TERAPIA DE COMBINACIÓN CONTRA EL ALZHEIMER USANDO ANTICUERPOS ANTI-N3PGLU MÁS UN INHIBIDOR BACE

La presente invención se refiere a una combinación de un inhibidor de BACE con un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu y a métodos para utilizarlo para tratar determinados trastornos, tales como la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se encuentra en el campo del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades y trastornos que implican el péptido amiloide β (Abeta), un segmento péptido con alta acumulación de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés). La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo devastador que afecta a millones de pacientes a nivel mundial. En vista de los agentes aprobados en la actualidad en el mercado que proporcionan beneficios únicamente sintomáticos transitorios para el paciente, hay una necesidad significativa no colmada en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la generación, acumulación y deposición de Abeta en el cerebro. La inhibición parcial o completa de beta-secretasa (enzima de escisión de la proteína precursora beta-amiloide; BACE) ha

demostrado tener un efecto significativo en las patologías relacionadas con las placas y dependientes de las placas en los modelos de ratón. Esto sugiere que incluso las pequeñas reducciones de los niveles de péptidos Abeta pueden dar como resultado una reducción significativa a largo plazo de la carga de placa y déficits sinápticos, lo que proporciona beneficios terapéuticos significativos, particularmente en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Además, los anticuerpos que se dirigen específicamente a N3pGlu Abeta han demostrado disminuir el nivel de placa *in vivo* (US 2013/0142806). N3pGlu Abeta, también denominado N3pE o $Abeta_{p3-42}$, es una forma truncada del péptido Abeta que se encuentra únicamente en placas. Aunque el péptido N3pGlu Abeta es un componente menor de la Abeta depositada en el cerebro, los estudios han demostrado que el péptido N3pGlu Abeta tiene propiedades de acumulación agresiva y se acumula de manera temprana en la cascada de deposición.

Es deseable una combinación de un inhibidor de BACE con un anticuerpo que une el péptido N3pGlu Abeta para proporcionar un tratamiento para los trastornos mediados por el péptido Abeta, tales como la enfermedad de Alzheimer, que puede ser más eficaz que cualquier fármaco por sí solo. Por ejemplo, el

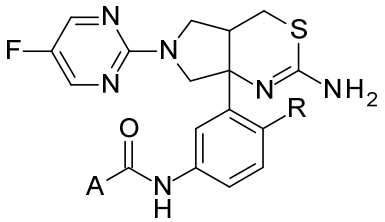
tratamiento con dicha combinación puede permitir el uso de dosis menores de cualquiera o ambos fármacos en comparación con cada fármaco utilizado por sí solo, lo que lleva posiblemente a menores efectos secundarios a la vez que se mantiene la eficacia. Se considera que el direccionamiento de la extracción de formas depositadas de Abeta con el anticuerpo N3pG y un inhibidor de BACE facilitará la extracción fagocítica de depósitos preexistentes de placa, reduciendo o previniendo al mismo tiempo una deposición adicional de Abeta mediante la inhibición de la generación de Abeta.

US 2009/0209755 describe los derivados de aminodihitrotiazina fusionados que poseen actividad de inhibición de BACE y se describen adicionalmente como agentes terapéuticos útiles para una enfermedad neurodegenerativa ocasionada por el péptido Aβ, tal como la demencia tipo Alzheimer. Adicionalmente, *J. Neuroscience*, 31(46), páginas 16507-16516 (2011) describe (S)-4-(2,4-difluoro-5-pirimidin-5-il-fenil)-4-metil-5,6-dihidro-4*H*-[1,3]tiazin-2-ilamina, un inhibidor de BACE activo en el SNC administrado por vía oral. La patente estadounidense n.° 8,278,334 describe un método para el tratamiento de una enfermedad cognitiva o neurodegenerativa que comprende administrar un inhibidor de BACE-1 de amina

cíclica sustituida con un anticuerpo antiamiloide. Además, *J. Neuroscience*, 34(35), páginas 11621-11630 (2014) describe que el tratamiento combinado con un inhibidor de BACE y un anticuerpo anti-abeta Gentenerumab potencia la reducción de amiloides en ratones APP_{London}.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa o cognitiva, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un inhibidor de BACE en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

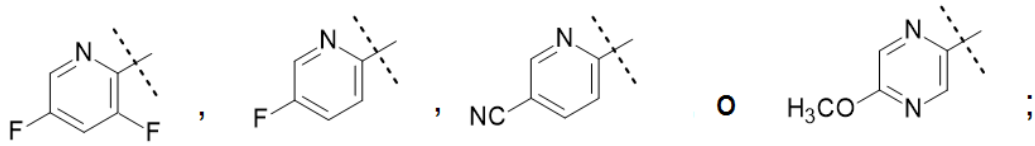
Más específicamente, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa o cognitiva, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I:



Formula I

donde R es H o F; y

A es:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este; en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad que se caracteriza por la formación y deposición de Abeta, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

La presente invención proporciona además un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con una

cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer leve, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

La presente invención proporciona además un método para el tratamiento del deterioro cognitivo leve, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

La presente invención proporciona además un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer prodrómica, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación

con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

Además, la presente invención proporciona un método para prevenir que el deterioro cognitivo leve evolucione a la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

La presente invención proporciona además un método para el tratamiento de angiopatía amiloide cerebral (AAC), que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

Además, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, para uso en una terapia, en particular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer,

enfermedad de Alzheimer leve, enfermedad de Alzheimer prodrómica o para prevenir que el deterioro cognitivo leve evolucione a la enfermedad de Alzheimer.

La invención proporciona además una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables, en combinación con una composición farmacéutica de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Además, la invención proporciona un kit, que comprende un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu. La invención proporciona además un kit, que comprende una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables, y una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en la presente,

un "kit" incluye recipientes separados de cada componente, donde un componente es un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y otro componente es un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, en un único empaque. Un "kit" puede incluir también recipientes separados de cada componente, donde un componente es un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y otro componente es un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, en empaques separados con instrucciones para administrar cada componente como una combinación.

La invención proporciona además el uso de una combinación de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Alzheimer leve, enfermedad de Alzheimer prodrómica o para prevenir que el deterioro cognitivo leve evolucione a la enfermedad de Alzheimer.

El experto en la técnica apreciará y reconocerá que el "anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu", y los anticuerpos específicos, "B12L" y "R17L" se identifican y describen junto con métodos para que el experto en la técnica confeccione y

utilice dichos anticuerpos, en la patente estadounidense n.° 8,679,498 B2, denominada "anticuerpos péptidos beta amiloides anti-N3pGlu y usos de estos", otorgada el 25 de marzo de 2014 (USSN 13/810,895). Ver, por ejemplo, la Tabla 1 de la patente estadounidense n.° 8,679,498 B2.

Adicionalmente, las secuencias de aminoácidos de determinados anticuerpos utilizadas en la presente invención se proporcionan a continuación en la Tabla A:

Tabla A-SEQ ID NO de anticuerpos

Anticuerpo	**Cadena ligera**	**Cadena pesada**	**LCVR**	**HCVR**
B12L	12	13	9	10
R17L	12	14	9	11

Una enfermedad neurodegenerativa o cognitiva incluye la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Alzheimer leve, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Alzheimer prodrómica, angiopatía amiloide cerebral (AAC), síndrome de Down y similares.

Tal como se usan en la presente, los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" incluyen contener, enlentecer, detener, reducir o revertir la evolución o severidad de una

enfermedad, afección, trastorno o síntoma existente.

Tal como se usa en la presente, el término "paciente" se refiere a un humano.

Se considera que la expresión "inhibición de la producción del péptido Abeta" significa disminuir los niveles *in vivo* del péptido Abeta en un paciente.

Tal como se usa en la presente, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis del compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y a la cantidad o dosis de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, el cual, tras una administración de múltiples dosis o una sola al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente diagnosticado o en tratamiento. Debe entenderse que la terapia de combinación de la presente invención se lleva a cabo mediante la administración de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, junto con el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, de cualquier forma que proporcione niveles eficaces del compuesto de Fórmula I y del anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu en el cuerpo.

El médico responsable puede determinar fácilmente una cantidad eficaz, como el experto en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas y mediante la observación de resultados obtenidos en circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad eficaz para un paciente, el médico responsable considera una cantidad de factores, inclusive, de modo no taxativo: la especie del paciente; su tamaño, edad y salud general; el trastorno o enfermedad específica involucrada; el grado, implicación o severidad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; la forma de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosificación seleccionado; el uso de medicación concomitante y otras circunstancias pertinentes.

Los compuestos de la Fórmula I y sales farmacéuticamente aceptables de estos son generalmente eficaces en un amplio intervalo de dosificación en la combinación de la presente invención. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente se encuentran dentro del intervalo de alrededor de 0,1 mg/día a alrededor de 1000 mg/día, preferentemente alrededor de 0,1 mg/día a alrededor de 500 mg/día y más preferentemente alrededor de 0,1 mg/día a alrededor de 100

mg/día. Adicionalmente, el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu es generalmente eficaz en un amplio intervalo de dosificación en la combinación de la presente invención. Por ejemplo, las dosificaciones por semana normalmente se encuentran en el intervalo de alrededor de 0,1 a 10 mg/kg/semana, preferentemente alrededor de 0,3 a alrededor de 6 mg/kg/semana, y más preferentemente alrededor de 0,3 mg/kg/semana a alrededor de 3 mg/kg/semana. En algunas instancias, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior de los intervalos antemencionados pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos, pueden emplearse dosis aún mayores con efectos secundarios aceptables y, por lo tanto, no se pretende que el intervalo de dosificación antemencionado limite el alcance de la invención de modo alguno.

Los inhibidores de BACE y los anticuerpos de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas mediante cualquier vía que haga que el compuesto sea biodisponible. La vía de administración puede variarse de cualquier forma, limitada por las propiedades físicas de los fármacos y la conveniencia del paciente y el responsable del cuidado. Preferentemente, las composiciones de anticuerpos monoclonales Abeta anti-N3pGlu

son para administración parenteral, tal como administración subcutánea o intravenosa. Además, el inhibidor de BACE, tal como el compuesto de Fórmula I, o sal farmacéuticamente aceptable de este, es para administración oral, parenteral o transdérmica, inclusive administración subcutánea o intravenosa. Dichas composiciones farmacéuticas y procesos para prepararlas son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21 edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

Tal como se usa en la presente, la expresión "en combinación con" se refiere a la administración del inhibidor de BACE, tal como un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, tal como un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden, o cualquier combinación de estos. Las dos moléculas pueden administrarse como parte de la misma composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. El inhibidor de BACE puede administrarse antes, al mismo tiempo o luego de la administración del anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, o en alguna combinación de estos. Cuando el anticuerpo

monoclonal Abeta anti-N3pGlu se administra en intervalos repetidos (por ejemplo, durante un curso de tratamiento estándar), el inhibidor de BACE puede administrarse antes, al mismo tiempo o luego de cada administración del anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, o alguna combinación de este, o en intervalos diferentes en relación con la terapia con el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, o en una única dosis o series de dosis antes, en cualquier momento durante o luego del curso del tratamiento con el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

Los siguientes párrafos describen grupos, sustituyentes y configuraciones preferidas de la presente invención.

Los compuestos preferidos son:

N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida; y
N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-3,5-difluoro-piridina-2-carboxamida; y las sales farmacéuticamente aceptable de estos.

Se prefiere especialmente N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Se prefiere especialmente N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

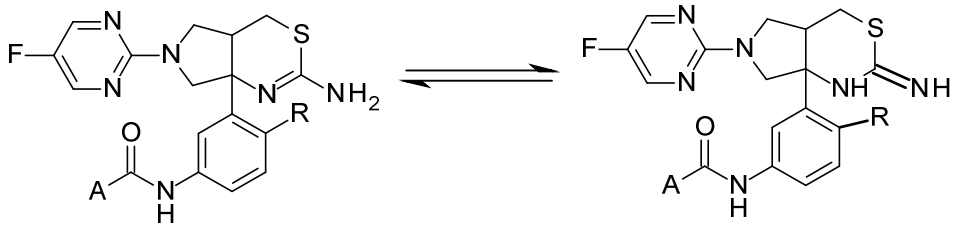
Adicionalmente, se prefiere especialmente la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida es un compuesto preferido; y la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida, caracterizado por un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, en un ángulo de difracción de 2-teta de 11,8°, con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste en 18,6°, 19,3° y 26,7°; con una tolerancia de 0,2 grados en los ángulos de difracción.

Los anticuerpos monoclonales Abeta anti-N3pGlu preferidos son

B12L y R17L que se identifican en la patente estadounidense n.° 8,679,498 B2 (ver, por ejemplo, la Tabla 1 de esta), donde B12L es especialmente preferido.

El experto en la técnica comprenderá que los compuestos de la Fórmula I pueden existir en formas tautoméricas, tal como se representa en el Esquema A. Cuando se proporcione cualquier referencia en esta solicitud a uno de los tautómeros específicos del compuesto de la Fórmula I, se entiende que comprenda ambas formas tautoméricas y todas las mezclas de estas.

Esquema A

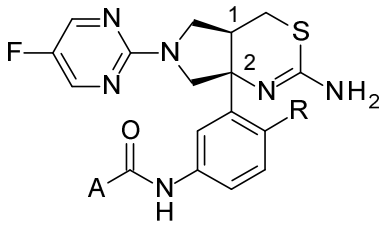


Determinados centros estereoquímicos se han dejado sin especificar y se han eliminado determinados sustituyentes en los siguientes esquemas en aras de la claridad, y no se pretende que limiten de forma alguna las enseñanzas de los esquemas. Adicionalmente, el experto en la técnica puede separar o resolver isómeros, enantiómeros y diastereómeros

individuales en cualquier punto conveniente en la síntesis del compuesto de Fórmula I, mediante métodos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (ver, por ejemplo, J. Jacques, et ál., "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley e hijos, Inc., 1981 y E.L. Eliel y S.H. Wilen, *"Stereochemistry of Organic Compounds"*, Wiley-Interscience, 1994). Las denominaciones "isómero 1" e "isómero 2" se refieren a los compuestos que se eluyen de la cromatografía quiral primero y segundo, respectivamente, y, si la cromatografía quiral se inicia de manera temprana en la síntesis, la misma denominación se aplica a los ejemplos e intermedios subsecuentes.

El experto en la técnica entenderá que los compuestos de la invención están compuestos por un núcleo que contiene al menos dos centros quirales:

Esquema B



Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros

individuales, así como mezclas de los enantiómeros de dichos compuestos, inclusive racematos, los compuestos con la configuración absoluta en los átomos de carbono marcados 1 y 2 tal como se ilustra en el Esquema B son compuestos preferidos de la invención.

Además, determinados intermedios descritos en los siguientes esquemas pueden contener uno o más grupos protectores de nitrógeno. El grupo protector variable puede ser igual o distinto en cada aparición, dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las transformaciones particulares a llevar a cabo. Las condiciones de protección y desprotección son conocidas por el experto en la técnica y se describen en la bibliografía (ver, por ejemplo, "*Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*", cuarta edición, de Peter G.M. Wuts y Theodora W. Greene, John Wiley e hijos, Inc. 2007).

Los compuestos de Fórmula I, o sales farmacéuticamente aceptables de estos, pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en las Preparaciones y Ejemplos a continuación. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las vías descritas pueden combinarse de distintas formas, o junto con etapas de distintos procedimientos, para preparar

los compuestos de la Fórmula I, o sales de estos. Los productos de cada etapa pueden ser recuperados mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, inclusive extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtrado, trituración y cristalización. Además, todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son tal como se definió anteriormente. Los reactivos y materiales iniciales están disponibles para el experto en la técnica.

Tal como se usa en la presente, "APP" se refiere a la proteína precursora amiloide; "BOC" se refiere a *terc*-butoxicarbonilo; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "CSF" se refiere al fluido cerebroespinal; "DCC" se refiere a 1,3-diciclohexilcarbodiimida; "DIC" se refiere a diisopropilcarbodiimida; "DCM" se refiere a diclorometano; "DIPEA" se refiere a diisopropiletilamina; "DMAP" se refiere a dimetilaminopiridina; "DMEM" se refiere al medio Eagle modificado de Dulbecco; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EDCI" se refiere a clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminatetraacético; "ee" se refiere a exceso enantiomérico; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "Ex" se refiere a ejemplo; "F12" se refiere al medio F12 de Ham; "FBS" se refiere al suero fetal bovino; "FRET" se refiere a

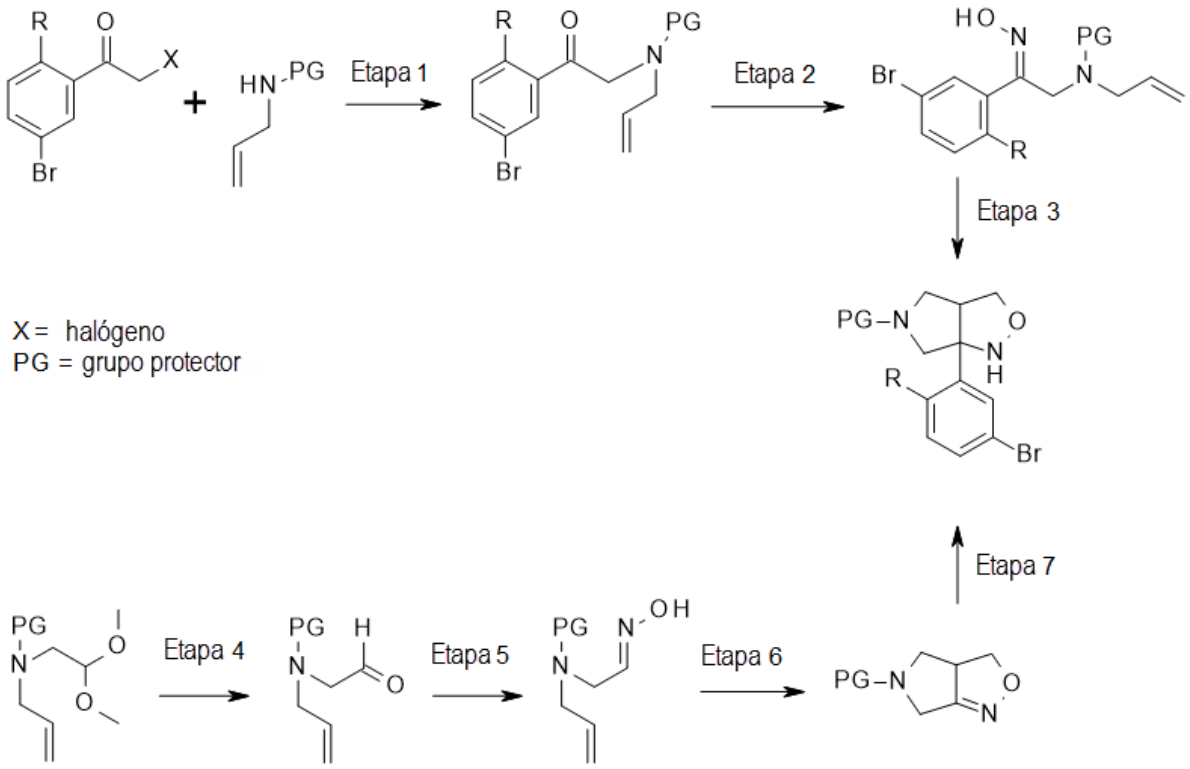
transferencia de energía por resonancia de fluorescencia; "HATU" se refiere a hexafluorofosfato de (dimetilamino)-N,N-dimetil(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-iloxi)metaniminio; "HEK" se refiere a riñón embrionario humano; "hr" se refiere a hora u horas; "HOAc" se refiere a ácido acético; "HOAt" se refiere a 1-hidroxi-7-azobenzotriazol; "HOBt" se refiere a hidrato de 1-hidroxilbenzotriazol; "HBTU" se refiere a hexafluorofosfato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio; "HRP" se refiere a la peroxidasa del rábano picante; "IC_{50}" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50 % de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente; "iPr" se refiere a isopropilo; "min" se refiere a minuto o minutos; "MTBE" se refiere a éter de *terc*-butilo de metilo; "PBS" se refiere a amortiguador fosfato salino; "PDAPP" se refiere a la proteína precursora amiloide derivada de plaquetas; "Prep" se refiere a preparación; "psi" se refiere a libras por pulgada cuadrada; "PyBOP" se refiere a hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidino-fosfonio; "PyBrop" se refiere a fosfonio hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino; "RFU" se refiere a la unidad de fluorescencia relativa; "R_t" se refiere a tiempo de retención; "SCX" se refiere a cromatografía de intercambio catiónico fuerte; "SFC" se refiere a cromatografía de fluidos supercríticos; "SEM" se refiere al error estándar de la

media; “THF” se refiere a tetrahidrofurano y “TMB” se refiere a 3,3′,5,5′-terametilbenzidina.

Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

En los esquemas que siguen, todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son tal como se definió anteriormente. Los reactivos y materiales iniciales generalmente están disponibles para el experto en la técnica. Otros pueden elaborarse mediante técnicas estándar de química orgánica y heterocíclica utilizando los procedimientos descritos en las Preparaciones y Ejemplos que siguen, inclusive cualquier procedimiento novedoso.

Esquema 1

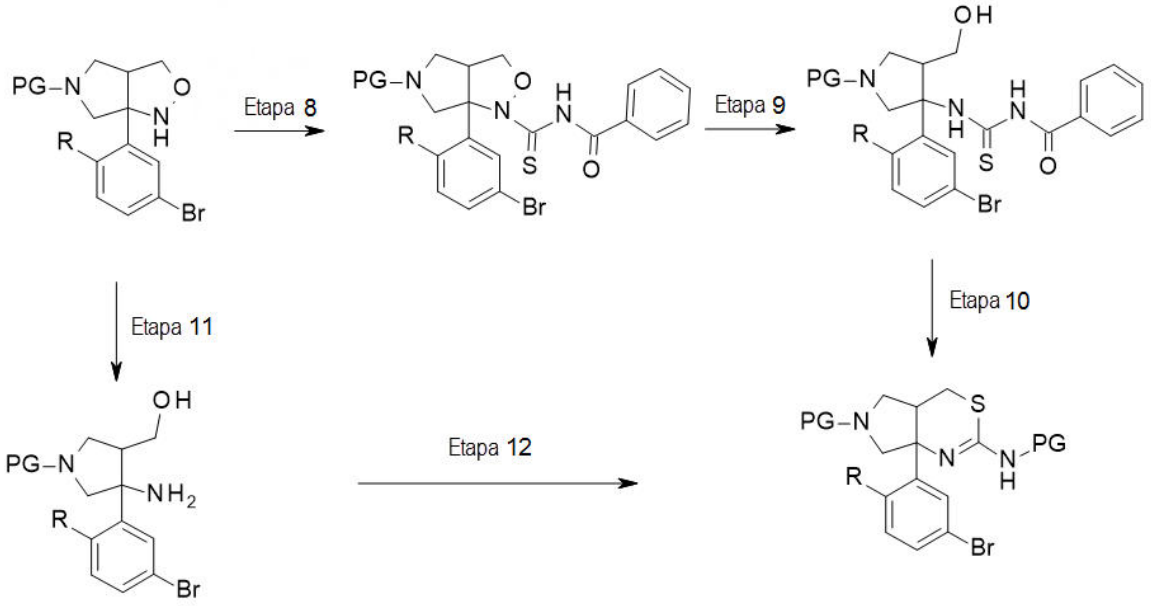


El Esquema 1 representa la formación de oximas (producto de la Etapa 2) y (producto de la Etapa 5). Cada una de las oximas puede utilizarse para formar el isoxazol bicíclico (producto de las Etapas 3 o 7). El grupo aromático sustituido puede insertarse en puntos diferentes de la síntesis, tal como se muestra en el Esquema 1, Etapa 1 y Etapa 7. "PG" es un grupo protector desarrollador para el grupo amino, tal como carbamatos y alilo. Dichos grupos son conocidos y contemplados en la técnica.

En una reacción de 2 etapas, puede alquilarse una cetona con un beta halógeno (Etapa 1) con una amina de alilo protegido

mediante el uso de una base inorgánica tal como carbonato de potasio y luego tratarse con clorhidrato de hidroxilamina y una base orgánica tal como piridina en un solvente prótico polar tal como etanol para proporcionar la oxima (Etapa 2). El producto de oxima de la Etapa 2 puede entonces convertirse en el isoxazol bicíclico en una ciclización 3+2 mediante varios métodos, tales como calentamiento de la oxima de la Etapa 2 en un solvente no polar tal como tolueno o xilenos para formar el isoxazol bicíclico (etapa 3). De manera alternativa, una oxima puede formarse comenzando a partir de un acetal de dimetilo, el cual se trata con un ácido tal como ácido fórmico para formar el aldehído (producto de la Etapa 4). En la etapa 5, el aldehído de la Etapa 4 puede entonces convertirse en el producto de oxima de la Etapa 5 con clorhidrato de hidroxilamina y una base tal como un trihidrato de acetato de sodio. El producto de isoxazol bicíclico de la Etapa 6 puede formarse a partir de la oxima tal como se muestra en la Etapa 6, mediante el uso de una solución acuosa de hipoclorito de sodio. En la Etapa 7, el isoxazol bicíclico protegido se hace reaccionar entonces con un reactivo de organolitio aromático o reactivo de Grignard para proporcionar el producto de isoxazol bicíclico protegido de la Etapa 7.

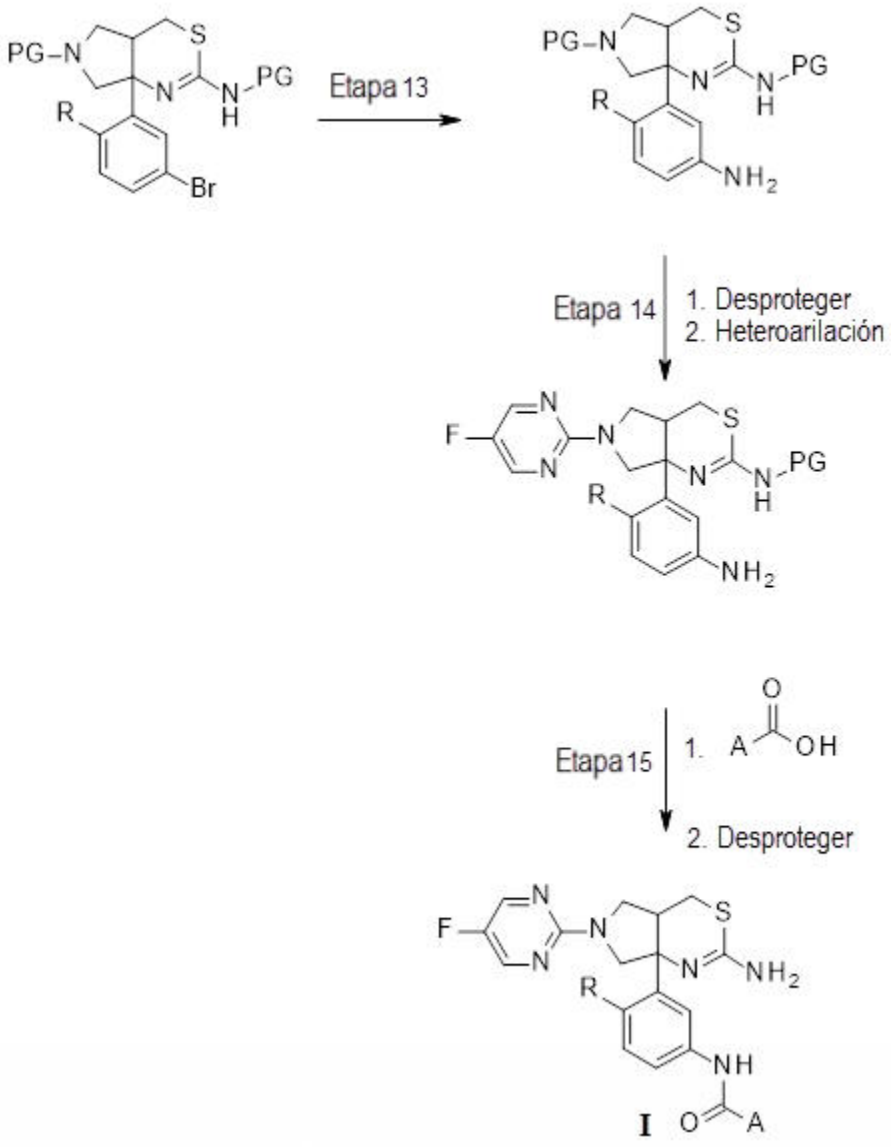
Esquema 2



El Esquema 2 ilustra diferentes vías del producto de pirrolo tiazina de la Etapa 10 o Etapa 12. El isoxazol bicíclico protegido puede tratarse con Zn en polvo en ácido acético o mediante Raney Nickel en un solvente polar tal como etanol en condiciones de hidrogenación de presión para proporcionar una aminopirrolidina metanol (producto de la Etapa 11). El producto de aminopirrolidina metanol de la Etapa 11 se hace reaccionar luego con isotiocianato de benzoilo en un solvente polar tal como THF, seguido por la adición de 1,1carbonildiimidazol (CDI) para proporcionar la pirrolidina tiazina protegida fusionada (producto de la Etapa 12). De manera alternativa, la amina del isoxazol bicíclico puede hacerse reaccionar con isotiocianato de benzoilo para

proporcionar la tiourea (producto de la Etapa 8) y luego, en la Etapa 9, el anillo de isoxazol puede abrirse con cinc en polvo en ácido acético para proporcionar el producto compuesto de hidroxilo de la Etapa 9. El compuesto de hidroxilo puede entonces tratarse con CDI en un solvente aprótico polar tal como THF o 1-cloro-N,N,2-trimetilpropenilamina en DCM para formar la pirrolidina tiazina protegida fusionada (producto de la Etapa 10). La pirrolidina tiazina fusionada puede formarse también a partir de una reacción de Mitsunobu tal como mediante el uso de trifenilfosfina y azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD).

Esquema 3



El Esquema 3 representa la conversión de la pirrolo tiazina en la anilina (producto de la Etapa 13), que puede entonces acilarse, seguida por la desprotección y heteroarilación de la pirrolidina. La acilación del nitrógeno de anilina y la desprotección de la amina de la tiazina lleva a los compuestos de la Fórmula I.

La deshalogenación de azido se lleva a cabo en la pirrolo tiazina adecuada en presencia de una fuente de azida, tal como azida de sodio. Dichas reacciones de deshalogenación de azido son conocidas y contempladas en la técnica. La reducción del intermedio de azida resultante a la anilina (producto de la Etapa 13) puede llevarse a cabo mediante condiciones de hidrogenación que son conocidas y descritas en la técnica o mediante la reducción de agentes conocidos en la técnica, tales como $LiAlH_4$, $NaBH_4$ y PPh_3.

Una pirrolidina protegida con BOC puede desprotegerse en condiciones ácidas conocidas en la técnica (Etapa 1 de la Etapa 14). La pirrolidina desprotegida puede heteroarilarse en una sustitución aromática nucleofílica (SNAr) con una pirimidina aromática sustituida, mediante el uso de una base orgánica tal como dipea, trietilamina o N,N,N,N'-tetrametilguanidina para proporcionar el producto de la Etapa 2 en la Etapa 14. El producto de anilina de la Etapa 14 puede acoplarse con ácidos carboxílicos heteroaromáticos en condiciones de acoplamiento (producto de la Etapa 1 de la Etapa 15). El experto en la técnica reconocerá que hay una cantidad de métodos y reactivos para la formación de amidas como resultado de la reacción de aminas y ácidos

carboxílicos. Por ejemplo, la reacción de una anilina adecuada con un ácido adecuado en presencia de un reactivo de acoplamiento y una base de amina, tal como DIPEA o trietilamina, proporcionará un compuesto de Fórmula I luego de la desprotección de la amina de la tiazina. Los reactivos de acoplamiento incluyen carbodiimidas, tales como DCC, DIC, EDCI y oximas aromáticas tales como HOBt y HOAt. Adicionalmente, pueden utilizarse sales de fosfonio o uronio de aniones no nucleofílicos tales como HBTU, HATU, PyBOP y PyBrOP en lugar de los reactivos de acoplamiento más tradicionales. Pueden utilizarse aditivos tales como DMAP para potenciar la reacción. De manera alternativa, la amina de anilina protegida puede acilarse mediante el uso de cloruros de benzoilo sustituidos en presencia de una base tal como trietilamina o piridina. La amina de tiazina protegida puede entonces desprotegerse con una base orgánica, tal como piridina y clorhidrato de metilhidroxilamina en un solvente aprótico polar, tal como etanol o una base inorgánica, tal como hidróxido de litio en metanol para proporcionar los compuestos de la Fórmula I.

En una etapa opcional, puede formarse una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la Fórmula I mediante la reacción de una base libre adecuada de la Fórmula

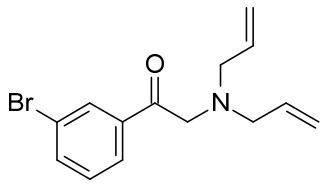
I con un ácido farmacéuticamente aceptable adecuado en un solvente adecuado en condiciones estándar. Adicionalmente, la formación de dichas sales puede suceder de manera simultánea tras la desprotección de un grupo protector de nitrógeno. La formación de dichas sales es conocida y contemplada en la técnica. Ver, por ejemplo, Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., et ál. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*, 4: 427-435 (2000); y Berge, S.M., et ál., "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977). El experto en la técnica comprenderá que un compuesto de Fórmula I se convierte fácilmente y puede aislarse como una sal farmacéuticamente aceptable, tal como sal de clorhidrato.

Preparaciones y Ejemplos

Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Preparación 1

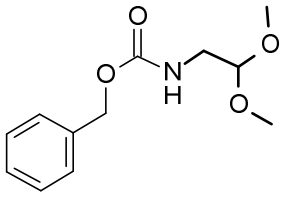
1-(3-Bromofenil)-2-(dialilamino)etanona



Se agrega carbonato de potasio (38,8 g, 281 mmol) a bromuro de 3-bromofenacilo (60 g, 216 mmol) en acetonitrilo (430 mL), y la mezcla se enfría en nitrógeno a 0 °C. Se agrega dialilamina (34,6 mL, 280,63 mmol) por goteo en 1 hora y la reacción se deja entibiar a 22 °C durante la noche. La mezcla de reacción en bruto se concentra y el residuo se particiona en agua (300 mL) y MTBE (300 mL). Se descarta la capa acuosa y la capa orgánica se lava con agua (100 mL, 2 ×) y con salmuera (100 mL). La capa orgánica se seca en sulfato de sodio, se filtra, y el solvente se evapora a peso constante para proporcionar el compuesto del título (62 g, 98 %). ES/MS (m/e): 294 (M+1).

Preparación 2

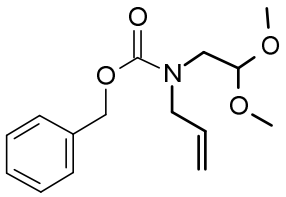
N-(2,2-dimetoxietil)carbamato de bencilo



Una solución de aminoacetaldehído dimetilacetal (25 mL, 229 mmol) en tolueno (120 mL) se trata a 0 °C con una solución de hidróxido de sodio 4,85 M (70,8 mL, 343,5 mmol). La mezcla se agita a 0 °C durante 10 minutos y se agrega cloroformato de bencilo (33,8 mL, 229 mmol), manteniendo la temperatura interna por debajo de 20 °C durante la adición. La mezcla se calienta a temperatura ambiente durante 4 horas. La capa orgánica se separa, se lava con salmuera, se seca en sulfato de sodio y se concentra hasta la sequedad para proporcionar el compuesto del título (54 g, 98 %). ES/MS (m/e): 240 (M+H).

Preparación 3

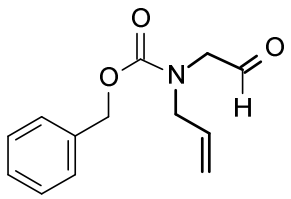
N-alil-N-(2,2-dimetoxietil)carbamato de bencilo



Una solución de N-(2,2-dimetoxietil)carbamato de bencilo (50 g, 208,9 mmol) en tolueno (180 mL) se trata con hidróxido de potasio sólido (51,6 g, 919,69 mmol) en nitrógeno. Luego de 10 minutos, se agrega cloruro de benciltrietilamonio (0,8 g, 3,1 mmol). Luego de otros 10 minutos, se agrega una solución de bromuro de alilo (33 g, 272,8 mmol) en tolueno (50 mL) por goteo en 10 minutos. La mezcla resultante se agita a 50 °C durante 48 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se inactiva con agua. La capa orgánica se separa, se lava con salmuera, se seca en sulfato de magnesio y se concentra hasta la sequedad para proporcionar el compuesto del título (44 g, 75 %). ES/MS (m/e): 280 (M+H).

Preparación 4

N-alil-N-(2-oxoetil)carbamato de bencilo

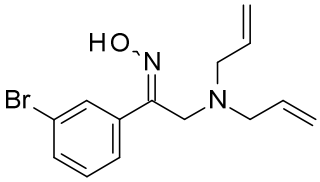


Se agita una solución de N-alil-N-(2,2-dimetoxietil)carbamato de bencilo (30 g, 107 mmol) en ácido fórmico (36,8 mL, 860 mmol) y agua (4,84 mL) a temperatura ambiente durante la

noche. La mezcla se concentra y se diluye con hexanos/EtOAc (1:2) y agua. Se separa la capa orgánica, se lava con solución de salmuera hasta que pH=6, y se seca en sulfato de sodio. El solvente se evapora para proporcionar el compuesto del título (25 g, 99 %). ES/MS (m/e): 234 (M+H).

Preparación 5

Oxima de 1-(3-Bromofenil)-2-(dialilamino)etanona

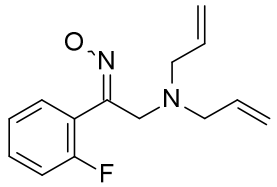


Se agita una solución de 1-(3-bromofenil)-2-(dialilamino)etanona (60 g, 204,7 mmol) en etanol (720 mL) y piridina (24,8 mL, 307 mmol) durante 15 minutos a 22 °C. Se agrega clorhidrato de hidroxilamina (17 g, 246 mmol) en partes a la solución durante 1 hora. La reacción se calienta a 50 °C durante 2 horas y luego se calienta a 70 °C durante 16 horas. El solvente se evapora y el residuo se particiona en agua (300 mL) y MTBE (300 mL). Se separa la capa orgánica y se lava con agua (100 mL, 2 ×) y salmuera (100 mL). La capa orgánica se seca en sulfato de sodio, se filtra, y se evapora

hasta la sequedad para proporcionar el compuesto del título (75,5 g, 79 %). ES/MS (m/e): 309 (M+1).

Preparación 6

Oxima de 2-(Dialilamino)-1-(2-fluorofenil)etanona

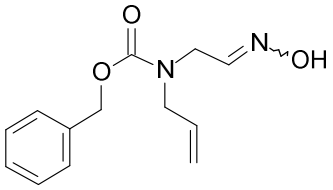


Se agrega dialilamina (1,56 L, 12,2 mol) a una solución de 2-bromo-1-(2-fluorofenil)etanona (1291 g, 5,8 mol), en etanol (12,9 L), manteniendo la temperatura interna por debajo de los 30 °C. La mezcla de reacción se agita durante 4 horas a 22 °C. Se agrega clorhidrato de hidroxilamina (543 g, 7,58 mol) en partes a la solución y luego se calienta durante 16 horas a 70 °C. La reacción se enfría a temperatura ambiente, el solvente se evapora y el residuo se particiona en agua (5,1 L) y MTBE (6,4 L). Se agrega carbonato de sodio para ajustar la capa acuosa a pH=5,5, y la capa acuosa se extrae con MTBE adicional (1,2 L). Las capas orgánicas se combinan y lavan con agua y salmuera. La capa orgánica se seca en sulfato de sodio, se filtra, y se evapora hasta la sequedad

para proporcionar el compuesto del título en bruto (1,45 kg, 104 %), el cual se utiliza sin purificación adicional. ES/MS (m/e): 249 (M+1).

Preparación 7

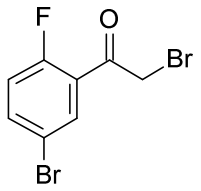
N-alil-N-[2-hidroxiiminoetil]carbamato de bencilo



Una solución de N-alil-N-(2-oxoetil)carbamato de bencilo (25 g, 107 mmol) en acetonitrilo (150 mL) se trata con clorhidrato de hidroxilamina (9,68 g, 139 mmol) y una solución de trihidrato de acetato de sodio (16 g, 117,9 mmol) en agua (75 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. El acetonitrilo se evapora y la solución acuosa se extrae con EtOAc. La capa orgánica se separa, se seca en sulfato de magnesio y se concentra al vacío para proporcionar el compuesto del título (24 g, 90 %). ES/MS (m/e): 249 (M+H).

Preparación 8

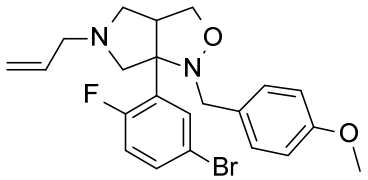
2-Bromo-1-(5-bromo-2-fluorofenil)etan-1-ona



Se agrega N-bromosuccinimida (984 g, 5,53 mol) por partes a una solución de 1-(5-bromo-2-fluorofenil)etan-1-ona (1000 g, 4,6 mol) y se agrega ácido *p*-tolueno sulfónico (1315 g, 7,64 mol) en DCM (7 L) a 35 °C. La mezcla se agita y calienta a 40 °C. La mezcla se enfría a 24 °C y se agrega $NaHCO_3$ al 7 % (5 L). Las capas se separan y la capa orgánica se lava con Na_2SO_3 al 10 % (5 L) y agua (5 L). La capa orgánica se concentra a 2-3 volúmenes para proporcionar el compuesto del título, el cual se utiliza sin purificación adicional.

Preparación 9

5-Alil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-1-(4-metoxibencil)hexahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol

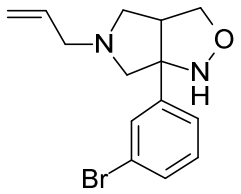


A una solución de 2-bromo-1-(5-bromo-2-fluorofenil)etan-1-ona (1363 g, 4,61 mol) en tolueno (10 L) se agrega dialilamina (537 g, 5,53 mol) y dipea (2381 g, 18,42 mol). La mezcla se agita durante 4 horas a 40 °C para proporcionar 1-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(dialilamino)etan-1-ona, la cual no está aislada. Se agrega N-(4-metoxibencil)hidroxilamina (847 g, 5,53 mol) y $Ti(OiPr)_4$ (1965 g, 6,91 mol) a la mezcla que contiene 1-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(dialilamino)etan-1-ona en bruto. La mezcla se agita a 90 °C durante 2 horas. La mezcla se enfría a 20 °C y se agrega monohidrato de ácido cítrico al 50 % (4 L) Na_2CO_3 saturado (4 L). Las capas se separan y la solución acuosa se extrae con MTBE (5 L). El extracto orgánico se lava con agua (5 L), y se filtra a través de tierra diatomea y se concentra hasta la sequedad. Se agrega al residuo EtOAc (10 L) ácido oxálico (580 g) y se filtra un sólido y se agrega a NaOH 1 N (13 L). Se agrega MTBE (5 L) y la mezcla se filtra a través de tierra diatomea. Las capas se separan y la capa orgánica se concentra a 2 volúmenes. Se agrega heptano (3 L) y la solución se enfría a 10 °C. El sólido resultante se filtra para proporcionar el

compuesto del título (1330 g, 64 %). ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ: 2,51-2,49(m, 3H), 3,09-3,04(m, 3H), 3,78-3,41(m, 6H), 4,01(m, 1H), 5,24-5,01(m, 2H), 5,89-5,85(m, 1H), 6,82-6,80(m, 2H), 7,51-7,13(m, 3H), 7,63-7,62(m, 1H), 7,65-7,64(m, 1H).

Preparación 10

5-Alil-6a-(3-bromofenil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol

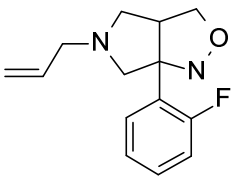


La oxima de 1-(3-bromofenil)-2-(dialilamino)etanona en bruto (75,5 g, 195,34 mmol) se disuelve en tolueno (600 mL) y se somete a reflujo durante 12 horas. El solvente se evapora al vacío y el residuo se disuelve en una mezcla de HCl acuoso 1 N (1 L) y MTBE (300 mL). La mezcla se agita durante 15 minutos y se agrega tierra diatomea (10 g). La mezcla se agita durante 20 minutos adicionales y se filtra a través de tierra diatomea. La torta de filtro se lava con HCl acuoso 1 N adicional (200 mL) y MTBE (200 mL). Se separa la capa orgánica y se lava con HCl 1 N (2 × 100 mL). Se combinan las

capas acuosas y el pH se ajusta a 9 con NaOH al 50 % p/p. La mezcla acuosa se extrae con MTBE (3 x 250 mL). Las capas orgánicas se combinan, se secan en sulfato de sodio y se filtran. El filtrado se evapora y se seca al vacío para proporcionar un sólido rojo (60 g). El sólido rojo se diluye con heptano (600 mL) y la mezcla se calienta a reflujo durante 20 minutos. Se agrega carbón (2 g) y la mezcla se filtra a través de tierra diatomea. Los filtrados se concentran a presión atmosférica para ajustar el volumen final a 300 mL. La solución se enfría a 22 °C y se agita durante 3 horas. Se recolecta un sólido amarillo claro mediante filtración y se seca al vacío a un peso constante para proporcionar el compuesto del título (40 g, 60 %). ES/MS (m/e): 309 (M+1).

Preparación 11

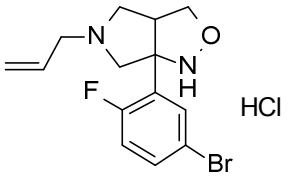
5-Alil-6a-(2-fluorofenil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol



Etapa de reacción de química de flujo: Un reactor tubular de acero inoxidable constante de 343 ml (O.D=1/8 pulgada) se coloca dentro de un horno de GC y se llena de tolueno a 20 mL/min durante 20 minutos. Se aplica contrapresión de nitrógeno (720 psig) y se establece la temperatura del GC a 210 °C. Luego de que la temperatura alcanzó los 210 °C, se bombea una solución de oxima de 2-(dialilamino)-1-(2-fluorofenil)etanona (480,51 g, 1,74 mol) en tolueno (5,81 L) a través del reactor a 22,866 mL/min utilizando un par de bombas de jeringa de alta presión que trabajan en modo continuo para proporcionar un tiempo de residencia de 15 minutos. Luego de consumirse toda la solución madre, el reactor se llena de tolueno a 22,866 mL/min durante 30 minutos. La temperatura del horno de GC se establece a 25 °C y la solución completa se recolecta y concentra al vacío. El solvente se evapora y el residuo se disuelve en cloruro de metileno (2,5 L) y agua (5 L). El pH se ajusta a 1 con ácido clorhídrico y la capa acuosa se separa y neutraliza con hidróxido de sodio para ajustar el pH a 10. La capa acuosa se extrae con MTBE (3 x 2,5 L). Los extractos orgánicos se combinan, se secan en sulfato de sodio, se filtran y se evaporan hasta la sequedad para proporcionar el compuesto del título en bruto (248 g, 47 %), el cual se utiliza sin purificación adicional. ES/MS (m/e): 249 (M+1).

Preparación 12

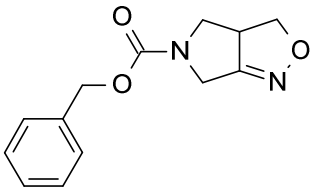
Clorhidrato de 5-Alil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)hexahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol



Se agrega ácido trifluoroacético (4 L, 52,9 mol) por goteo a una solución de 5-alil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-1-(4-metoxibencil)hexahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol (1990 g, 4,45 mol) en DCM (12 L) a una velocidad para mantener la temperatura por debajo de los 35 °C. Luego de completar la adición, la mezcla se calienta a 33-43 °C y se agita durante 6 horas. Se agrega NaOH (20%, 10 L) a una velocidad para mantener la temperatura por debajo de los 35 °C. Las capas se separan y la capa orgánica se lava con agua (6 L). La solución se concentra, se agrega etanol (16 L) y la mezcla se filtra a través de tierra diatomea. El filtrado se concentra y se agrega EtOAc (10 L). Se agrega HCl 4 M en EtOAc (8 L) y el sólido resultante se filtra y se seca para proporcionar el compuesto del título (1385 g, 85,6 %). ES m/z 327,1 (M+1)

Preparación 13

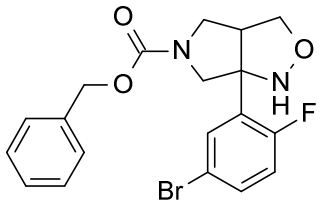
3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo



Una solución de N-alil-N-[2-hidroxiiminoetil]carbamato de bencilo (24 g, 96,6 mmol) en DCM (338 mL) se trata por goteo en 10 minutos con una solución acuosa 5 % p/p de hipoclorito de sodio (106,08 mmol, 143,06 mL). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se inactiva con una solución acuosa al 40 % de bisulfito sódico (7 g). La capa orgánica se separa, se seca en sulfato de magnesio y se concentra al vacío. El producto bruto se purifica en gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 5 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título (18 g, 75 %). ES/MS (m/e): 247 (M+H).

Preparación 14

6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo



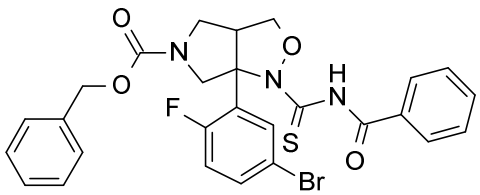
Se agrega por goteo una solución 1,6 M de hexanos de litio de n-butilo (25,4 mL, 40,6 mmol) a una solución a -78 °C de 4-bromo-1-fluoro-2-yodobenceno (12,22 g, 40,6 mmol) en THF (60 mL) para proporcionar una solución amarilla que se agita a -78 °C durante 15 minutos.

Se agrega eterato de trifluoruro de boro (5,14 mL, 40,6 mmol)a una solución separada a -78 °C de 3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo (5 g, 20,3 mmol) en THF (60 mL) y la mezcla se agita a -78 °C durante 5 minutos. Esta solución se agrega a la mezcla de organolitio a -78 °C preparada anteriormente mediante una cánula. La mezcla combinada se agita durante 30 minutos a -78 °C. La mezcla se inactiva con cloruro de amonio acuoso saturado y se calienta a temperatura ambiente. La mezcla se extrae con EtOAc (3 ×) y los extractos orgánicos se combinan, se secan en sulfato de sodio, se filtran y el solvente se

remueve al vacío. El producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 35 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título (2,27 g, 27 %). ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br) 421/423 (M+H).

Preparación 15

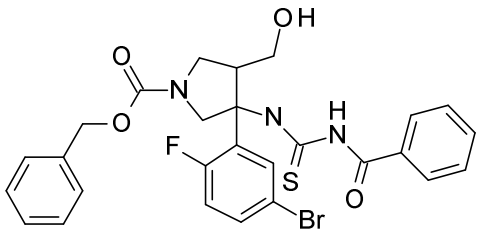
1-(benzoilcarbamotioil)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo



Se agrega isotiocianato de benzoilo (2,87 mL, 21,28 mmol) mediante goteo a una solución de 6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo (5,977 g, 14,2 mmol) en THF (95 mL) y se agita durante la noche en nitrógeno. El solvente se remueve al vacío. El producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 30 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título (6,05 g, 73%). ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br) 584/586 (M+H).

Preparación 16

3-(benzoilcarbamotioilamino)-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo

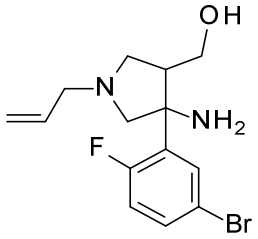


Se agita una mezcla de 1-(benzoilcarbamotioil)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo (6,05 g 10,4 mmol) y cinc (polvo, <10 micras) (6,77 g, 103,5 mmol) en ácido acético (52 mL) a temperatura ambiente durante la noche bajo nitrógeno. La reacción se diluye con EtOAc y se filtra a través de tierra diatomea. El solvente se extrae al vacío y el residuo se diluye con EtOAc, agua y bicarbonato de sodio acuoso saturado. La mezcla se extrae con EtOAc (3 ×), las capas orgánicas combinadas se combinan y se secan en sulfato de sodio, se filtran y el solvente se remueve al vacío. El producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 30 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título (5,222 g, 86%). ES/MS

(m/e): ($^{79}Br/^{81}Br$) 586/588 (M+H).

Preparación 17

(1-Alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)pirrolidin-3-il)metanol

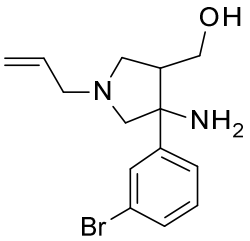


Se agrega una solución acuosa saturada de carbonato de sodio a una solución de clorhidrato de 5-alil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)hexahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol (1400 g, 3,85 mol) en DCM (7 L) para alcanzar un pH>9. Las capas se separan y el extracto orgánico se concentra a 1,5 volúmenes. Se agrega ácido acético (1,38 L), la solución se concentra a 2 L. Se agrega ácido acético (7 L) y polvo de cinc (2,5 kg, 38,5 mol) y la mezcla se calienta a 40-50 °C y se agita durante 3 horas. Se agrega EtOAc (9,8 L) y la mezcla se filtra a través de tierra diatomea. La torta de filtro se lava con EtOAc (4 L). El filtrado se separa y se agrega agua (7 L) a los agentes orgánicos combinados. Se agrega hidróxido

de amonio para alcanzar un pH □9. Las capas se separan y la capa orgánica se concentra a 2 L. Se agrega etanol (2,8 L) y la solución se concentra a 2 L. Se agrega etanol (19 L) y la mezcla se filtra a través de tierra diatomea para proporcionar una solución de etanol del compuesto del título, el cual se utiliza sin purificación adicional.

Preparación 18

[1-Alil-4-amino-4-(3-bromofenil)pirrolidin-3-il]metanol

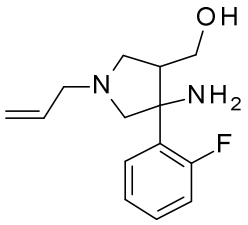


Una solución a 22 °C de 5-alil-6a-(3-bromofenil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol (40 g, 129,4 mmol) en ácido acético (400 mL) se trata con polvo de cinc (42,3 g, 646,8 mmol) en una parte. La reacción se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agrega EtOAc (400 mL) y la mezcla se filtra a través de tierra diatomea. El filtrado se evapora y el residuo se seca al vacío. El residuo se particiona en agua (300 mL) y MTBE (300 mL). El pH se

ajusta a 8 con hidróxido de sodio 50 % p/p y la capa orgánica se separa, se seca en sulfato de sodio y se filtra. El filtrado se evapora y el residuo se seca al vacío para proporcionar el compuesto del título (41 g, 97 %). ES/MS (m/e): 311 (M+1).

Preparación 19

1-Alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol

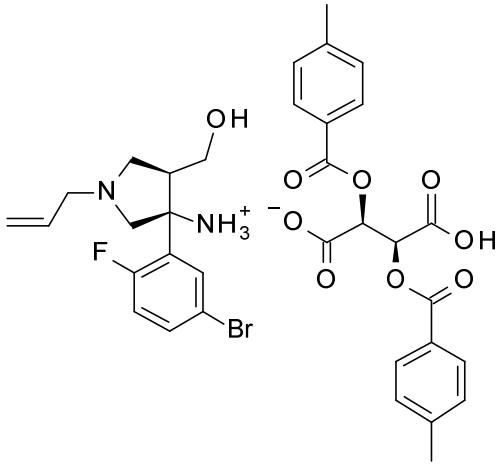


Se agrega polvo de cinc (590 g, 9 mol) a una solución de 5-alil-6a-(2-fluorofenil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol (3559 g, 1,29 mol) en una mezcla de metanol (2,85 L) y solución acuosa saturada de cloruro de amonio (3,56 L) y la mezcla se calienta durante 16 horas a 70 °C. La reacción se enfría a 60 °C, se diluye con THF (2,85 L) y se filtra mientras está caliente en tierra diatomea. El filtrado se evapora para quitar el solvente orgánico, y la mezcla acuosa se diluye con solución acuosa de ácido cítrico al 10 % p/p (4 L) y EtOAc (3,5 L). Se separa la capa orgánica y se lava la

capa acuosa con EtOAc (2 x 2 L). La capa acuosa se neutraliza con hidróxido de sodio al 50 % p/p para ajustar el pH a 10, y luego se extrae con EtOAc (2 × 1,5 L). Se combinan los extractos orgánicos, se secan en sulfato de sodio, se filtran, y se evaporan hasta la sequedad para proporcionar el compuesto del título en bruto (299 g, 92 %). ES/MS (m/e): 251 (M+1).

Preparación 20

[(3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il]amonio;(2S,3S)-4-hidroxi-2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]-4-oxo-butanoato



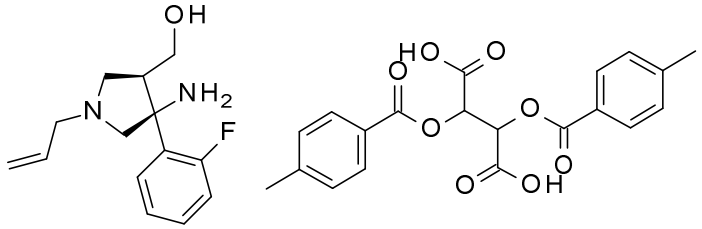
Se agrega monohidrato de ácido Di-p-toluoil-L-tartárico (1,04 kg, 2,69 mol) a una solución de (1-alil-4-amino-4-(5-bromo-2-

fluorofenil)pirrolidin-3-il)metanol (1264 g. 3,85 mmol) en etanol (21 L). La mezcla se calienta a 65-75 °C y se agita durante 3 horas. La mezcla se enfría a 5-10 °C, se agrega un cristal germinal de [(3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il]amonio;(2S,3S)-4-hidroxi-2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]-4-oxo-butanoato (1,0 g), y la mezcla se agita durante 3 horas. El sólido se filtra y la torta de filtro se lava con etanol frío (1,4 L). La torta de filtro se seca para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco. Análisis quiral del segundo isómero de elución: Columna: IC Chiralpak, 4,6 mm * 250 mm * 5 µm; eluyente: hexano al 90 % (dietilamina al 0,3%): etanol al 10 % (dietilamina al 0,3%); velocidad de flujo de 1,0 mL/min a UV 270 nm confirma el enantiómero enriquecido de forma enantiomérica (99 % ee) con R_t = 7,4 minutos, (1050 g, 38 %). ^{1}H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ: 2,40(s, 6H), 3,05-3,04(m, 1H), 3,57-3,31(m, 3H), 3,66-3,58(m, 4H), 3,75-3,74(m, 2H), 5,38-5,36(m, 1H), 5,50-5,46(m, 1H), 5,88(s, 2H), 5,97-5,91(m, 1H), 7,10-7,05(m, 1H), 7,29(d, J=8,0 Hz, 4H), 7,53-7,51(m, 1H), 7,80-7,78(m, 1H), 8,01(d, J=8,0 Hz, 4H).

Preparación 21

[(3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-

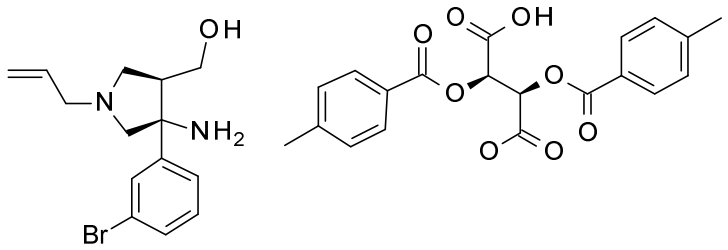
il]metanol; ácido 2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]butanodioico



Se agrega una solución de ácido di-*p*-toluoil-L-tartárico (348,6 g, 884 mmol) en 1-metoxi-2-propanol (1,13 L) a una solución de [(3R,4S)-1-alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol (225,9 g, 902 mmol), en 1-metoxi-2-propanol (1,13 L) previamente calentada a 40 °C. La reacción se enfría a 22 °C y se agita durante 18 horas. Se recolecta un sólido blanco mediante filtración y se lava con 1-metoxi-2-propanol (600 ml). El sólido recolectado se seca para proporcionar el compuesto del título (183,01 g, 31,8 %). ES/MS (m/e): 251 (M+1).

Preparación 22

[(3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(3-bromofenil)pirrolidin-3-il]metanol; ácido (2R,3R)-2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]butanodioico

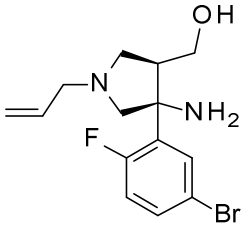


Una solución de [1-alil-4-amino-4-(3-bromofenil)pirrolidin-3-il]metanol (77 g, 235 mmol) en alcohol isopropílico (914 mL) se calienta a 70 °C. Se agrega ácido Di-*p*-toluoil-L-tartárico (86,2 g, 223 mmol) y la mezcla se enfría a 22 °C durante 2 horas y se agita durante la noche. La suspensión se filtra para recolectar un sólido amarillo claro y se lava con alcohol isopropílico. El sólido se seca al vacío para proporcionar el compuesto del título (63 g, 36 %). ES/MS (m/e): 311 (M+1). El producto es analizado mediante cromatografía quiral de fase inversa: Análisis del primer isómero de elusión (columna: Chiralpak ID-3 4,6 x 50 mm; eluyente: 70:30, bicarbonato de amonio acuoso 20 mM: acetonitrilo; flujo: 1,5 mL/min a UV 215 nm) confirma el enantiómero enriquecido de forma enantiomérica (96 % ee) con R_t = 1,26 minutos.

Preparación 23

((3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)pirrolidin-

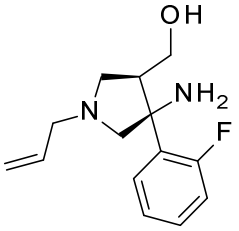
3-il)metanol



HCl 1 N (500 mL, 500 mmol) se agrega a una solución a 0 °C de [(3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il]amonio;(2S,3S)-4-hidroxi-2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]-4-oxo-butanoato (100 g, 139,4 mmol) en EtOAc (500 mL). La mezcla se agita durante 1 hora. Se separa la capa acuosa y el pH se ajusta a 8 con NaOH 1 N. La capa acuosa se extrae con EtOAc (350 mL × 2). Las capas orgánicas se combinan, se lavan con agua (500 mL) y se concentran para proporcionar el compuesto del título (40 g, 87 %). Análisis quiral del segundo isómero de elución: Columna: IC Chiralpak, 4,6 mm * 250 mm * 5 µm; eluyente: hexano al 90 % (dietilamina al 0,3%): etanol al 10 % (dietilamina al 0,3%); velocidad de flujo de 1,0 mL/min a UV 270 nm confirma el enantiómero enriquecido de forma enantiomérica (99,7% ee) con R_t = 7,4 minutos. ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$ δ: 2,78-2,70(m, 5H), 3,16-3,00(m, 3H), 3,87-3,75(m, 1H), 3,90-3,84(m, 1H), 5,24-5,11(m, 2H), 5,91-5,87(m, 1H), 6,95-6,91(m, 1H), 7,35-7,32(m, 1H), 7,67- 7,65 (m, 1H).

Preparación 24

[(3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol

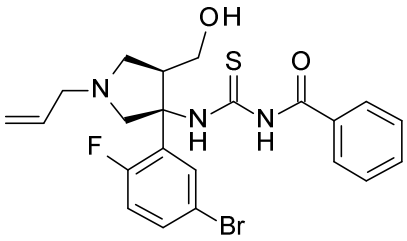


Se disuelve [(3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol; ácido 2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]butanodioico (211 g, 331 mmol) en agua (2,1 L) y EtOAc (2,3 L). Se agrega ácido clorhídrico al 35 % p/p para ajustar el pH a 1. Se separa la capa acuosa y el pH se ajusta a 10 con hidróxido de sodio al 50 % p/p y se extrae con EtOAc (2×). El pH de la capa acuosa se ajusta a 10 con NaOH acuoso y se extrae con MTBE (3×) mientras se mantiene también el pH de la solución acuosa a pH=10. Se combinan los extractos orgánicos, se seca, en sulfato de sodio, se filtran, y se concentran hasta la sequedad para proporcionar el compuesto del título en bruto (73 g, 88 %, 94,8 % ee). El producto es analizado mediante cromatografía quiral: Columna

AS-H, eluyente alcohol isopropílico al 10%, 2% isopropilamina; velocidad de flujo 3 mL/min a UV 220; presión de 100 bar a 35 °C para proporcionar el compuesto del título como el segundo isómero de elución, R_f = 2,26 minutos. ES/MS (m/e): 251 (M+1).

Preparación 25

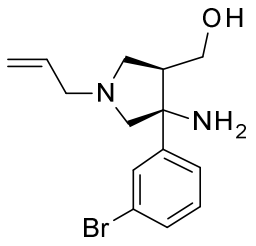
N-(((3S,4R)-1-Alil-3-(5-bromo-2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il)carbamotioil)benzamida



Se agrega isotiocianato de benzoilo (15,0 g, 91,9 mmol) a una solución al 0 °C de ((3R,4S)-1-alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)pirrolidin-3-il)metanol (30 g. 91,1 mmol) en THF (400 mL). La solución se calienta a 25 °C y se agita durante 1 hora para proporcionar una solución de THF del compuesto del título, la cual se utiliza sin purificación adicional.

Preparación 26

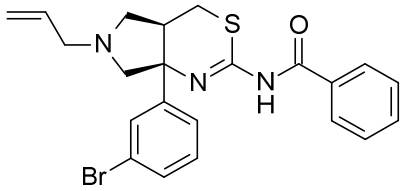
[(3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(3-bromofenil)pirrolidin-3-il]metanol



Se combina [(3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(3-bromofenil)pirrolidin-3-il]metanol; ácido (2R,3R)-2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]butanodioico (63 g 85,8 mmol) con HCl acuoso 1 N (800 mL) y EtOAc (400 mL) y la mezcla se agita durante 15 minutos a 22 °C. Las capas se separan y el pH de la capa acuosa se ajusta a 10 con hidróxido de sodio al 50 % p/p. La mezcla acuosa se extrae con MTBE (3 × 250 mL). Las capas orgánicas combinadas se secan en sulfato de magnesio, se filtra, y se evapora hasta la sequedad para proporcionar el compuesto del título (27 g, 99 %). ES/MS (m/e): 311 (M+1).

Preparación 27

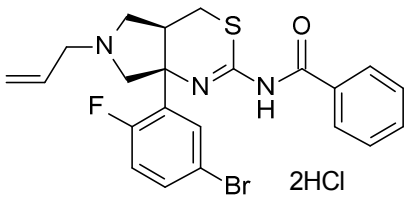
N-[(4aR,7aS)-6-Alil-7a-(3-bromofenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Una solución de [(3R,4S)-1-alil-4-amino-4-(3-bromofenil)pirrolidin-3-il]metanol (27 g; 86,7 mmol) en THF (270 mL) se enfría a -5 °C en atmósfera de nitrógeno. Se agrega isotiocianato de benzoilo (12,3 mL, 91 mmol) por goteo, manteniendo la temperatura por debajo de 0 °C. La reacción se deja calentar a 22 °C durante 1 hora. Se agrega 1,1'-Carbonildiimidazol (28,1 g, 173,5 mmol) en una sola parte y la reacción se agita durante 1 hora a 22 °C y luego se calienta a reflujo durante 16 horas. El solvente se remueve al vacío y el residuo se seca al vacío. El material en bruto se particiona en MTBE (500 mL) y agua (250 mL). La capa orgánica se separa, se seca en sulfato de magnesio, se filtra y se evapora hasta la sequedad. El material bruto se purifica en un gradiente de gel de sílice de 90/10 a 60/40 DCM / EtOAc para proporcionar el compuesto del título (27 g, 68 %). ES/MS (m/e): 456 (M+1).

Preparación 28

N-((4aR,7aS)-6-Alil-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida, diclorhidrato

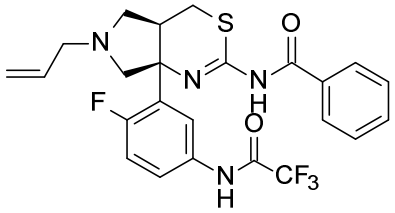


Se agrega trifenilfosfina (36,8 g, 140,3 mmol) a una solución de THF (400 mL) de N-(((3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il)carbamotioil)benzamida (91,1 mmol). Se agrega azodicarboxilato de di-*t*-butilo (31,6 g, 137,2 mmol) en THF (100 mL). La mezcla se agita a 20-30 °C durante 2 horas. La mezcla se concentra y se agrega MTBE (400 mL). La solución se filtra a través de tierra diatomea y la torta se lava con MTBE (130 mL). Los filtrados se combinan y se agrega HCl 1 N en EtOAc (200 mL). Se agita la mezcla durante 2 horas y luego se concentra a 500 mL. Se agrega MTBE (320 mL) y la solución se filtra y se lava con heptanos (130 mL). El sólido se suspende en EtOAc (650 mL) y se agita a 50-60 °C durante 2 horas. La suspensión caliente se filtra y el sólido se lava con EtOAc (130 mL) y heptano (130 mL). El sólido se resuspende en EtOAc (650 mL) y se agita durante 2 horas a 50-

60 °C. La suspensión caliente se filtra y se lava con EtOAc (130 mL) y heptano (130 mL). El sólido se seca para proporcionar el compuesto del título como la sal de di-HCl (40 g, 80 %, 99,5 % ee). Análisis quiral del primer isómero de elución: Columna: IC Chiralpak, 4,6 mm * 250 mm * 5 µm; eluyente: hexano al 85% (dietilamina al 0,1%): alcohol isopropílico al 15 % (dietilamina al 0,1%); velocidad de flujo de 1,0 mL/min a UV 282 nm confirma el enantiómero enriquecido de forma enantiomérica (99,5 % ee) con R_t = 12,5 minutos.

Preparación 29

N-((4aR,7aS)-6-Alil-7a-(2-fluoro-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)fenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida

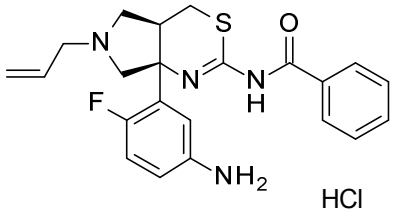


Se agrega carbonato de sodio al 15 % (440 mL) a una solución de diclorhidrato de N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-

d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (495 g, 717,88 mmol) en EtOAc (3 L) y agua (784 mL). La mezcla se agita durante 1-2 horas. Las capas se separan y la capa orgánica se filtra a través de gel de sílice (40 g) y se lava con EtOAc (600 mL). El filtrado se concentra hasta la sequedad para proporcionar N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida. Se agrega trifluoroacetamida (136,7 g, 1,21 mol), NaI (182,5 g, 1,22 mol), tamices moleculares 4 A (342 g) y K_2CO_3 (170,9 g, 1,24 mol) a una solución de N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (341 g, 494,54 mmol) en DMSO (525 mL) y 1,4-dioxano (1,025 L). Se agrega trans-N,N'-dimetilciclohexano (81,6 g, 573,66 mmol) y yoduro de cobre (27,3 g, 143,34 mmol) en DMSO (500 mL) a la mezcla de reacción. La mezcla se agita durante 5 minutos. La mezcla se calienta a 100 °C, se agita durante 8 horas y se enfría a 24 °C. Se agrega agua (5,9 L) y DCM (5,9 L), la mezcla se filtra y se separan las capas. La capa orgánica se lava con agua (5,9 L) para obtener el compuesto del título en una solución de DCM, la cual se utiliza sin purificación adicional.

Preparación 30

N-((4aR,7aS)-6-Alil-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida, clorhidrato

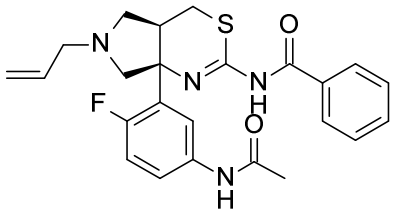


Se agrega hidróxido de sodio (28,7 g) y agua (2,7 L) a una solución de DCM de N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(2-fluoro-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)fenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (250 g, 494,4 mmol) y la mezcla se agita a 24 °C durante 68 horas. Se agrega HCl 1 N (3,5 L) para obtener un pH de 1-3. Las capas se separan y la capa acuosa se lava con DCM (680 mL). Se agrega DCM (4 L) a la acuosa, seguido por hidróxido de amonio al 21 % para obtener un pH de 8-10. Las capas se separan y se combinan los extractos orgánicos, se filtran a través de gel de sílice (170 g) y se lavan con DCM (1,4 L). El solvente se concentra hasta la sequedad y se diluye con EtOAc (4 L). Se agrega HCl 1 N en EtOAc (700 mL) a una temperatura por debajo de 25 °C y la mezcla se agita durante 1 hora. La mezcla se concentra a alrededor de 7-8 volúmenes y se agrega EtOAc (2,8 L). El precipitado resultante se filtra y se lava con EtOAc (400

mL). El sólido se seca para proporcionar el compuesto del título. (246 g, 52%).

Preparación 31

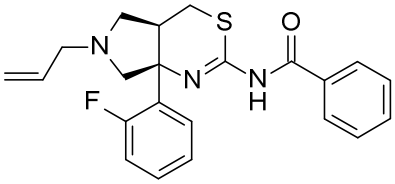
N-((4aR,7aS)-7a-(5-Acetamido-2-fluorofenil)-6-alil-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida



Se agrega anhídrido acético (23,5g, 0,23 mol) a una solución de clorhidrato N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (100 g, 0,153 mol) y trietilamina (54,3 g, 0,535 mol) en DCM (800 mL). Luego de agitar durante 1 hora a 20-25 °C, se agrega $NaHCO_3$ saturado (700 mL) y agua (600 mL). Las capas se separan para proporcionar el compuesto del título, el cual se utiliza sin purificación adicional como una solución en DCM.

Preparación 32

N-[(4aR,7aS)-6-Alil-7a-(2-fluorofenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida

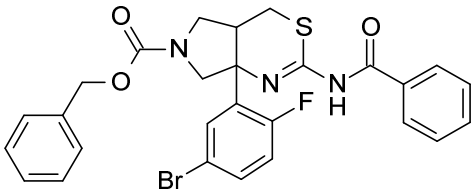


Una solución de [(3R,4S)-1-alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol (129,7 g; 414 mmol) en THF (2,3 L) se enfría a 0 °C en atmósfera de nitrógeno. Se agrega isotiocianato de benzoilo (61,5 mL, 456 mmol), manteniendo la temperatura por debajo de 5 °C. La reacción se calienta a temperatura ambiente durante 3 horas y se agrega 1,1'-carbonildiimidazol (87,4 g, 538,9 mmol), y la reacción se agita a 22 °C durante 1 hora seguido por calentamiento a 70 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfría a 22 °C y el solvente se evapora. El residuo se particiona en EtOAc (1 L) y agua (1 L). Se separa la capa orgánica y se extrae la capa acuosa con EtOAc (2 × 400 mL). Se combinan los orgánicos, se secan en sulfato de sodio, se filtran, y se evaporan hasta la sequedad para proporcionar el compuesto del título en bruto. El producto bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de

EtOAc / DCM de DCM al 0-40 % para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (170 g, 99 %) que contiene el solvente residual. ES/MS (m/e): 396 (M+1).

Preparación 33

2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de bencilo

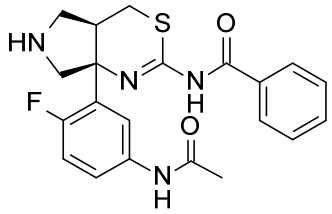


Se agrega 1,1'-carbonildiimidazol (2,87 g, 17,7 mmol) a una solución de 3-(benzoilcarbamotioilamino)-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (5,198 g, 8,86 mmol) en THF (52 mL). La mezcla se agita durante 1,5 horas a temperatura ambiente y luego la reacción se calienta a reflujo durante la noche en nitrógeno. La reacción se enfría, se diluye con agua y se extrae con EtOAc (3 ×). Se combinan las capas orgánicas, se secan en sulfato de sodio, se filtran y el solvente se remueve al vacío. El producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 30 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para

proporcionar el compuesto del título (2,93 g, 58 %). ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br). 568/570 (M+H)

Preparación 34

N-((4aR,7aS)-7a-(5-Acetamido-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida

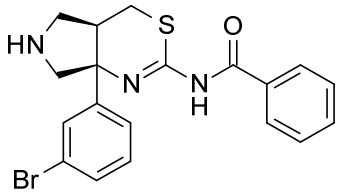


Se agrega trifenilfosfina (4,0g, 0,015 mol) y ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (15,2 g, 0,097 mol) a una solución de DCM de N-((4aR,7aS)-7a-(5-acetamido-2-fluorofenil)-6-alil-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (0,153 mol). Se agrega acetato de paladio (1,7 g, 7,7 mmol) y la mezcla se agita de 20 a 30 °C durante 1 hora. Se agrega hidróxido de amonio al 25 % y se separan las capas. La capa orgánica se lava con HOAc (3,0 equiv en 500 mL de agua) y el pH se ajusta a 8-9 con hidróxido de amonio al 25 %. La capa acuosa se extrae con DCM (2 × 500 mL). Los extractos orgánicos se combinan y concentran a 3-4 volúmenes. Se agrega MTBE (1 L) y la mezcla se filtra. La mezcla se

concentra y se agrega heptano (1 L). El sólido resultante se filtra, recolecta y seca para proporcionar el compuesto del título (48 g, 76 %). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 2,15 (s, 3H), 2,87-2,83(m, 1H), 3,43-3,23(m, 5H), 3,70-3,67(m, 1H), 7,12-7,07 (m, 1H), 7,28-7,27 (m, 1H), 7,52-7,41(m, 4H), 7,79(m, 1H), 8,18-8,16(m, 2H). ES m/z 413,1 (M+1).

Preparación 35

N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Bromofenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida

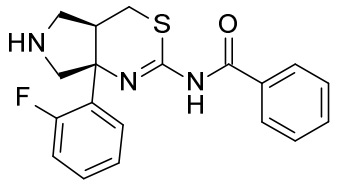


Una mezcla a temperatura ambiente de N-[(4aR,7aS)-6-alil-7a-(3-bromofenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (1 g, 2,19 mmol) y ácido N,N-dimetilbarbitúrico (0,868 g, 5,48 mmol) en cloroformo (22 mL) se desgasifica mediante burbujeo de nitrógeno a través de la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla es tratada con tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0,261 g, 219 µmol) y se

agita durante 1,5 horas en nitrógeno. En un matraz separado, una mezcla de N-[(4aR,7aS)-6-alil-7a-(3-bromofenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (22,2 g, 48,6 mmol) y ácido N,N-dimetilbarbitúrico (19,28 g, 121,6 mmol) en cloroformo (486 mL) se desgasifica mediante burbujeo de nitrógeno a través de la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla es tratada con tetrakis(trifenilfosfina)paladio (5,79 g, 4,86 mmol) y se agita durante 2 horas en nitrógeno. Se combinan las dos reacciones y el solvente se remueve al vacío para proporcionar el producto bruto. El material bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 30 minutos de metanol de 0,5 % a 10 % en DCM para proporcionar el compuesto del título (22,4 g, 100 %). ES/MS (m/e): ($^{79}Br/^{81}Br$) 416/418 (M+H).

Preparación 36

N-[(4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida

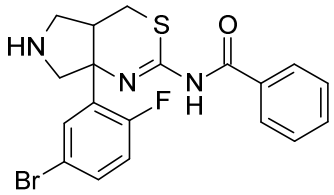


Se agrega ácido benzoico, 2-mercapto- (122 g, 793 mmol), bis(dibencilidenacetona)paladio (4,15 g, 7,21 mmol) y 1,4-bis(difenilfosfino)butano (3,14 g, 7,21 mmol) a una solución de N-[(4aR,7aS)-6-alil-7a-(2-fluorofenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (178,21 g, 360 mmol) en 2-metiltetrahidrofurán anhidro (1,96 L) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se desgasifica mediante ciclos de vacío / nitrógeno tres veces, y luego se burbujea nitrógeno a través de la reacción durante 15 minutos. La mezcla de reacción se calienta a 40 °C mientras que se burbujea nitrógeno a través de la reacción. Cuando la reacción alcanza los 40 °C, se quita el burbujeo y la mezcla de reacción se agita a 40 °C durante 3 horas en atmósfera de nitrógeno. La reacción se enfría a 22 °C y se diluye con agua (2 L). Se agrega una solución de HCl (5 M) para ajustar el pH a 1. Se separa la capa acuosa y se lava con EtOAc adicional (2 × 800 mL). El pH de la capa acuosa se ajusta a 10 con hidróxido de sodio al 50 % p/p y luego se extrae con EtOAc (10 L). La capa acuosa se lava con EtOAc adicional (2 × 750 mL). Se combinan los extractos orgánicos, se lavan con salmuera, se secan en sulfato de sodio, se filtran, y se evaporan hasta la sequedad para proporcionar el compuesto del título en bruto como un sólido amarillo claro (124,7 g, 97

%). ES/MS (m/e): 356 (M+1).

Preparación 37

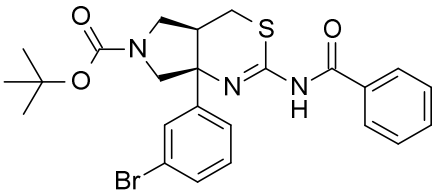
N-[7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Se agrega yodotrimetilsilano (2,21 mL, 15,46 mmol) por goteo a una solución a temperatura ambiente de 2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de bencilo (2,93 g, 5,15 mmol) en acetonitrilo (44 mL). La reacción se agita a temperatura ambiente durante dos horas y el solvente se remueve al vacío. El producto bruto se purifica con una columna SCX mediante el uso de DCM:metanol 3:1 y luego DCM:amoníaco 7 N 2:1 en metanol para proporcionar el compuesto del título (2,098 g, 94 %). ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br) 434/436 (M+H).

Preparación 38

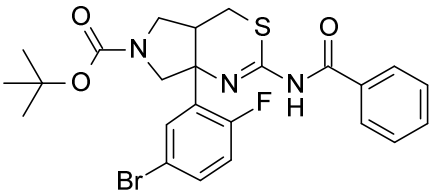
(4aR,7aS)-2-benzamido-7a-(3-bromofenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo



Una solución a temperatura ambiente de N-[(4aR,7aS)-7a-(3-bromofenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (22,4 g, 36,69 mmol) en DCM (367 mL) se trata con di-*t*-butildicarbonato (8,81 g, 40,36 mmol) seguido por trietilamina (7,67 mL, 55,04 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora en nitrógeno. El solvente se remueve al vacío y el producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 25 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título (20,22 g, 100 %). ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br) 516/518 (M+H).

Preparación 39

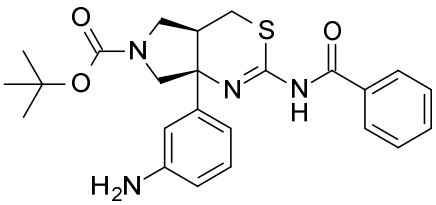
2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo



Se agrega di-*t*-butildicarbonato (1,16 g, 5,31 mmol) y trietilamina (1,01 mL, 7,25 mmol) a una solución de N-[7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (2,098 g, 4,83 mmol) en DCM (48 mL). La reacción se agita durante 1 hora a temperatura ambiente en nitrógeno. El solvente se remueve al vacío y el producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 30 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título (2,556 g, 99 %). ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br) 534/536 (M+H).

Preparación 40

(4aR,7aS)-7a-(3-aminofenil)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo

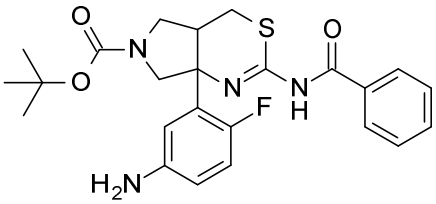


Una solución de (4aR,7aS)-2-benzamido-7a-(3-bromofenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo (5 g, 9,7 mmol) y trans-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexanodiamina (220,3 mg, 1,5 mmol) en etanol (100 mL) se trata con azida de sodio (1,30 g, 19,4 mmol). Se agrega una solución acuosa de sal de sodio de ácido L-ascórbico (0,66 M, 3,2 mL, 2,1 mmol) y agua (10 mL) y la parte superior del matraz se purga con nitrógeno. La mezcla se trata con una solución acuosa de pentahidrato de cobre(II)sulfato (0,33 M, 3,2 mL, 1,1 mmol) y la mezcla se calienta inmediatamente en una placa caliente precalentada a 80 °C durante 1,5 horas en nitrógeno. Se obtiene una mezcla homogénea tras calentar. La reacción se enfría y se agrega agua helada. La mezcla se extrae con EtOAc (3 ×). Se combinan las capas orgánicas y se secan en sulfato de sodio, se filtran y el solvente se remueve al vacío para proporcionar un producto bruto de azida. El producto bruto de azida se combina con paladio al 10 % en carbono (2 g) en etanol frío (150 mL) y la mezcla se purga utilizando vacío/nitrógeno y luego vacío/hidrógeno. La mezcla se agita a temperatura ambiente bajo 30 psi de

hidrógeno durante 2 horas. La reacción se ventila y la mezcla se filtra a través de tierra diatomea utilizando DCM para enjuagar la torta de filtro. El solvente se remueve del filtrado al vacío y el producto bruto se purifica en gel de sílice, con EtOAc al 50% en DCM para proporcionar el compuesto del título (4 g, 91 %). ES/MS (m/e): 453 (M+H).

Preparación 41

7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo



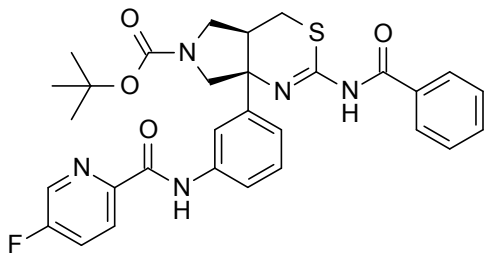
Una solución de 2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo (2,556 g, 4,8 mmol) y trans-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexanodiamina (150 mg, 1,1 mmol) en etanol (50 mL) se trata con azida de sodio (933 mg, 14,3 mmol). Se agrega una solución acuosa de sal de sodio de ácido L-ascórbico (0,66 M, 3,2 mL, 2,1 mmol) y agua (1 mL) y la parte superior del

matraz se purga con nitrógeno. La mezcla se trata con una solución acuosa de pentahidrato de cobre(II)sulfato (0,33 M, 3,2 mL, 1,1 mmol) y la mezcla se calienta inmediatamente en una placa caliente precalentada a 80 °C durante 1,5 horas en nitrógeno. Se obtiene una mezcla homogénea tras calentar. La reacción se enfría, se diluye con agua helada y la mezcla se extrae con EtOAc (3 ×). Se combinan los extractos orgánicos y se secan en sulfato de sodio, se filtran y el solvente se remueve al vacío para proporcionar el producto bruto de azida. El producto bruto de azida se combina con paladio al 10 % en carbono (1 g) en etanol frío (150 mL) y la mezcla se purga utilizando vacío/nitrógeno y luego vacío/hidrógeno. La mezcla se agita a temperatura ambiente bajo 30 psi de hidrógeno durante 5 horas. La reacción se ventila, se filtra a través de tierra diatomea y la torta de filtro se enjuaga con DCM. El solvente se remueve del filtrado al vacío y el producto bruto se purifica en gel de sílice, con EtOAc al 50% en DCM para proporcionar el compuesto del título (2,014 g, 89%). ES/MS (m/e): 471 (M+H).

Preparación 42

(4aR,7aS)-2-benzamido-7a-[3-[(5-fluoropiridina-2-carbonil)amino]fenil]-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-

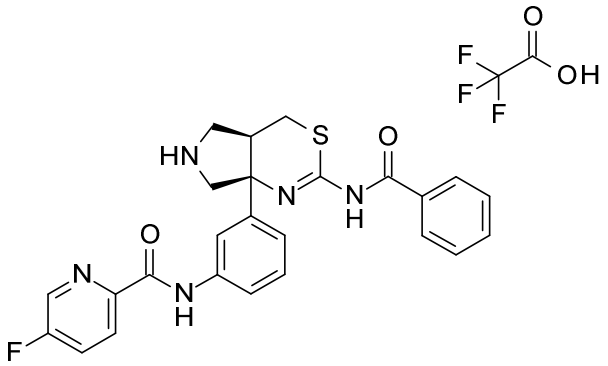
d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo



Una suspensión (4aR,7aS)-7a-(3-aminofenil)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo (93 mg, 0,21 mmol), ácido 5-fluoropiridina-2-carboxílico (31,9 mg, 0,23 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (56,7 mg, 0,41 mmol) y EDCI (40 mg, 0,21 mmol) en DCM (4 mL) que contiene dimetilformamida (1 ml) se trata con DIPEA (179,2 µL, 1,03 mmol) y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluye con DCM (5 mL) y bicarbonato de sodio acuoso saturado (15 mL). La capa orgánica se separa y se lava con cloruro de sodio acuoso saturado (10 mL), se seca en sulfato de sodio y el solvente se remueve al vacío para proporcionar el compuesto del título en bruto (105 mg, 89 %). ES/MS (m/e): 576 (M+H).

Preparación 43

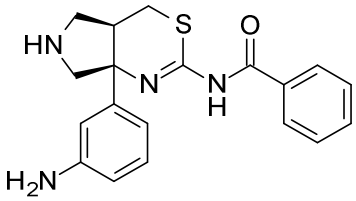
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida; ácido 2,2,2-trifluoroacético



(4aR,7aS)-2-benzamido-7a-[3-[(5-fluoropiridina-2-carbonil)amino]fenil]-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo (105 mg, 0,18 mmol) se disuelve en DCM (2 mL) y se trata con ácido trifluoroacético (500 µL, 6,6 mmol). La solución amarilla resultante se agita durante 4 horas a temperatura ambiente y el solvente se remueve al vacío para proporcionar el producto del título en bruto (190 mg, 100 %). ES/MS (m/e): 476 (M+H).

Preparación 44

N-[(4aR,7aS)-7a-(3-aminofenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida

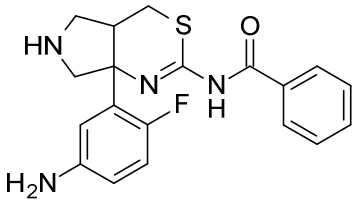


Se agrega ácido trifluoroacético (25 mL) a una solución de (4aR,7aS)-7a-(3-aminofenil)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo

(4 g, 8,84 mmol) en DCM (100 mL) y la mezcla se agita a temperatura ambiente en nitrógeno durante 4 horas. El solvente se quita al vacío y el producto bruto se purifica con una columna SCX mediante el uso de 3:1 DMC:metanol y luego 2:1 DCM:amoníaco 7 N en metanol para proporcionar el compuesto del título (2,49 g, 80 %). ES/MS (m/e): 353 (M+H).

Preparación 45

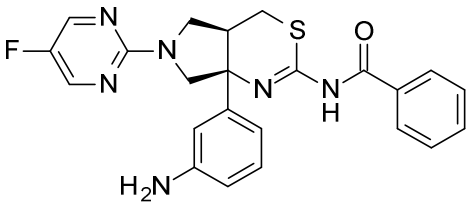
N-[7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Se agrega ácido trifluoroacético (10 mL) a una solución de 7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo (2,013 g, 4,28 mmol) en DCM (30 mL) y la mezcla se agita a temperatura ambiente en nitrógeno durante 4 horas. El solvente se quita al vacío y el producto bruto se purifica con una columna SCX mediante el uso de 3:1 DMC:metanol y luego 2:1 DCM:amoníaco 7 N en metanol para proporcionar el compuesto del título (1,555 g, 98 %). ES/MS (m/e): 371 (M+H).

Preparación 46

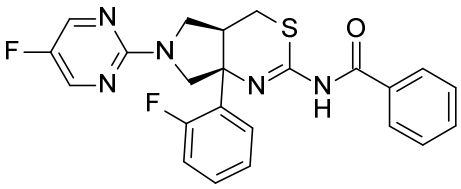
N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Una solución de N-[(4aR,7aS)-7a-(3-aminofenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (2,49 g, 7,06 mmol), 5-fluoro-2-cloropirimidina (3,74 g, 28,26 mmol) y DIPEA (6,16 mL, 35,32 mmol) en 1,4-dioxano (60 mL) se calienta a reflujo durante 4 horas en nitrógeno. La reacción se enfría, se diluye con agua y se extrae con EtOAc (3 ×). Los extractos orgánicos combinados se secan en sulfato de sodio, se filtran y el solvente se quita al vacío para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 25 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título (2,51 g, 79 %). ES/MS (m/e): 449 (M+H).

Preparación 47

N-[(4aR,7aS)-7a-(2-Fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida

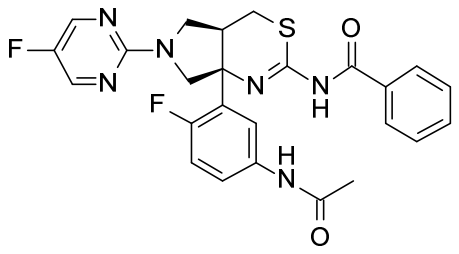


Una solución de N-[(4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (124,7

g, 256 mmol), DIPEA (67 mL), 5-fluoro-2-cloropirimidina (29,3 ml, 307 mmol) en N-metilpirrolidona (997 mL) se calienta a 100 °C durante 16 horas. La reacción se enfría a 22 °C y se vierte en agua enfriada a 10 °C (10 L), manteniendo la temperatura por debajo de 15 °C. Se recolecta un sólido de color crema clara mediante filtración y se lava con agua adicional. El sólido húmedo se disuelve en EtOAc (2 L) y se transfiere a un embudo separador. Se agrega una solución acuosa de cloruro de sodio 5 % p/p (1 L) y la capa orgánica se separa, se seca en sulfato de sodio, se filtra y el filtrado se evapora a presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de 0-40 % de EtOAc/isohexano para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (116 g, 70 %). ES/MS (m/e): 452 (M+1).

Preparación 48

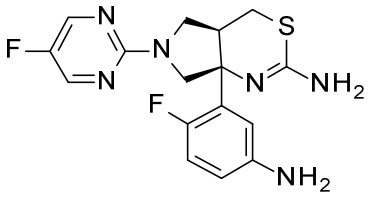
N-((4aR,7aS)-7a-(5-Acetamido-2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida



Se agrega 2-cloro-5-fluoropirimidina (28,9 g, 218 mmol) y carbonato de potasio (33,46 g, 242,1 mmol) a una solución de N-((4aR,7aS)-7a-(5-acetamido-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (50 g, 121,22 mmol) en DMF (100 mL). La mezcla se calienta a 80-85 °C durante 8 horas. La mezcla se enfría a 24 °C, se filtra y se lava con DMF (100 mL). Los sólidos se suspenden en agua (2 L) y se filtran para obtener el compuesto del título (68,5g, 98 %). LC-MS: m/z=509,2 (M+1)+, ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) ppm 1,22 (t, *J* = 7,28 Hz, 2 H) 1,92 - 2,07 (m, 6 H) 2,89 - 3,20 (m, 2 H) 3,36 - 3,44 (m, 1 H) 3,67 (t, *J*=9,54 Hz, 1 H) 3,84 (br. s., 1 H) 4,16 (br. s., 2 H) 7,23 (br. s., 2 H) 7,35 - 7,61 (m, 8 H) 7,77 (br. s., 2 H) 7,85 - 8,18 (m, 4 H) 8,48 (s, 4 H) 10,15 (br. s., 1 H) 10,46 - 10,59 (m, 1 H).

Preparación 49

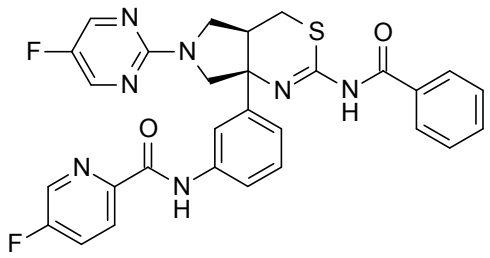
(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina



Se agrega hidróxido de litio (8,6 g, 204,9 mmol) a una solución de N-((4aR,7aS)-7a-(5-acetamido-2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (80 g, 157,3 mmol) en metanol (400 mL). La mezcla se calienta a 60-70 °C durante 4 horas. Se agrega HCl concentrado (132 g) y la mezcla se agita a 55 °C durante 18 horas. La mezcla se enfría a 30 °C y se concentra para quitar el metanol. Se agrega agua y la capa acuosa se extrae con DCM (3 ×) para obtener el compuesto del título como una solución acuosa de 920 g, de los cuales 5,6 % de la masa total es el compuesto del título que se utiliza sin purificación adicional.

Preparación 50

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida



Una solución de N-[3-[(4aR,7aS)-2-benzamido-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida; ácido 2,2,2-trifluoroacético (150 mg, 254 µmol), 5-fluoro-2-cloropirimidina (68 mg, 51 µmol) y DIPEA (98 µL, 56 µmol) se calienta en DMSO (5 mL) durante la noche a 40 °C. Se agrega más 5-fluoro-2-cloropirimidina (68 mg, 51 µmol) y DIPEA (98 µL, 56 µmol) y la mezcla se calienta durante la noche a 50 °C. Se agrega más 5-fluoro-2-cloropirimidina (68 mg, 51 µmol) y DIPEA (98 µL, 56 µmol) y la mezcla se calienta durante la noche a 50 °C una tercera noche. La reacción se enfría, se diluye con carbonato de sodio acuoso saturado (50 mL) para proporcionar una suspensión que se filtra y seca en un horno de vacío a 50 °C durante 4 horas para proporcionar el compuesto del título (60 mg, 41 %). ES/MS (m/e): 449 (M+H).

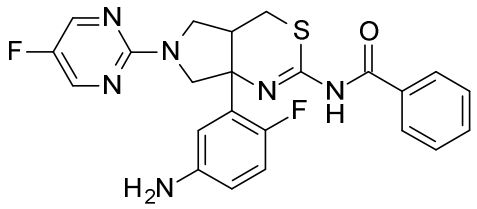
Preparación alternativa 50

Se combina N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminofenil)-6-(5-

fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (282 mg, 628.73 µmol) y ácido5-fluoropiridina-2-carboxílico (106,46 mg, 754,47 µmol) en DCM (3 mL) y dimetilformamida (0,5 mL). Se agrega HOBT (112,70 mg, 817,35 µmol) y luego EDCI (159,07 mg, 817,35 µmol) y la mezcla resultante se agita durante 5 horas a temperatura ambiente en nitrógeno. La mezcla de reacción se diluye con agua y el pH se ajusta con NaOH 1 N a ~12. La mezcla se extrae con EtOAc (3 ×). Los extractos orgánicos se combinan, se secan en sulfato de sodio, se filtran y el solvente se quita al vacío para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 20 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título (327 mg, 91 %). ES/MS (m/e): 571 (M+H).

Preparación 51

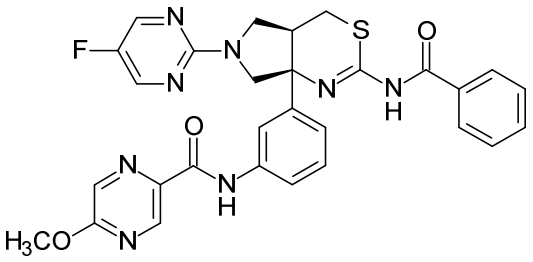
N-[7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Una solución de N-[7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (705 mg, 1,90 mmol), 5-fluoro-2-cloropirimidina (1,01 g, 7,61 mmol) y DIPEA (1,66 mL, 9,52 mmol) se calienta en 1,4-dioxano (20 mL) a reflujo durante 4 horas en nitrógeno. La reacción se enfría, se diluye con agua y se extrae con EtOAc (3 ×). Las capas orgánicas se combinan, se secan en sulfato de sodio, se filtran y el solvente se quita al vacío para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 25 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título (590 mg, 66 %). ES/MS (m/e): 467 (M+H).

Preparación 52

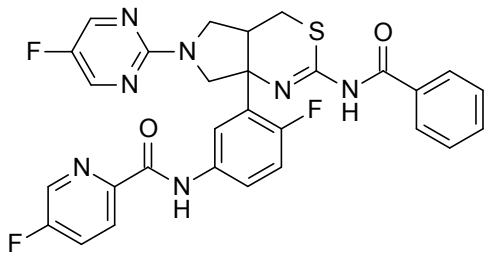
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida



Se combina N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (400 mg, 891,81 µmol) y ácido 5-metoxipirazina-2-carboxílico (165 mg, 1,07 mmol) en DCM (4 mL) y dimetilformamida (0,5 mL). Se agrega HOBt (160 mg, 1,16 mmol) y luego EDCI (226 mg, 1,16 mmol) y la mezcla resultante se agita durante 5 horas a temperatura ambiente en nitrógeno. La mezcla de reacción se diluye con agua y el pH se ajusta a ~12 con NaOH 1 N. La mezcla se extrae con EtOAc (3 ×). Los extractos orgánicos combinados se secan en sulfato de sodio, se filtran y el solvente se remueve al vacío. El producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 20 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título (482 mg, 92 %). ES/MS (m/e): 585 (M+H).

Preparación 53

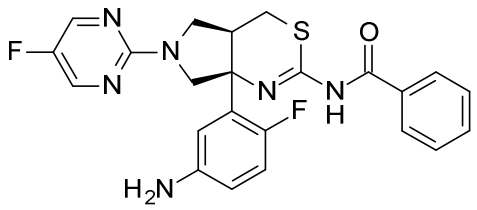
N-[3-[2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida



Se combina N-[7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (302 mg, 647 µmol) y ácido5-fluoropiridina-2-carboxílico (110 mg, 777 µmol) en DCM (3 mL) y dimetilformamida (0,5 mL). Se agrega HOBT (116 mg, 842 µmol) y luego EDCI (164 mg, 842 µmol) y la mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente en nitrógeno. La mezcla de reacción se diluye con agua y el pH se ajusta con NaOH 1 N a ~12 y luego se extrae con EtOAc (3 ×). Las capas orgánicas se combinan y se filtran para recolectar el material insoluble. Los sólidos se lavan con agua y EtOAc y se secan al vacío para proporcionar el compuesto del título. La capa orgánica del filtrado se seca en sulfato de sodio, se filtra y el solvente se quita al vacío. El residuo se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 20 minutos de EtOAc de 5 % a 100 % en hexanos para proporcionar el compuesto del título con un rendimiento combinado (275 mg, 72 %). ES/MS (m/e): 590 (M+H).

Preparación 54

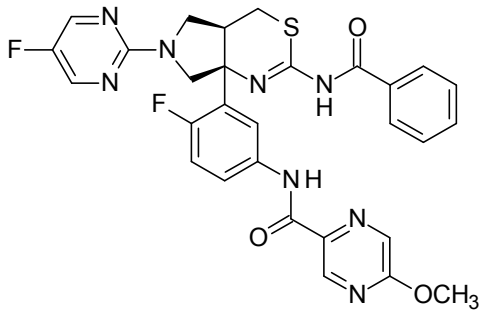
N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida, (isómero 1)



Se purifica N-[7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida racémica (1,694 g, 3,63 mmol) mediante HPLC quiral (columna: Chiralcel OJ, 8 x 35 cm; eluyente: metanol al 90 % (dimetiletilamina al 0,2 %) y acetonitrilo al 10 %; flujo 400 mL/min a UV 280 nm). Análisis del primer isómero de elusión (columna: Chiralcel OJ-H, 0,46 x 15 cm; eluyente: 10:90 acetonitrilo:metanol (con dimetiletilamina al 0,2 %); flujo: 0,6 mL/min a UV 280 nm) confirma el enantiómero enriquecido de forma enantiomérica (99% ee) con R_t = 6,70 minutos, (723 mg, 43 %). ES/MS (m/e): 467 (M+H).

Preparación 55

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida, (isómero 1)

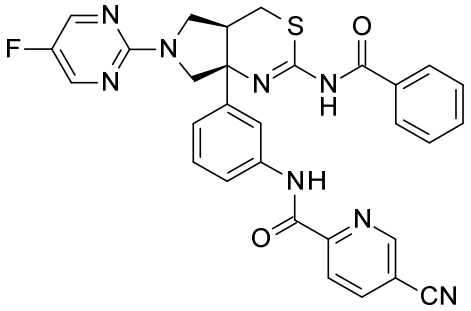


N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0,361 g, 0,77 mmol, isómero 1) se disuelve en una mezcla de DCM (4 mL) y DMF (0,5 mL). Se agrega ácido 5-metoxipirazina-2-carboxílico (240 mg, 1,55 mmol), HOBT (210 mg, 1,55 mmol) y EDCI (300 mg, 1,55 mmol) a la mezcla, y la mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente. La solución de reacción se agrega directamente a una columna de carga de gel de sílice de 12 g y se purifica utilizando una columna de gel de sílice de 40 g y eluyendo con un gradiente de 0-100 % de EtOAc/hexanos. El producto se disuelve en EtOAc (200 mL), se lava con NaOH 1 N (2 × 50 mL) y con salmuera (1 × 50 mL). La purificación con

gel de sílice se repite tal como se describió anteriormente para proporcionar el compuesto del título (350 mg, 74 %). ES/MS (m/e): 603 (M+H).

Preparación 56

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-ciano-piridina-2-carboxamida

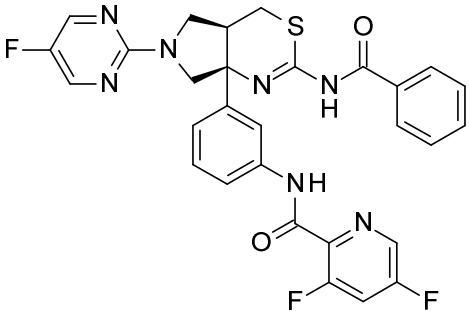


Se disuelve N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0,30 g, 0,67 mmol) en DCM (10 mL) y se agrega ácido 5-cianopiridina-2-carboxílico (129 mg, 0,87 mmol), HOBt (185 mg, 1,34 mmol) y EDCI (169 mg, 0,87 mmol). Se agrega DIPEA (0,35 mL, 2 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche. El material se purifica directamente con cromatografía en gel de sílice,

eluyendo con un gradiente de 0-100 % de EtOAc / hexanos para proporcionar el compuesto del título (360 mg, 88 %). ES/MS (m/e): 579 (M+H).

Preparación 57

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-3,5-difluoro-piridina-2-carboxamida

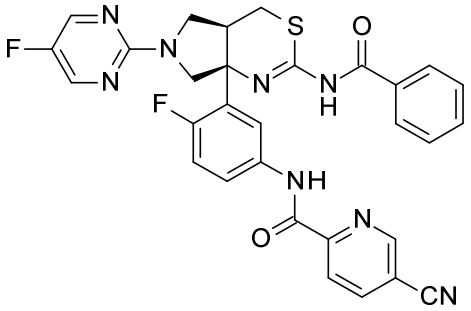


Se disuelve N-[(4aR,7aS)-7a-(3-Aminofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0,30 g, 0,67 mmol) en DCM (10 mL) y se agrega ácido 3,5-difluoropiridina-2-carboxílico (138 mg, 0,87 mmol), HOBT (185 mg, 1,34 mmol) y EDCI (169 mg, 0,87 mmol). Se agrega Dipea (0,35 mL, 2 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se purifica directamente con cromatografía en gel de sílice,

eluyendo con un gradiente de 0-100 % de EtOAc / hexanos para proporcionar el compuesto del título (330 mg, 84 %). ES/MS (m/e): 590 (M+H).

Preparación 58

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridina-2-carboxamida, (isómero 1)

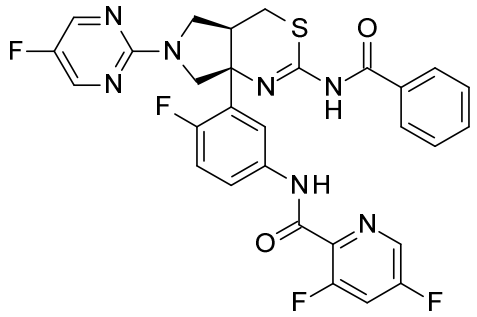


N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0,180 g, 0,39 mmol, isómero 1) se disuelve en una mezcla de DCM (2 mL) y DMF (0,25 mL). Se agrega ácido 5-cianopiridina-2-carboxílico (114 mg, 0,77 mmol), HOBt (106 mg, 0,77 mmol) y EDCI (150 mg, 0,77 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluye con agua (10 mL), EtOAc (10 mL) y se

agrega a una solución de NaOH 1 N (100 mL). La mezcla se extrae con EtOAc (2 × 100 mL) y las capas orgánicas se combinan y se lavan con salmuera. La capa orgánica se seca en $MgSO_4$, se filtra y se concentra. El residuo se purifica con cromatografía en gel de sílice utilizando un gradiente de 0-100 % de EtOAc / hexanos para proporcionar el compuesto del título (133 mg, 57 %). ES/MS (m/e): 597 (M+H).

Preparación 59

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-3,5-difluoro-piridina-2-carboxamida, (isómero 1)

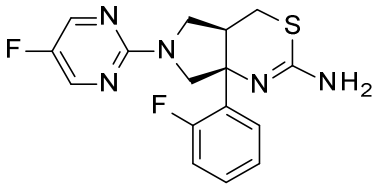


N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0,180 g, 0,39 mmol, isómero 1) se disuelve en una mezcla de DCM (2 mL) y DMF (0,25 mL). Se

agrega ácido 5-cianopiridina-2-carboxílico (114 mg, 0,77 mmol), HOBt (106 mg, 0,77 mmol) y EDCI (150 mg, 0,77 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluye con agua (10 mL) y EtOAc (10 mL), y luego se vierte en una solución de NaOH 1 N (100 mL). La mezcla se extrae con EtOAc (2 × 100 mL) y los extractos orgánicos se combinan y se lavan con salmuera. Las capas orgánicas se secan en $MgSO_4$, se filtran y se concentran. El residuo se purifica mediante cromatografía en gel de sílice utilizando un gradiente de 0-100 % de EtOAc / hexanos para proporcionar el compuesto del título (190 mg, 80 %). ES/MS (m/e): 608 (M+H).

Preparación 60

(4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina

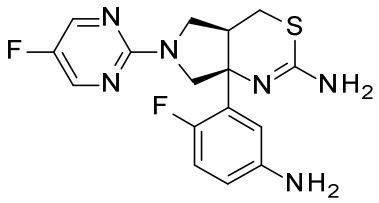


Se agrega hidróxido de litio (9,26 g, 386 mmol) a una mezcla de N-[(4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-

il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (158,6 g, 351,6 mmol) en metanol (1,6 L). La mezcla se calienta a 70 °C durante 4 horas y luego se enfría a 22 °C. La mezcla de reacción se evapora al vacío hasta obtener un residuo amarillo. El residuo se particiona en agua (1 L) y EtOAc (750 mL). Se agrega HCl (solución acuosa 5 M) para ajustar el pH a 1. Se separa la capa acuosa y se lava la capa orgánica con EtOAc (2 × 200 mL). El pH de la capa acuosa se ajusta con solución acuosa de hidróxido de sodio al 50 % p/p a pH=10 y se extrae con EtOAc (3 × 1 L). Se combinan los extractos orgánicos, se secan en sulfato de sodio, se filtran y se evaporan a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (133,3 g, 99 %, que contiene EtOAc residual al 12 %). ES/MS (m/e): 348 (M+1).

Preparación 61

(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina

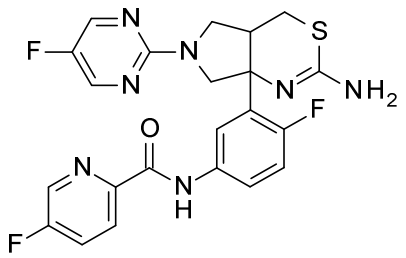


Se agrega ácido sulfúrico (33,4 ml, 626,6 mmol) a una solución de (4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (45,8 g, 125,3 mmol) en ácido trifluoroacético (626 mL). La mezcla se enfría a 0 °C y se agita durante 20 minutos. Se agrega ácido nítrico fumante (6,2 mL, 144,1 mmol) y la mezcla de reacción se calienta a 22 °C y se agita durante 3 horas. La mezcla de reacción se evapora y se agrega MTBE (250 mL) y se evapora dos veces. El residuo se seca al vacío hasta un peso constante y luego se disuelve en agua (147 mL) y etanol (885 mL) y se desgasifica con nitrógeno burbujeante durante 15 minutos. La solución se transfiere a un reactor de presión y se agrega pasta de Pd/C al 10 % tipo 87L (6,6 g, 6,27 mmol). La mezcla se diluye con etanol adicional (700 mL) y se presuriza con hidrógeno a 80 psi durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtra y luego se agrega una segunda carga de catalizador de pasta de Pd/C al 10 % tipo 87L (6,6 g, 6,27 mmol) y la mezcla se presuriza a 80 psi y se agita durante 3 días en el reactor de presión. La mezcla de reacción se purga con nitrógeno y se filtra mediante tierra diatomea. El filtrado se evapora y el residuo se particiona entre agua (200 ml) y EtOAc (200 ml). La capa acuosa se separa, se enfría a 5 °C y se neutraliza con

hidróxido de amonio al 15 % p/p. La capa acuosa se extrae con EtOAc (3 × 150 mL). Los orgánicos se combinan, se secan en sulfato de sodio, se filtran y se evaporan a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido marrón pálido (47.7 g, 99 % que contiene EtOAc residual). ES/MS (m/e): 363 (M+1).

Ejemplo A

N-[3-[2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida



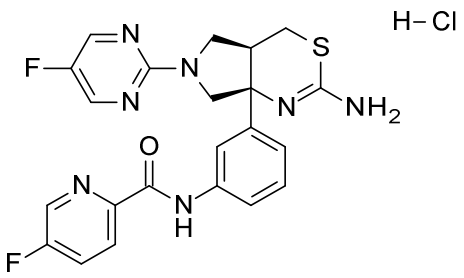
Una mezcla de N-[3-[2-benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida (293 mg, 497 µmol), clorhidrato de O-metilhidroxilamina (430 mg, 4,97 mmol) y piridina (402 µL, 4,97 mmol) se calienta en etanol (13 mL) a 70 °C en un matraz cerrado durante 2,5 horas. Se agrega DMSO

(3 mL) y la mezcla se calienta a 70 °C durante la noche. Se agrega DMSO adicional (10 mL) y se continúa calentando a 70 °C durante 4 horas. Se agrega más clorhidrato de O-metilhidroxilamina (208 mg, 2,48 mmol) y piridina (201 µL, 2,48 mmol) y la mezcla se calienta a 60 °C durante 3 horas y la mezcla se agita durante 3 días a temperatura ambiente. En un matraz separado, una mezcla de N-[3-[2-benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida (276 mg, 468 µmol), clorhidrato de O-metilhidroxilamina (405 mg, 4,68 mmol) y piridina (478 µL, 4,68 mmol) se calienta en etanol (15 mL) y DMSO (4 mL) a 70 °C en un matraz cerrado durante la noche. Se agrega DMSO adicional (10 mL) y se continúa calentando a 70 °C durante 4 horas. Se agrega más clorhidrato de O-metilhidroxilamina (195 mg, 2,34 mmol) y piridina (189 µL, 2,34 mmol) y se continúa calentando a 70 °C durante 3 horas seguido por agitación de la mezcla durante 3 días a temperatura ambiente. Se combinan las dos mezclas de reacción y la mayoría del solvente se extrae al vacío. El producto bruto se purifica en una columna de SCX utilizando DCM:metanol 3:1 y luego DCM:amoníaco 7 N 2:1 en metanol. El producto bruto se purifica adicionalmente en gel de sílice, con un gradiente de 20 minutos de metanol de amoníaco 7 N de 0,5 % a 10 % en DCM para proporcionar el

compuesto del título (451 mg, 96 %). ES/MS (m/e): 486 (M+H).

Ejemplo 1

Clorhidrato de N-{3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]fenil}-5-fluoropiridina-2-carboxamida

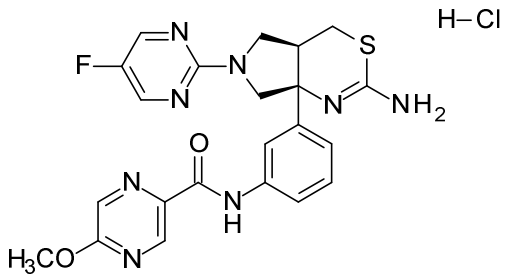


Una mezcla de N-[3-[(4aR,7aS)-2-benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida (320 mg, 560 µmol), clorhidrato de O-metilhidroxilamina (485 mg, 5,60 mmol) y piridina (453 µL, 5,60 mmol) en etanol (15 mL) se calienta a 65 °C en un recipiente cerrado durante cinco horas. La reacción se enfría y el solvente se quita al vacío. El producto bruto se purifica en gel de sílice con un gradiente de 30 minutos de 0,5 % a 10 % de gradiente de DCM de metanol en amoníaco 7 N para proporcionar N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-

tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida (219 mg, 84 %). Este material se disuelve en DCM (1 mL) y se agrega metanol (0,5 mL) y cloruro de hidrógeno 1 M en éter dietílico (0,47 mL, 470 µmol). El solvente se quita al vacío para proporcionar el compuesto del título (228 mg, 81 %). ES/MS (m/e): 468 (M+H).

Ejemplo 2

Clorhidrato de N-{3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]fenil}-5-metoxipirazina-2-carboxamida

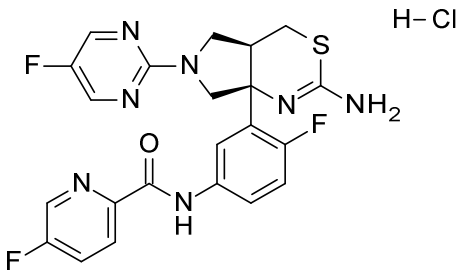


Una mezcla de N-[3-[(4aR,7aS)-2-benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (479 mg, 819 µmol), clorhidrato de O-metilhidroxilamina (709 mg, 8,19 mmol) y piridina (663 µL, 8,19 mmol) en etanol (20 mL) se calienta a 50 °C en un matraz cerrado durante la

noche. Se agrega DMSO (4 mL) y la mezcla se calienta a 70 °C durante 4 horas para obtener una solución. La reacción se enfría y la mayoría del solvente se quita al vacío. Se agrega agua y el pH se ajusta a ~12 con hidróxido de sodio 1 N. La mezcla se extrae con EtOAc (5 ×). Los extractos orgánicos combinados se secan en sulfato de sodio, se filtran y el solvente se remueve al vacío. El producto bruto se purifica en gel de sílice, con un gradiente de 30 minutos de 0,5 % a 10 % de gradiente de DCM de metanol en amoníaco 7 N. La mezcla se purifica nuevamente en una columna de SCX utilizando DCM:metanol 3:1 y luego DCM:amoníaco 7 N 2:1 en metanol para quitar el DMSO residual. La mezcla se purifica una última vez en gel de sílice con un gradiente de 20 minutos de 0,5 % a 10 % de metanol de amoníaco 7 N en DCM para proporcionar N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida. Este material se disuelve en DCM (1 mL) y se agrega metanol (0,5 mL) y cloruro de hidrógeno 1 M en éter dietílico (0,66 mL, 660 µmol). El solvente se quita al vacío para proporcionar el compuesto del título (329 mg, 78%). ES/MS (m/e): 481 (M+H).

Ejemplo 3

Clorhidrato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida.

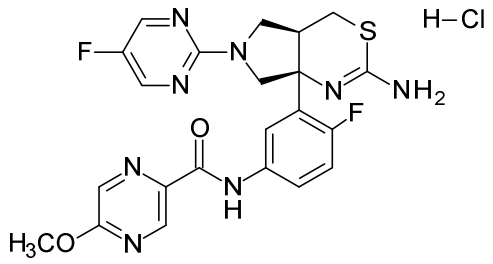


Se purifica N-[3-[2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-fluoro-piridina-2-carboxamida racémica (451 mg, 929 µmol) mediante SFC (columna: Chiralcel OD-H (5 um), 2,1 x 25 cm; eluyente: metanol al 40 % (isopropilamina al 0,2 %) en CO_2; flujo 70 mL/min a UV 225 nm). Análisis quiral del primer isómero de elución: Columna: Chiralcel OD-H (5 µm), 4,6 × 150 mm; eluyente: etanol al 40% (isopropilamina al 0,2 %) en CO_2; flujo 5 mL/min a UV 225 nm confirma el enantiómero enriquecido de forma enantiomérica (99 % ee) con R_t = 1,01 minutos, (175 mg, 360 µmol). Este material (base libre, isómero 1) se disuelve en DCM (1 mL) y se agrega metanol (0,5 mL) y cloruro de hidrógeno 1 M en éter dietílico (0,36 mL, 360 µmol). El solvente se quita al vacío para proporcionar el

compuesto del título (183 mg, 38 %). ES/MS (m/e): 486 (M+H).

Ejemplo 4

Clorhidrato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.



Se disuelve N-[3-[(4aR,7aS)-2-benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropyirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazin-2-carboxamida (0,350 g, 0,58 mmol, isómero 1) en THF (2 mL) y luego se agrega metanol (4 mL) y etanol (4 mL). Se agrega clorhidrato de O-metilhidroxilamina (495 mg, 5,81 mmol) y piridina (470 µL, 5,81 mmol)a la mezcla y la reacción se calienta hasta 50 °C y se agita durante la noche. Se agrega gel de sílice (~10 g) a la reacción y la mezcla se concentra. La muestra, que se seca en gel de sílice, se carga a un cartucho vacío y se purifica eluyendo con un gradiente al 0-10 % de metanol de amoníaco 7

N en DCM. EL producto se purifica una segunda vez en una columna de SCX utilizando DCM:metanol 3:1 y luego DCM:amoníaco 7 N 2:1 en metanol. El producto se purifica por última vez en gel de sílice con un gradiente al 0 % s 10% de metanol de amoníaco 7 N en DCM para proporcionar la base libre del compuesto del título. Este material se disuelve en DCM (5 mL) y se agrega cloruro de hidrógeno 1 M y éter dietílico (0,20 mL, 660 µmol). El solvente se quita al vacío para proporcionar el compuesto del título (71 mg, 23 %). ES/MS (m/e): 498 (M+H).

Ejemplo 5

Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (hidratada)

Se agrega acetonitrilo (500 mL) a dimetilformamida (19,2 mL, 248,9 mmol). Se agrega cloruro de oxalilo (39,3 g, 309,63 mmol) seguido de ácido 5-metoxipirazin-2-carboxílico (46,0g, 298,4 mmol) a la solución de dimetilformamida. En un matraz separado, se agrega la solución acuosa de (4aR,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-

4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (56,8 g, 156,75 mmol) a acetonitrilo (500 mL) y el pH se ajusta a 9 con hidróxido de amoníaco (95 mL). Esta mezcla luego se calienta hasta 50 -55 °C. La solución de cloruro de ácido se agrega por goteo y la mezcla se agita durante 3 horas. El pH se ajusta a 8-9 con hidróxido de amonio. El precipitado se filtra, se lava con agua y se seca para obtener el compuesto del título (123 g). El sólido se suspende en acetona (250 mL) durante 1,5 horas y se filtra. La torta húmeda se lava con acetona para obtener el compuesto del título (110 g con 90,5 % de pureza mediante HPLC). Se agrega THF (1 L) y carbono activado (9 g) al sólido y la mezcla se calienta a reflujo durante la noche. La mezcla se filtra a través de tierra diatomea y se lava con THF (150 mL). La solución orgánica se concentra a 10 volúmenes y se calienta a 60 °C. Se agrega agua (430 mL) y la mezcla se agita a 60 °C durante 8 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se agita durante 10 horas. El sólido resultante se filtra, se lava con THF/agua (7:6) y se seca para proporcionar el compuesto del título (69 g, 88 %). LC-MS: m/z=499 (M+1), pureza: 98,3 % ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) ppm 2,99 - 3,07 (m, 2 H) 3,07 - 3,14 (m, 1 H) 3,58 - 3,67 (m, 1 H) 3,68 - 3,76 (m, 1 H) 3,76 - 3,84 (m, 1 H) 4,02 (s, 3 H) 4,07 (d, *J*=10,92 Hz, 1 H) 6,08 (s, 2 H) 7,19 (dd, *J*=11,98,

8,72 Hz, 1 H) 7,78 - 7,89 (m, 2 H) 8,41 (s, 1 H) 8,44 (s, 2 H) 8,88 (s, 1 H) 10,60 (s, 1 H).

Difracción de Rayos X en polvo (XRD)

Los patrones de XRD de sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro de rayos X en polvo Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente CuKa λ = 1,54060 Å) y un detector Vantec, que funciona a 35 kV y 50 mA. La muestra se escanea entre 4 y 40° en 2θ, con un tamaño de etapa de 0,009° en 2θ y una velocidad de escaneo de 0,5 segundos/etapa, y con hendiduras de divergencia de 0,6 mm, antidispersión fijas de 5,28 y detectoras de 9,5 mm. El polvo seco se empaqueta en un portamuestras de cuarzo y se obtiene una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. Los patrones de difracción en forma de cristal se recolectan a temperatura ambiente y humedad relativa. Se sabe en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma de cristal, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como el hábito y la morfología del cristal. Cuando los efectos de la orientación preferida se encuentran presentes, se alteran las intensidades de los picos, pero las posiciones características de los picos del polimorfo no cambian. Véase,

por ejemplo, la Farmacopea de Estados Unidos #23, Formulario Nacional #18, páginas 1843-1844, 1995. Además, también se conoce en la técnica de la cristalografía que para una forma de cristal dada, las posiciones angulares de los picos pueden variar levemente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o humedad a la que se analiza la muestra, desplazamiento de la muestra o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad de la posición de los picos de ± 0,2 en 2θ tomará en cuenta estas variaciones sin dificultar la identificación inequívoca de la forma de cristal indicada. La confirmación de una forma de cristal se puede basar en cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de ° 2θ), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de las formas cristalinas, recolectados a temperatura ambiente y humedad relativa, se ajustaron en función de los picos de la norma 675 de NIST a 8,853 y 26,774 grados 2-theta.

Una muestra preparada de la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida se caracteriza por un patrón XRD utilizando radiación CuKa con picos de difracción

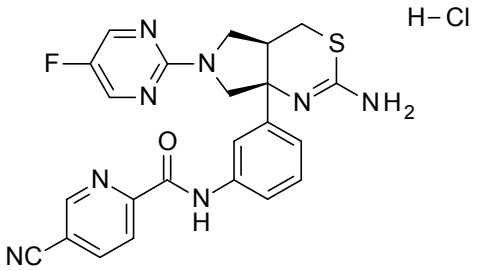
(valores 2-theta) tal como se describe en la Tabla 2 a continuación. Específicamente, el patrón contiene un pico en 11,8°, con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste en 18,6°, 19,3° y 26,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 2: Picos de difracción de rayos X en polvo de la Forma cristalina 2 del Ejemplo 5.

Pico	**Ángulo** (2-Theta °) +/- 0.2°	**Intensidad relativa (% de pico más intenso)**
1	11,8	100,0
2	18,6	71,4
3	19,3	45,5
4	26,7	41,9
5	20,6	27,3
6	9,0	19,0
7	24,8	18,5
8	22,4	15,5
9	31,9	14,3
10	10,6	11,2

Ejemplo 6

Clorhidrato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-ciano-piridina-2-carboxamida

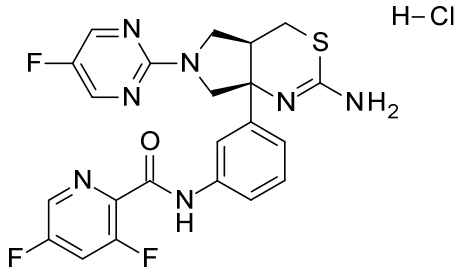


Se disuelve N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-5-ciano-piridina-2-carboxamida (360 mg, 0,59 mmol) en etanol (10 mL) y DCM (2 mL). Se agrega clorhidrato de O-Metilhidroxilamina (504 mg, 5,91 mmol) y piridina (478 µL, 5,91 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante el fin de semana (70 horas). La reacción se calienta a 60 °C y se agita durante 24 horas. La reacción se concentra para proporcionar el producto bruto y se purifica mediante cromatografía en gel de sílice utilizando un gradiente de 0-10 % de metanol de amoníaco 7 N en DCM para proporcionar la base libre del compuesto del título. Este material se disuelve en DCM (5 mL) y se agrega cloruro de hidrógeno 1 M y

éter dietílico (0,54 mL, 540 µmol). El solvente se quita al vacío para proporcionar el compuesto del título (240 mg, 75 %). ES/MS (m/e): 475 (M+H).

Ejemplo 7

Clorhidrato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-3,5-difluoro-piridina-2-carboxamida

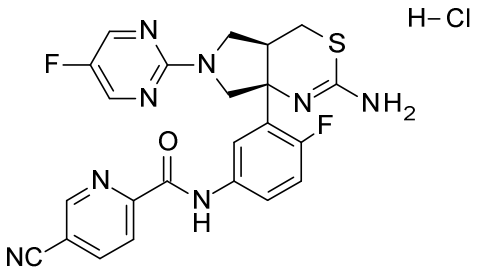


Se disuelve N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]fenil]-3,5-difluoro-piridina-2-carboxamida (330 mg, 0,53 mmol) en THF (10 mL) y se diluye con etanol (10 mL). Se agrega clorhidrato de O-Metilhidroxilamina (453 mg, 5,32 mmol) y piridina (430 µL, 5,91 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante el fin de semana (70 horas). La reacción se calienta a 60 °C y se agita durante 24 horas. La mezcla se concentra en gel de sílice (~10 g) y se purifica

mediante cromatografía en gel de sílice utilizando un gradiente de 0-10 % de metanol de amoníaco 7 N en DCM para proporcionar la base libre del compuesto del título. Este material se disuelve en DCM (5 mL) y se agrega cloruro de hidrógeno 1 M y éter dietílico (0,49 mL, 490 µmol). El solvente se quita al vacío para proporcionar el compuesto del título (159 mg, 54 %). ES/MS (m/e): 486(M+H).

Ejemplo 8

Clorhidrato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridina-2-carboxamida

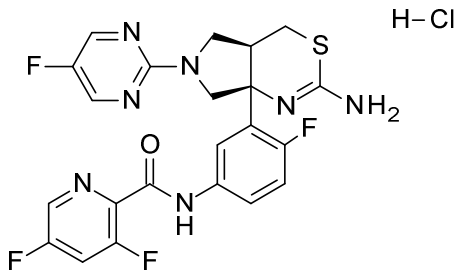


Se disuelve N-[3-[(4aR,7aS)-2-benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropyirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridina-2-carboxamida (133 mg, 0,22 mmol, isómero 1) en THF (1 mL) y se diluye con metanol (3 mL) y etanol (3 mL). Se agrega clorhidrato de O-

Metilhidroxilamina (190 mg, 2,2 mmol) y piridina (180 µL, 2,2 mmol). La reacción se calienta a 50 °C y se agita durante la noche. La mezcla se concentra en gel de sílice (~10 g) y se purifica mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de 0-10 % de metanol de amoníaco 7 N en DCM. El material se purifica una segunda vez en una columna de SCX utilizando DCM:metanol 3:1 y luego DCM:amoníaco 7 N 2:1 en metanol. La mezcla se purifica por última vez en gel de sílice con un gradiente al 0 % a 10% de metanol de amoníaco 7 N en DCM para proporcionar la base libre del compuesto del título. Este material se disuelve en DCM (5 mL) y se agrega cloruro de hidrógeno 1 M y éter dietílico (0,27 mL, 270 µmol). El solvente se quita al vacío para proporcionar el compuesto del título (114 mg, 97 %). ES/MS (m/e): 493 (M+H).

Ejemplo 9

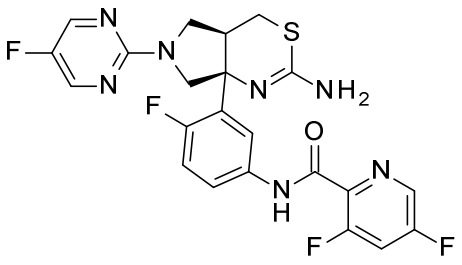
Clorhidrato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-3,5-difluoro-piridina-2-carboxamida



Se disuelve N-[3-[(4aR,7aS)-2-benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropyirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-3,5-difluoro-piridina-2-carboxamida (190 mg, 0,31 mmol, isómero 1) en THF (1 mL) y se diluye con metanol (3 mL) y etanol (3 mL). Se agrega clorhidrato de O-Metilhidroxilamina (267 mg, 3,1 mmol) y piridina (253 µL, 3,1 mmol) y la reacción se calienta hasta 50 °C y se agita durante la noche. La reacción se purifica en una columna de SCX utilizando DCM:metanol 3:1 y luego DCM:amoníaco 7 N 2:1 en metanol. El material se purifica por última vez en gel de sílice con un gradiente al 0 % a 10 % de amoníaco 7 N en metanol en DCM para proporcionar la base libre del compuesto del título. Este material se disuelve en DCM (5 mL) y se agrega cloruro de hidrógeno 1 M y éter dietílico (0,20 mL, 200 µmol). El solvente se quita al vacío para proporcionar el compuesto del título (101 mg, 60 %). ES/MS (m/e): 504 (M+H).

Ejemplo 10

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-3,5-difluoro-piridina-2-carboxamida



Se agregó cloruro de oxalilo (10,5 ml, 136,4 mmol) a una solución de ácido 3,5-difluoropicolínico (19,9 g, 125 mmol) en acetonitrilo (617 mL) y dimetilformamida (10,5 mL). Luego de agitar durante 30 minutos, la solución se agrega a una solución preparada recientemente de (4aR,7aS)-7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (41,1 g, 113 mmol) en una mezcla de etanol (823 mL) / agua (823 mL) calentada previamente a 50 °C. La reacción se mantiene a 50 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfría a 22 °C y el solvente se evapora. La solución acuosa se diluye con DCM (1 L) y el pH se ajusta con hidróxido de sodio 2 M a pH=11. Se separa la capa orgánica y se lava la capa acuosa con DCM adicional (2 × 400 mL). Se combinan los extractos orgánicos, se secan en sulfato de sodio, se filtran y se evaporan hasta

la sequedad. El material bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de metanol amoniatado 2 N / DCM con DCM al 0-10 % para proporcionar el compuesto del título como un sólido blancuzco (45 g, 78 %). ES/MS (m/e): 504 (M+1).

Procedimientos de ensayo *in vitro*:

Para los ensayos celulares y enzimáticos *in vitro*, los compuestos de las pruebas se preparan en DMSO para componer una solución madre 10 mM. La solución madre se diluye en serie en DMSO para obtener una curva de dilución de diez puntos, donde las concentraciones finales del compuesto se encuentran en el intervalo de 10 mM a 0,05 nM en una placa de 96 pocillos de fondo redondo, antes de llevar a cabo ensayos de célula completa y enzimáticos *in vitro*.

Ensayos de inhibición de proteasa *in vitro*

Expresión de BACE1 humana

Se clona la BACE1 humana (número de acceso: AF190725) a partir del ADNc cerebral total mediante RT-PCR. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias

de aminoácidos n.° 1 a 460 se insertan en el ADNc que codifica el polipéptido de IgG_1 (Fc) humana (ver Vasser, et ál., *Science*, **286**, 735-741 (1999)). Esta proteína de fusión de BACE1(1-460)y Fc humana, llamada *hu*BACE1:Fc, se construye en el vector pJB02. La BACE1(1-460):Fc humana (*hu*BACE1:Fc)se expresa de manera transitoria en las células HEK293. Se mezclan 250 µg de ADNc de cada construcción con Fugene 6 y se agregan a 1 litro de células HEK293. Cuatro días después de la transfección, se cultivan los medios afectados para purificación.

Purificación de *hu*BACE1:Fc.

*hu*BACE1:Fc se purifica mediante cromatografía de proteína A. La enzima se almacena a −80 °C en alícuotas pequeñas.

Ensayo de FRET de BACE1

Las diluciones en serie de los compuestos de prueba se preparan tal como se describió anteriormente. Los compuestos se diluyen adicionalmente 20× en amortiguador de KH_2PO_4. Se agregan diez µL de cada dilución a cada pocillo en la fila A a H de una placa negra de unión baja a proteínas que contiene la mezcla de reacción (25 µL de KH_2PO_4 50 mM, pH 4,6, TRITON®

X-100 1 mM, 1 mg/mL de albúmina de suero bovino y sustrato de FRET 15 µM) (*véase* Yang, et. ál., *J. Neurochemistry*, **91**(6) 1249-59 (2004)). El contenido se mezcla bien en un agitador de placas durante 10 minutos. Se agregan quince µL de BACE1(1-460):Fc humana doscientos pM (*Véase* Vasser, et ál., *Science*, **286**, 735-741 (1999)) en el amortiguador de KH_2PO_4 a la placa que contiene el sustrato y los compuestos de muestra para iniciar la reacción. Se registra la RFU de la mezcla en el momento 0 con una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm, después de un mezclado breve en un agitador de placas. La placa de reacción se cubre con papel aluminio y se mantiene en un horno humidificado oscuro a temperatura ambiente durante 16 a 24 horas. Se registra la RFU al finalizar la incubación con las mismas configuraciones de excitación y emisión utilizadas en el momento 0. La diferencia de la RFU en el momento 0 y al finalizar la incubación representa la actividad de BACE1 en el tratamiento del compuesto. Las diferencias de RFU se grafican en función de la concentración del inhibidor y se ajusta una curva con una ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores de EC_{50} e IC_{50}. (*Véase* Sinha, *et ál.*, *Nature*, **402**, 537-540 (2000)).

Los siguientes compuestos ejemplificados se analizan

esencialmente tal como se describió anteriormente y presentaron la actividad que figura a continuación para BACE1:

Tabla 3

N.° de ejemplo:	IC_{50} de BACE1 (nM)
1	0,610 (± 0,0948 n=8)
2	0,482 (± 0,0580 n=6)
3	0,603 (± 0,0815 n=7)
4	0,615 (± 0,101 n=5)
6	0,450 (± 0,0911 n=4)
7	0,739 (± 0,181 n=7)
8	0,358
9	0,780 (± 0,120 n=6)

Media ± SEM; SEM= error estándar de la media

Estos datos demuestran que los compuestos de la Tabla 3 inhiben la actividad de la enzima BACE1 recombinante purificada *in vitro*.

Ensayos de célula completa para la medición de la inhibición de la actividad de beta-secretasa

Ensayo de célula completa HEK293we

El ensayo de célula completa de rutina para la medición de la inhibición de actividad de beta-secretasa utiliza la línea celular del riñón embrionario humano HEK293p (n.° de acceso de ATCC CRL-1573) que expresa de manera estable el ADNc humano APP751 que contiene la mutación doble de origen natural Lys651Met652 a Asn651Leu652, denominada comúnmente mutación sueca (marcada HEK293Swe) y ha demostrado sobreproducir Abeta (Citron, et ál., *Nature,* **360**, 672-674 (1992)). Los ensayos de reducción de Abeta *in vitro* se han descrito en la bibliografía (ver Dovey, et ál., *Journal of Neurochemistry*, **76**, 173-181 (2001); Seubert, et ál., *Nature*, **361**, 260 (1993) y Johnson-Wood, et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1550-1555 (1997)).

Las células (HEK293SSwe a 3,5 x 10^4 células/pocillo, con 200 µL de medio de cultivo, DMEM con FBS al 10 %) se incuban a 37 °C durante 4 a 24 horas en presencia/ausencia de inhibidores (diluidos en DMSO) a la concentración deseada. Al finalizar la incubación, los medios afectados se analizan para obtener pruebas de la actividad de beta-secretasa, por ejemplo, mediante el análisis de los péptidos Abeta. Se miden los péptidos Abeta totales (Abeta 1-x) mediante ELISA de tipo sándwich, utilizando el 266 monoclonal como un anticuerpo de

captura y el 3D6 biotinilado como un anticuerpo indicador. De manera alternativa, se miden los péptidos 1-40 de Abeta y 1-42 de Abeta mediante ELISA de tipo sándwich, utilizando el 2G3 monoclonal como un anticuerpo de captura para 1-40 de Abeta, y el 21F12 monoclonal como un anticuerpo de captura para 1-42 de Abeta. Los ELISA de 1-40 de Abeta y 1-42 de Abeta utilizan el 3D6 biotinilado como el anticuerpo indicador. La concentración de Abeta liberada en los medios afectados tras el tratamiento con el compuesto corresponde a la actividad de BACE1 en tales condiciones. La curva de inhibición de 10 puntos se grafica y se ajusta con la ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores de EC_{50} y IC_{50} para el efecto de reducción de Abeta. Los siguientes compuestos ejemplificados se analizan esencialmente tal como se describió anteriormente y presentaron la actividad que figura a continuación para el efecto de reducción de Abeta:

Tabla 4

Ejemplo	HEK 293 Swe A-beta (1-40) ELISA IC_{50} (nM)	HEK 293 Swe A-beta (1-42) ELISA IC_{50} (nM)
1	0,619	0,437
2	0,324	0,289

3	1,26	0,299
6	0,0887	0,0785
7	0,220	0,211

Estos datos demuestran que los compuestos de la Tabla 4 inhiben la producción natural de Abeta en células completas.

Ensayo neuronal primario de PDAPP

También se realizó un ensayo celular completo confirmatorio en cultivos neuronales primarios generados a partir de ratones embrionarios transgénicos con PDAAP. Las neuronas corticales primarias se preparan a partir de embriones con PDAPP en el día embrionario 16 y se cultivan en placas de 96 pocillos (15 x 10^4 células/pocillo en DMEM/F12 (1:1) más FBS al 10 %). Después de 2 días *in vitro*, el medio de cultivo se reemplaza con DMEM/F12 (1:1) libre de suero que contiene suplemento B27 y 2 µM (final) de Ara-C (Sigma, C1768). El día 5 in vitro, las neuronas se incuban a 37 °C durante 24 horas en presencia/ausencia de inhibidores (diluidas en DMSO) a la concentración deseada. Al finalizar la incubación, los medios afectados se analizan para obtener pruebas de la actividad de beta-secretasa, por ejemplo, mediante el análisis de los péptidos Abeta. Se miden los péptidos Abeta totales (Abeta 1-x) mediante ELISA de tipo sándwich, utilizando el 226

monoclonal como un anticuerpo de captura y el 3D6 biotinilado como un anticuerpo indicador. De manera alternativa, se miden los péptidos 1-40 de Abeta y 1-42 de Abeta mediante ELISA de tipo sándwich, utilizando el 2G3 monoclonal como un anticuerpo de captura para 1-40 de Abeta, y el 21F12 monoclonal como un anticuerpo de captura para 1-42 de Abeta. Los ELISA de 1-40 de Abeta y 1-42 de Abeta utilizan el 3D6 biotinilado como el anticuerpo indicador. La concentración de Abeta liberada en los medios afectados tras el tratamiento con el compuesto corresponde a la actividad de BACE1 en tales condiciones. La curva de inhibición de 10 puntos se grafica y se ajusta con la ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores de EC_{50} y IC_{50} para el efecto de reducción de Abeta. Los siguientes compuestos ejemplificados se analizan esencialmente tal como se describió anteriormente y presentaron la actividad que figura a continuación para el efecto de reducción de Abeta:

Tabla 5

Ejemplo	PDAPP Neuron A-beta (1-40) ELISA IC_{50} (nM)	PDAPP Neuron A-beta (1-42) ELISA IC_{50} (nM)
1	0,487 (± 0,0946 n=2)	0,591 (± 0,268 n=2)

2	0,244	1,22 (± 0,967 n=2)
3	0,481 (± 0,371 n=3)	0,363 (± 0,428 n=3)
4	0,275 (± 0,176 n=4)	0,228 (± 0,244 n=3)
6	0,132 (± 0,0717 n=2)	0,0813
7	0,279 (± 0,0607 n=2)	0,308 (± 0,115 n=2)
8	0,137 (± 0,0697 n=3)	0,0725 (± 0,0114 n=2)
9	0,309 (± 0,206 n=3)	0,379 (± 0,353 n=3)

Media ± SEM; SEM= error estándar de la media

Estos datos demuestran que los compuestos de la Tabla 5 inhiben la producción de Abeta en células completas.

Inhibición in vivo de la beta-secretasa

Se pueden utilizar varios modelos animales, incluidos los de ratón, conejillo de indias, perro y mono para analizarse para obtener la inhibición de la actividad de la beta-secretasa *in vivo* tras el tratamiento con el compuesto. Los animales utilizados en la presente invención pueden ser animales de tipo salvaje, transgénicos o con inactivación génica. Por ejemplo, el modelo de ratón con PDAPP, preparado tal como se describe en Games et ál., *Nature* **373**, 523-527 (1995), y otros animales no transgénicos o con inactivación génica son útiles para analizar la inhibición in vivo de Abeta y la producción

de sAPPbeta en presencia de los compuestos inhibidores. Generalmente, se administra a ratones con PDAPP de 2 a 12 meses, ratones con inactivación génica o animales no transgénicos el compuesto formulado en vehículos, tales como aceite de maíz, ciclodextran, amortiguadores de fosfato, PHARMASOLVE®, u otros vehículos adecuados. De una a veinticuatro horas después de la administración del compuesto, los animales se sacrifican, y se les quitan los cerebros, así como el líquido cefalorraquídeo y el plasma, para analizar los fragmentos Abetas, C99 y sAPP. (*Véase* May, *et ál.*, *Journal of Neuroscience*, 31, 16507-16516 (2011)).

Para estudios farmacológicos estándar in vivo, se les administran dosis a los animales con varias concentraciones del compuesto y se comparan con un grupo de control tratado con vehículo al que se le administró una dosis al mismo tiempo. Para algunos estudios del transcurso del tiempo, se obtiene tejido cerebral, plasma o líquido cefalorraquídeo de animales seleccionados, comenzando en el momento 0 para establecer un punto de referencia. Se administra el compuesto o vehículo adecuado a otros grupos y se sacrificaron en diversos momentos después de la dosificación. Se obtiene tejido cerebral, plasma o líquido cefalorraquídeo de animales seleccionados y se analiza para obtener la presencia de

productos de escisión de APP, inclusive péptidos Abeta, sAPPbeta, y otros fragmentos de APP, por ejemplo, mediante ensayos ELISA de tipo sándwich específicos. Al final del período de pruebas, los animales se sacrifican y se analiza el tejido cerebral, plasma o líquido cefalorraquídeo para detectar la presencia de péptidos Abeta, C99, y sAPPbeta, según corresponda. También se pueden analizar los tejidos cerebrales de los animales transgénicos con APP para obtener la cantidad de placas beta-amiloide tras el tratamiento con el compuesto. "Péptido Abeta 1-x", tal como se usa en la presente, se refiere al total de las especies de Abeta que comienza con el residuo 1 y termina con un extremo C con más de 28 residuos. Esto detecta la mayoría de las especies de Abeta y, a menudo se denomina "Abeta total".

Los animales (PDAPP u otro ratones transgénicos con APP o no transgénicos) a los que se les administró un compuesto inhibidor pueden demostrar la reducción de Abeta o sAPPbeta en los tejidos cerebrales, plasma o líquidos cefalorraquídeos y la disminución de las placas de beta amiloide en el tejido cerebral, en comparación con los controles tratados con vehículo o controles del momento cero. Tres horas después de la administración de una dosis oral de 1, 3 o 10 mg/kg del compuesto del Ejemplo 1 a ratones PDAPP hembra jóvenes, los

niveles del péptido Abeta 1-x se reducen aproximadamente 34 %, 48 % y 53 % en el hipocampo cerebral, y aproximadamente 43 %, 59 % y 66 % en la corteza cerebral, respectivamente, en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Tres horas después de la administración de una dosis oral de 1 o 3 mg/kg del compuesto del Ejemplo 3, los niveles del péptido Abeta 1-x se reducen aproximadamente 38 % y 50 % en el hipocampo cerebral, y aproximadamente 34 % y 53 % en la corteza cerebral, respectivamente, en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Para el Ejemplo 4, 3 horas después de la administración de una dosis oral de 0,3, 1 o 3 mg/kg del compuesto, los niveles del péptido Abeta 1-x se reducen aproximadamente 31 %, 39 % y 61 % en el hipocampo cerebral, y aproximadamente 28 %, 42 % y 64 % en la corteza cerebral, respectivamente, en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Dada la actividad de los Ejemplos 1, 3 y 4 con respecto a la enzima BACE in vitro, estos efectos de reducción de Abeta son consistentes con la inhibición de BACE *in vivo*, y se demuestra adicionalmente la penetración en el SNC de los Ejemplos 1, 3 y 4.

Estos estudios muestran que los compuestos de los Ejemplos 1 a 9 inhiben BACE y son, por lo tanto, útiles para la reducción de los niveles de Abeta.

Estudio de combinación

Estudio experimental de alimentación de inhibidor de BACE

Se lleva a cabo un estudio experimental farmacocinético y farmacodinámico en ratones PDAPP a los cuales se les administra una dieta de ración que contiene un inhibidor de BACE, tal como un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con la finalidad de definir dosis que proporcionan una reducción mínima a acentuada de Abeta en cerebro y plasma únicamente mediante la inhibición de BACE. Se alimenta a los ratones PDAPP jóvenes durante 14 días con una dieta que contiene una dieta de ración que contiene el inhibidor de BACE a dosis equivalentes a "casi dos veces por día" de 3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg. El inhibidor de BACE a ~ 0,05, 0,15, 0,5 o 1,5 mg por gramo de dieta certificada de roedor #8728CM (Harlan labs) se mezcla en una mezcladora Sorvall durante 10 minutos y luego se mezcla con una mezcladora Hovart durante 15

minutos antes de formar sedimentos. Se aleatorizan treinta y dos ratones PDAPP hembra según línea parental en 4 grupos de 8 que consisten en un grupo de tratamiento con vehículo y tres dosis de inhibidor de BACE. Se permite a los ratones el acceso a voluntad a la comida durante 14 días y posteriormente son sacrificados. Los ratones se anestesian con CO_2 y la sangre se recolecta mediante punción cardíaca en tubos de microcentrífuga recubiertos con EDTA y se almacena en hielo. Posteriormente, se recolecta plasma mediante centrifugación de muestras de sangre durante 4 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente, se transfiere a tubos de microcentrífuga sin tratar, luego se conserva en hielo seco y se almacena a -80 °C hasta el análisis. Los ratones se sacrifican mediante decapitación, los cerebros se microdisecan rápidamente en mitades, se congelan rápidamente en hielo seco y se almacenan a -80 °C hasta el análisis (una mitad para análisis de Abeta y la otra mitad para medición de exposición al compuesto). Para el análisis de Abeta parenquimal, las muestras de cerebros se homogenizan en amortiguador de HCl de guanidina 5,5 M (0,5 mL por mitad de cerebro) con desgarrador de tejidos (modelo 985-370) a velocidad 5 durante alrededor de 1 minuto. Las muestras de cerebro homogeneizadas se nutan durante la noche a temperatura ambiente.

Para el análisis ELISA de Abeta, se recolectan extractos y se diluyen al menos 1:10 en amortiguador de caseína (1x PBS con caseína al 0,25 %, Tween 20 al 0,05 %, timerosal al 0,1 %, pH 7,4 con cóctel inhibidor de proteasas (Sigma P9340 a 0,01 mg/mL)) y se centrifugan a 14000 rpm durante 10 minutos. Para el análisis de Abeta en plasma, las muestras se diluyen 1:2 en amortiguador de especimen (PBS; Triton X-405 al 0,05 %, timerasol al 0,04 %, BSA al 0,6 %), previo al análisis mediante ELISA. Se determina $Abeta_{1-x}$ humano en plasma mediante ELISA de tipo sándwich con m266.2 (anti-$Abeta_{13-28}$) y 3D6 biotinilado (anti-Abeta1-5) como los anticuerpos de captura e indicador, respectivamente. Los desconocidos se someten a ensayo por duplicado y se determina el pg/mL mediante interpolación (Soft Max Pro v. 5.0.1, Molecular Dynamics, mediante un ajuste de 4 parámetros de la curva de referencia) de curvas estándar de 8 puntos y luego ajuste para la dilución. El Abeta parenquimal se determina mediante ELISA de tipo sándwich tal como se describió anteriormente y los valores se normalizan a los niveles de proteínas (determinados por duplicado mediante el método de proteínas Bradford Coomassie Plus) y se expresan como pg/mg de proteína.

Para determinar los niveles en plasma y tejido del inhibidor de BACE, se emplea el siguiente método: Se diluye en serie 0,1 mg/mL de solución madre de inhibidor de BACE con metanol/agua (1:1, v/v), para preparar soluciones de trabajo, las cuales se utilizan luego para fortificar plasma de control y homogenados de cerebro para proporcionar concentraciones de analitos de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 2000, 4000 y 5000 ng/mL. Antes del análisis, las muestras de cerebro se homogenizan en 3 volúmenes de metanol/agua (1:4, v/v) con un disruptor ultrasónico. Se transfieren muestras de matriz de control, una alícuota de cada muestra de estudio y un estándar de calibración adecuado a una placa de 96 pocillos, y luego se mezclan con estándar interno que contiene acetonitrilo. Luego de la mezcla, las muestras se centrifugan para precipitar las proteínas precipitadas. Luego se transfieren alícuotas de los sobrenadantes resultantes a una placa limpia de 96 pocillos y se diluyen con metanol/agua (1:1, v/v) y se analizan alícuotas de 10 microlitros mediante LC-MS/MS. Las concentraciones de analitos se calculan mediante el uso de la relación de respuesta a concentración determinada mediante la regresión múltiple de las muestras de la curva de calibración.

Estudio de combinación *in vivo*

Con la finalidad de evaluar una terapia de combinación de disminución de placas de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu tal como el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu VII (ver Tabla 1, mE8c-IgG2a; tal como se describe en la patente estadounidense n.° 8,679,498 B2; USSN 13/810,895) y un inhibidor de BACE, tal como un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este, primero se deja crecer a 16 a 18 meses a una cohorte grande de ratones PDAPP. Los ratones PDAPP crecidos se aleatorizan en cinco grupos de tratamiento con base en género, línea parental y edad. Hay 20 a 30 ratones PDAPP crecidos por grupo de tratamiento. El Grupo 1 se sacrifica como un momento cero al inicio del estudio con la finalidad de determinar el nivel de referencia de patología previo al tratamiento terapéutico (autopsia descrita más adelante). Los cuatro grupos restantes se tratan de la siguiente manera: Grupo-2, animales de control que reciben dieta de ración con placebo e inyecciones semanales de 12,5 mg/kg del isotipo de control del anticuerpo IgG2a; Grupo-3, animales que reciben inyecciones semanales de 12,5 mg/kg de anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu; Grupo-4, animales que reciben una dieta de ración con inhibidor de BACE en dosis definidas previamente en el estudio

experimental de alimentación, pero típicamente ~3 a 30 mg/kg/día; Grupo-5, animales que reciben una dieta de ración con inhibidor de BACE (~3 a 30 mg/kg/día) e inyecciones semanales de 12,5 mg/kg de anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu. El anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu se diluye a partir de soluciones madre estériles que consisten en el anticuerpo en amortiguador de PBS y se administra a los animales mediante inyecciones intraperitoneales. El inhibidor de BACE se mezcla con dieta de ración suelta (~0,15 a 1,5 mg de compuesto por gramo de ración, dependiendo de la dosis deseada) y se comprime en sedimentos de ración. Se registra el peso del animal al inicio del estudio y luego semanalmente durante el primer mes de tratamiento, y luego mensualmente a lo largo del estudio. También se supervisa la ingesta de comida en el curso del estudio en intervalos regulares. Los animales reciben los tratamientos del estudio durante un total de 4 meses. Los animales se mantienen en sus dietas respectivas hasta la autopsia, la cual sucede una semana después de las inyecciones finales de anticuerpo. Al momento de la autopsia, los animales son anestesiados y la sangre se obtiene mediante punción cardíaca a través de jeringas de EDTA de 1 ml enjuagadas previamente. Las muestras de sangre se recolectan en hielo y el plasma se aísla mediante centrifugado estándar. Posteriormente, los animales se

perfusionan con solución salina heparinizada fría y se extrae y se diseca el cerebro en los hemisferios izquierdo y derecho. Un hemisferio de cerebro se congela rápidamente y se guarda para análisis histológicos. El hemisferio cerebral restante se diseca en segmentos de tejido que consisten en hipocampo, corteza, cerebelo y cerebro medio, y posteriormente se congela en hielo seco. Las muestras de plasma y tejido se almacenan a -80 °C hasta el momento del análisis.

Evaluación farmacocinética

La farmacocinética de plasma se determina en las muestras de plasma obtenidas al momento de la autopsia. Se determinan los niveles de anticuerpo en plasma en un ensayo ELISA de unión de antígenos donde las placas se recubren con antígeno ($Abeta_{p3-42}$) y luego se incuban con muestras diluidas de plasma o un estándar de referencia que consiste en una dilución en serie del anticuerpo monoclonal anti-N3pGlu en el amortiguador de ensayo (PBS + plasma murino de control). Luego de lavar la placa, se detectó el anticuerpo murino enlazado con un anticuerpo conjugado anti-murino-HRP seguido por desarrollo de color con TMB. Para determinar los niveles en plasma y tejido (cerebro medio) del inhibidor de BACE, se

emplea el siguiente método: Se diluye en serie 0,1 mg/mL de solución madre de inhibidor de BACE con metanol/agua (1:1, v/v), para preparar soluciones de trabajo, las cuales se utilizan luego para fortificar plasma de control y homogenados de cerebro para proporcionar concentraciones de analitos de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 2000, 4000 y 5000 ng/mL. Antes del análisis, las muestras de cerebro se homogenizan en 3 volúmenes de metanol/agua (1:4, v/v) con un disruptor ultrasónico. Se transfieren muestras de matriz de control, una alícuota de cada muestra de estudio y un estándar de calibración adecuado a una placa de 96 pocillos, y luego se mezclan con estándar interno que contiene acetonitrilo. Luego de la mezcla, las muestras se centrifugan para precipitar las proteínas precipitadas. Luego se transfieren alícuotas de los sobrenadantes resultantes a una placa limpia de 96 pocillos y se diluyen con metanol/agua (1:1, v/v) y las alícuotas de 10 microlitros se analizan mediante LC-MS/MS. Las concentraciones de analitos se calculan mediante el uso de la relación de respuesta a concentración determinada mediante la regresión múltiple de las muestras de la curva de calibración.

Evaluación farmacodinámica

Las concentraciones parenquimales de Abeta se determinan en homogenatos de tejido solubilizado con guanidina mediante ELISA de tipo sándwich. Se lleva a cabo la extracción de tejidos con tecnología bead beater donde el tejido congelado se extrae en 1 ml de guanidina 5,5 M/Tris 50 mM/0,5 X cóctel inhibidor de proteasas a pH 8,0 en placas de pocillo profundo de 2 ml con 1 ml de perlas de vidrio siliconizadas (las placas selladas se agitaron durante dos intervalos de 3 minutos cada uno). Los lisados de tejido resultantes se analizan mediante ELISA de tipo sándwich para $Abeta_{1-40}$ y $Abeta_{1-42}$: las muestras de bead beater se diluyen 1:10 en BSA/PBS-T al 2 % y se filtran a través de placas de filtro de muestra (Millipore). Las muestras, blancos, estándares, muestras de control de calidad, se diluyen adicionalmente en guanidina 0,55 M/Tris 5 mM en BSA/PBST al 2 % previo a la carga de las placas de muestra. Los estándares de referencia se diluyen en un diluyente de muestra. Las placas se recubren con el anticuerpo 21F12 (anti-$Abeta_{42}$) o 2G3 (anti-$Abeta_{40}$) a 15 µg/ml se incuban con muestras y la detección se logra con 3D6 biotinilado (anti-$Abeta_{1-x}$) diluido en BSA/PBS-T al 2 %, seguido por una dilución 1:20 K NeutrAvidin-HRP (Pierce) en BSA/PBS-T al 2 % y desarrollo de color con TMB (Pierce). Los niveles de Abeta se interpolan a partir de curvas estándar y la concentración final de tejido se calcula como nanogramos

de Abeta por miligramo de peso húmedo de tejido. Se determina de manera histológica el área porcentual del hipocampo y corteza ocupada por Abeta depositado. Las secciones coronales criostáticas (7 a 10 µm de grosor) se incuban con 10 µg/ml de 3D6 biotinilado (anti-Abeta$_{1-x}$) o IgG murina de control negativo (biotinilada). Se emplean reactivos de HRP secundarios específicos para la biotina y el Abeta depositado se visualiza con DAB-Plus (DAKO). Los depósitos inmunoreactivos de Abeta se cuantifican en áreas de interés definidas dentro del hipocampo o corteza mediante el análisis de imágenes capturadas con software Image Pro plus (Media Cybernetics).

Estos estudios pueden demostrar que la terapia de combinación de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu y un inhibidor de BACE, tal como un compuesto de la Fórmula I o sal farmacéuticamente aceptable de este, puede dar como resultado reducciones de Abeta potenciadas con relación a las monoterapias individuales.

Listado de secuencias

<SEQ ID NO: 1; PRT1; Artificial> (LCDR1- B12L/R17L)

KSSQSLLYSRGKTYLN

<SEQ ID NO: 2; PRT1; Artificial> (LCDR2 - B12L/R17L)

AVSKLDS

<SEQ ID NO: 3; PRT1; Artificial> (LCDR3 - B12L/R17L)

VQGTHYPFT

<SEQ ID NO: 4; PRT1; Artificial> (HCDR1 - B12L)

GYDFTRYYIN

<SEQ ID NO: 5; PRT1; Artificial> (HCDR1 - R17L)

GYTFTRYYIN

<SEQ ID NO: 6; PRT1; Artificial> (HCDR2 - B12L/R17L)

WINPGSGNTKYNEKFKG

<SEQ ID NO: 7; PRT1; Artificial> (HCDR3 - B12L)

EGITVY

<SEQ ID NO: 8; PRT1; Artificial> (HCDR3 - R17L)

EGTTVY

<SEQ ID NO: 9; PRT1; Artificial> (LCVR - B12L/R17L)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLLIYAVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIK

<SEQ ID NO: 10; PRT1; Artificial> (HCVR - B12L)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYDFTRYYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNTKYN
EKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGITVYWGQGTTVTVSS

<SEQ ID NO: 11; PRT1; Artificial> (HCVR – R17L)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRYYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNTKYN
EKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGTTVYWGQGTTVTVSS

<SEQ ID NO: 12; PRT1; Artificial> (LC - B12L/R17L)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLLIYAVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

<SEQ ID NO: 13; PRT1; Artificial> (HC - B12L)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYDFTRYYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNTKYN
EKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGITVYWGQGTTVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

<SEQ ID NO: 14; PRT1; Artificial> (HC – R17L)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRYYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGNTKYN
EKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGTTVYWGQGTTVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK

PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT

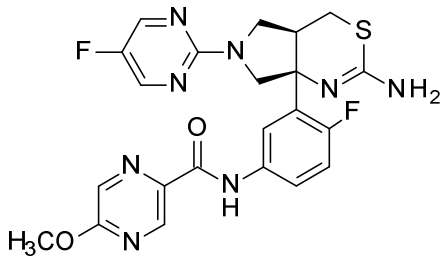
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH

EALHNHYTQKSLSLSPG

SE REIVINDICA:

1. Un método para tratar la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende administrarle a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de la fórmula:



,

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu es B12L o R17L.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu es B12L.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el compuesto es N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-

tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el compuesto es la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

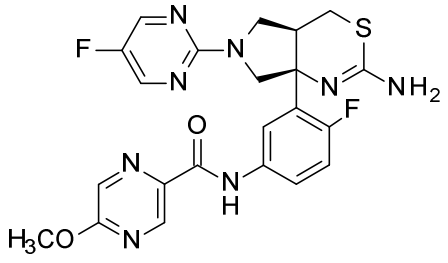
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida se caracteriza por un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, en el ángulo de difracción 2-theta de 11,8°, donde uno o más picos se seleccionan del grupo que consiste en 18,6°, 19,3° y 26,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el compuesto y el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu se administran de manera simultánea.

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el compuesto se administra previo a la administración del anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.

9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu se administra previo a la administración del compuesto.

10. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de la fórmula:



,

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables, en combinación con una composición farmacéutica de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu, con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

11. La composición farmacéutica de acuerdo con la

reivindicación 10, donde el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu es B12L o R17L.

12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, donde el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu es B12L.

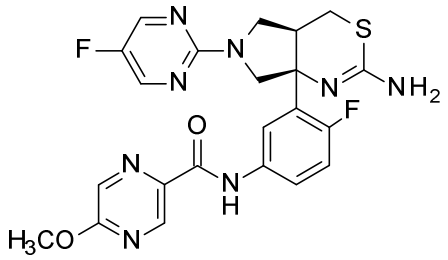
13. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde el compuesto es N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

14. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde el compuesto es la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, donde la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida se caracteriza por un

pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, en el ángulo de difracción 2-theta de 11,8°, donde uno o más picos se seleccionan del grupo que consiste en 18,6°, 19,3° y 26,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

16. Un compuesto de la fórmula:



,

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu es B12L o R17L.

18. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 o la reivindicación 17, donde el anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu es B12L.

19. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde el compuesto es N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-

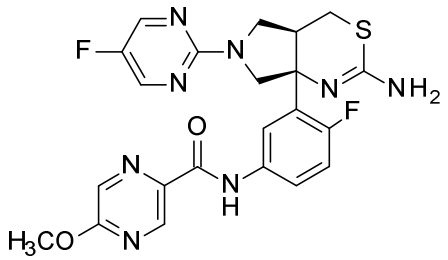
fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

20. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde el compuesto es la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida se caracteriza por un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, en el ángulo de difracción 2-theta de 11,8°, donde uno o más picos se seleccionan del grupo que consiste en 18,6°, 19,3° y 26,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

RESUMEN

La presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa o cognitiva, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de la fórmula:



,

o una sal farmacéuticamente aceptable de este; en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal Abeta anti-N3pGlu.