывороточный альбумин и вода). Образцы и стандарты в разбавителе для образца анализировали с использованием общего β-амилоидного анализа (266 иммобилизованное/3D6 репортер), описанного выше для анализа мозга за исключением того, что вместо описанных казеиновых разбавителей использовали разбавитель для образцов.

Из приведенного выше описания специалистам в данной области будут очевидны различные модификации и изменения композиции и способа. Подразумевается, что все такие модификации, подпадающие под объем прилагаемой формулы изобретения, включены в данное изобретение.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Дигидрат (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.
2. Кристаллический дигидрат (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 п.1, дополнительно характеризующийся порошковой рентгенограммой, включающей пик при 8,36, 12,43, 15,34, 19,22, 20,50 или 20,63 (2θ±0,2°).
3. Кристаллический дигидрат (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 п.1, дополнительно характеризующийся порошковой рентгенограммой, включающей пики при 8,36 и 15,34 (2θ±0,2°).
4. Кристаллический дигидрат (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 п.1, дополнительно характеризующийся порошковой рентгенограммой, включающей пики при 8,36 и 12,43 (2θ±0,2°).
5. Кристаллический дигидрат (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 п.1, дополнительно характеризующийся порошковой рентгенограммой, включающей пики при 8,36, 12,43 и 15,34 (2θ±0,2°).
6. Кристаллический дигидрат (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 п.1, дополнительно характеризующийся порошковой рентгенограммой, включающей пики при 8,36, 12,43, 15,34, 19,22, 20,50 и 20,63 (2θ±0,2°).
7. Кристаллический дигидрат (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 п.2, дополнительно характеризующийся ¹³C ядерным магнитным резонансом для твердого состояния, имеющим химический сдвиг (м.д.) 75,6, 35,3, 21,4 или 16,6.
8. Кристаллический дигидрат (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 п.2, дополнительно характеризующийся ¹³C ядерным магнитным резонансом для твердого состояния, имеющим химический сдвиг (м.д.) 75,6, 35,3, 21,4 и 16,6.
9. Фармацевтическая композиция, содержащая дигидрат (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.
10. Способ ингибирования высвобождения β-амилоидного пептида и/или его синтеза, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

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

12. Способ лечения болезни Альцгеймера, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества дигидрата (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 любому одному из пп. 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

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

14. Способ профилактики болезни Альцгеймера, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества дигидрата (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 любому одному из пп. 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

15. Способ ингибирования прогрессирования болезни Альцгеймера, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества дигидрата (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она.

16. Способ ингибирования прогрессирования болезни Альцгеймера, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества дигидрата (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 любому одному из пп. 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

17. Способ получения кристаллического дигидрата (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 п.1, дополнительно характеризующегося порошковой рентгенограммой, включающей пик при 8,36, 12,43, 15,34, 19,22, 20,50 или 20,63 (2 Θ \pm 0,2°), включающий кристаллизацию (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она из водного растворителя.

18. Способ по п.17, где водный растворитель включает ацетон и воду.

19. Способ получения (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она, включающий: кристаллизацию 1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она в виде кислотно-аддитивной соли кислоты, выбранной из группы, состоящей из ди-*p*-толил-L-винной кислоты, (R)-(-)-10-камфорсульфоновой кислоты и (D)-(-)-миндальной кислоты; конденсацию (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она с аминозащищенным остатком L-аланина с получением аминозащищенного 1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она; снятие защиты с получением 1-(L-аланинил)-(S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она; и конденсацию с (S)-2-гидрокси-3-метилмасляной кислотой.

20. Способ получения (N)-((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинил)-(S)-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она, включающий кристаллизацию 1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она в виде кислотно-аддитивной соли кислоты, выбранной из группы, состоящей из ди-*p*-толил-L-винной кислоты, (R)-(-)-10-камфорсульфоновой кислоты и (D)-(-)-миндальной кислоты; конденсацию (S)-1-амино-3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин-2-она с остатком ((S)-2-гидрокси-3-метилбутирил)-1-(L-аланинила).

