

**DERIVADOS DE AMINOHIDROTIAZINA FUSIONADOS CON
TETRAHIDROFURANO LOS CUALES SON ÚTILES EN EL TRATAMIENTO DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos inhibidores de BACE1 selectivos, a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, a métodos de uso de los compuestos para tratar trastornos fisiológicos, y a intermediarios y procesos útiles en la síntesis de los compuestos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención está en el campo del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades y trastornos que implican el péptido β amiloide (Abeta), un segmento de péptido neurotóxico y altamente agregatorio de la proteína precursora de amiloide (APP). La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo devastador que afecta a millones de pacientes en todo el mundo. En vista de los agentes aprobados en la actualidad en el mercado los cuales proporcionan solamente beneficios sintomáticos transitorios al paciente en lugar de detener, ralentizar, o revertir la enfermedad, existe una necesidad no satisfecha significativa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la generación, agregación, y deposición de Abeta en el cerebro. La inhibición completa o parcial de la β -secretase (enzima de escisión de proteína precursora de amiloide del sitio β ; BACE) se ha mostrado que tiene un efecto significativo en las patologías relacionadas con la placa y dependientes de la placa en modelos de ratón sugiriendo que incluso pequeñas reducciones en los niveles de péptido Abeta pueden resultar en una reducción significativa a largo plazo de la carga de la placa y de los déficits sinápticos, proporcionando así beneficios terapéuticos significativos, particularmente en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Además, se han identificado dos homólogos de BACE los cuales son referidos como BACE1 y BACE2, y se cree que BACE1 es el más clínicamente importante para desarrollar la enfermedad de Alzheimer. BACE1 se expresa principalmente en las neuronas, mientras que BACE2 se ha mostrado que se expresa principalmente en la periferia (Véase D. Oehlrich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 2033-2045 (2014)). Además, BACE2 puede ser importante para la pigmentación, ya que ha sido identificado que juega un papel en el procesamiento de la proteína de melanocitos específica de células de pigmento (Véase L. Rochin, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, **110** (26), 10658-10663 (2013)). Se desean inhibidores de BACE con penetración en el sistema nervioso central (CNS), en

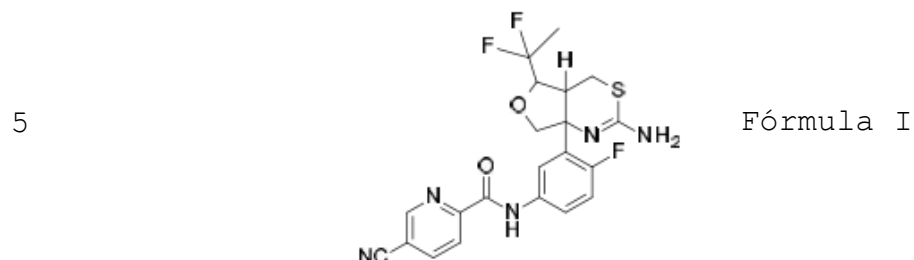
particular inhibidores que son selectivos para BACE1 sobre BACE2 para proporcionar tratamientos para los trastornos mediados por péptido Abeta, tales como la enfermedad de Alzheimer.

5 La Patente de Estados Unidos No. 8,158,620 describe derivados fusionados aminodihidrotiazina los cuales poseen actividad inhibidora de BACE1 y se describen adicionalmente como agentes terapéuticos útiles para una enfermedad neurodegenerativa causada por el péptido Abeta, tal como
10 demencia tipo Alzheimer. Además, la Patentes de Estados Unidos No. 8,338,407 describe ciertos derivados de aminodihidrotiazina fusionados que tienen efecto inhibidor de BACE1 útil en el tratamiento de ciertas enfermedades neurodegenerativas, tales como demencia tipo Alzheimer.

15 La presente invención proporciona ciertos nuevos compuestos que son inhibidores de BACE. Además, la presente invención proporciona ciertos nuevos compuestos que son inhibidores selectivos de BACE1 sobre BACE2. Además, la presente invención proporciona ciertos nuevos compuestos los
20 cuales penetran en el CNS. La presente invención también proporciona ciertos nuevos compuestos los cuales tienen el potencial de un perfil de efecto secundario mejorado, por ejemplo, a través de la inhibición selectiva de BACE1 sobre BACE2.

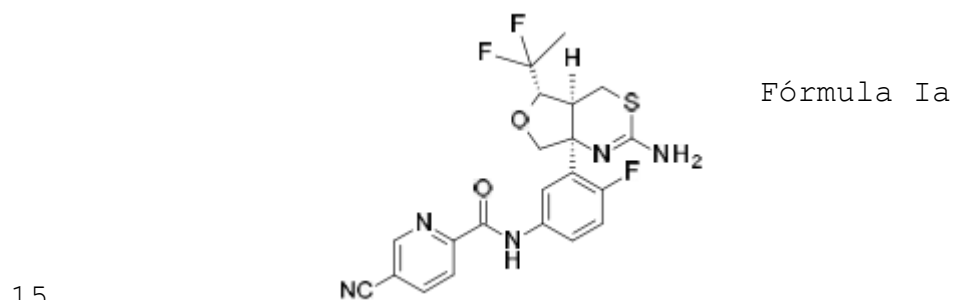
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula Ia:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también proporciona un método para tratar la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de las Fórmulas I o Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para tratar la progresión del deterioro cognitivo leve a la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que

comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de las Fórmulas I o Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La presente invención también proporciona un método
5 para inhibir BACE en un paciente, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de las Fórmulas I o Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La presente invención también proporciona un método para inhibir la escisión
10 mediada por BACE de la proteína precursora de amiloide, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de las Fórmulas I o Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La invención proporciona adicionalmente un método para
15 inhibir la producción de péptido Abeta, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de las Fórmulas I o Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además, esta invención proporciona un compuesto de
20 las Fórmulas I o Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en terapia, en particular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o para prevenir la progresión del deterioro cognitivo leve a la enfermedad de Alzheimer. Incluso además, esta invención proporciona el uso
25 de un compuesto de las Fórmulas I o Ia, o una sal

farmacéuticamente aceptable del mismo, para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La invención proporciona adicionalmente una
5 composición farmacéutica, que comprende un compuesto de las Fórmulas I o Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más portadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables. La invención proporciona
adicionalmente un proceso para preparar una composición
10 farmacéutica, que comprende mezclar un compuesto de las Fórmulas I o Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más portadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables. Esta invención también abarca
nuevos intermediarios y procesos para la síntesis de los
15 compuestos de las Fórmulas I y Ia.

El deterioro cognitivo leve se ha definido como una fase prodromal potencial de demencia asociada con la enfermedad de Alzheimer basada en la presentación clínica y en la progresión de pacientes que presentan deterioro
20 cognitivo leve a demencia de Alzheimer con el tiempo. (Morris, *et al.*, *Arch Neurol.*, **58**, 397-405 (2001); Petersen, *et al.*, *Arch Neurol.*, **56**, 303-308 (1999)). El término "prevenir la progresión del deterioro cognitivo leve a la enfermedad de Alzheimer" incluye restringir, ralentizar,
25 detener, o revertir la progresión del deterioro cognitivo

leve a la enfermedad de Alzheimer en un paciente.

Como se usa en la presente, los términos "tratando" o "tratar" incluyen restringir, ralentizar, detener, o revertir la progresión o gravedad de un síntoma o trastorno existente.

Como se usa en la presente, el término "paciente" se refiere a un ser humano.

El término "inhibición de la producción de péptido Abeta" se entiende la disminución de los niveles *in vivo* del péptido Abeta en un paciente.

Como se usa en la presente, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o dosis del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que, tras la administración de dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.

Una cantidad efectiva se puede determinar fácilmente por el diagnosticados que atiende, como un experto ordinario en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad efectiva para un paciente, una serie de factores son considerados por el diagnosticador que atiende, incluyendo, pero no limitado a: la especie del paciente; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado de

afectación o la gravedad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el
5 régimen de dosis seleccionado; el uso de medicamento concomitante; y otras circunstancias relevantes.

Los compuestos de la presente invención son generalmente efectivos en un amplio rango de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente caen
10 dentro del rango de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del rango antes mencionado pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis todavía mayores con
15 efectos secundarios aceptables, y por lo tanto el rango de dosificación anterior no pretende limitar el alcance de la invención de cualquier manera.

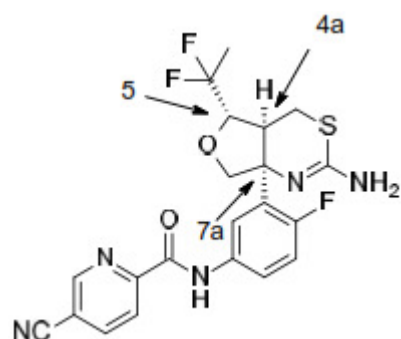
Los compuestos de la presente invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas
20 administradas por cualquier ruta que haga al compuesto biodisponible, incluyendo las rutas oral y transdérmica. Más preferiblemente, tales composiciones son para administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para preparar las mismas son bien conocidos en la técnica. (Véase,
25 por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy,

L.V. Allen, Editor, 22a Edición, Pharmaceutical Press, 2012).

Los compuestos de las Fórmulas I y Ia, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos son particularmente útiles en los métodos de tratamiento de la invención, pero ciertos grupos, sustituyentes, y configuraciones son preferidos. Los siguientes párrafos describen tales grupos, sustituyentes y configuraciones preferidos. Se entenderá que estas preferencias son aplicables tanto a los métodos de tratamiento como a los nuevos compuestos de la invención.

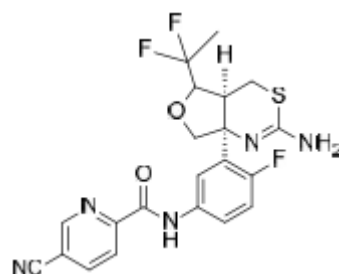
Por lo tanto, se prefiere el compuesto de la Fórmula I en donde el anillo bicíclico fusionado está en la configuración *cis*, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Por ejemplo, uno de experiencia ordinaria en la técnica apreciará que el compuesto de la Fórmula Ia está en la configuración relativa *cis* para los centros marcados 4a y 7a como se muestra en el Esquema de reacción A a continuación. Además, la configuración relativa preferida de los tres centros quirales de la Fórmula Ia se muestra en el Esquema de reacción A en donde el sustituyente difluoroetilo en la posición 5 está en la configuración *cis* relativa al hidrógeno en la posición 4a y el sustituyente fenilo sustituido en la posición 7a:

Esquema de reacción A

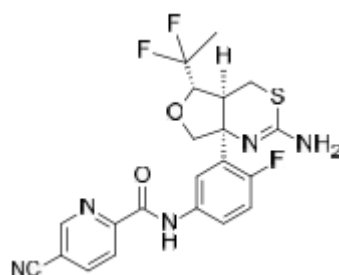


Fórmula 1a

Otros compuestos de la presente invención incluyen:



; y



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros y diasterómeros individuales, así como mezclas de los enantiómeros de dichos compuestos, incluyendo racematos, los compuestos con la configuración absoluta como se describe a continuación son particularmente preferidos:

N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-

4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Además, la N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida;

metansulfonato de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano piridin-2-carboxamida;

10 4-metilbencensulfonato de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida; y

hemihidrato de 4-metilbencensulfonato de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida, son especialmente preferidos.

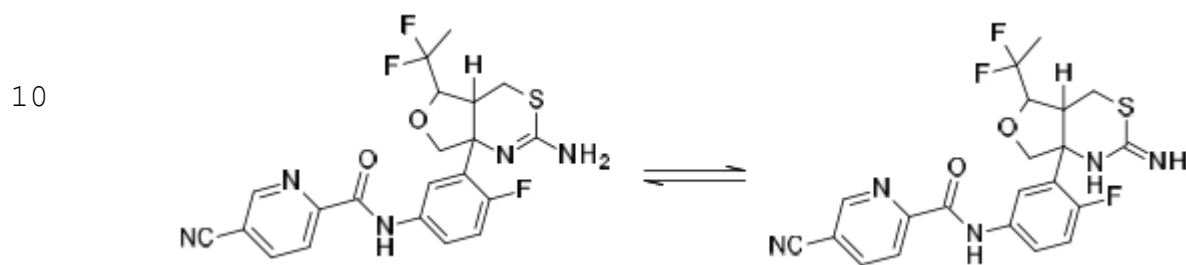
El 4-metilbencensulfonato de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida; y

hemihidrato de 4-metilbencensulfonato de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida son muy especialmente preferidos.

Uno de experiencia ordinaria en la técnica apreciará que los compuestos de la invención pueden existir en formas tautoméricas, como se representa a continuación en el Esquema de reacción B. Cuando se da cualquier referencia

5 en esta solicitud a uno de los tautómeros específicos de los compuestos de la invención, se entiende que abarca tanto las formas tautoméricas como todas las mezclas de las mismas.

Esquema de reacción B



Adicionalmente, ciertos intermediarios descritos

15 en las siguientes preparaciones pueden contener uno o más grupos protectores de nitrógeno. Se entiende que los grupos protectores pueden ser variados como se aprecia por un experto ordinario en la técnica dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las

20 transformaciones particulares que se realizan. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas por el artesano experto y se describen en la literatura (Véase, por ejemplo, "*Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*", Cuarta Edición, de Peter

25 G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons,

Inc. 2007).

Los isómeros, enantiómeros, y diastereómeros individuales se pueden separar o resolver por un experto ordinario en la técnica en cualquier punto conveniente en la
5 síntesis de compuestos de la invención, por métodos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (Véase, por ejemplo, J. Jacques, *et al.*, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel and S.H. Wilen", *Stereochemistry of Organic*
10 *Compounds*", Wiley-Interscience, 1994).

Una sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos de la invención, tal como una sal de clorhidrato, se puede formar, por ejemplo, por reacción de una base libre apropiada de un compuesto de la invención, un ácido
15 farmacéuticamente aceptable apropiado tal como ácido clorhídrico en un solvente adecuado tal como éter dietílico bajo condiciones estándar bien conocidas en la técnica. Adicionalmente, la formación de tales sales puede ocurrir simultáneamente tras la desprotección de un grupo protector
20 de nitrógeno. La formación de tales sales es bien conocida y apreciada en la técnica. Véase, por ejemplo, Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, **33**: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New
25 Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*,

4: 427-435 (2000); y Berge, S.M., et al., "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **66**: 1-19, (1977).

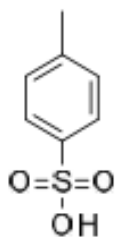
Ciertas abreviaturas se definen como sigue: "APP" se refiere a proteína precursora de ameloide; "BSA" se
5 refiere a Albumina de Suero Bovino; "CDI" se refiere a 1,1'-carbonildiimidazol; "cADN" se refiere a ácido desoxirribonucleico complementario; "DAST" se refiere a trifluoruro de dietilaminoazufre; "DCC" se refiere a 1,3-diciclohexilcarbodiimida; "DIC" se refiere a 1,3-
10 diisopropilcarbodiimida; "DIPEA" se refiere a N,N-diisopropiletilamina; "DMAP" se refiere a 4-dimetilaminopiridina; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EBSS" se refiere a Solución Salina Equilibrada de Earle; "EDCI" se refiere a clorhidrato de 1-(3-
15 dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; "ELISA" se refiere a ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima; "F12" se refiere a medio F12 de Ham; "FBS" se refiere a Suero Bovino Fetal; "Fc" se refiere a fragmento cristalizabile; "FLUOLEAD™" se refiere a trifluoruro de 4-terc-butil-2,6-
20 dimetilfenilazufre; "FRET" se refiere a transferencia de energía de resonancia de fluorescencia; "HATU" se refiere a hexafluorofosfato de (dimetilamino)-N,N-dimetil(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)metaniminio; "HBTU" se refiere a hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi) (dimetilamino)-N,N-dimetilmetaniminio; "HEK" se
25

refiere a riñón embrionario humano; "HF-piridina" se refiere a fluoruro de hidrógeno-piridina o reactivo de Olah o poli(fluoruro de piridina); "HOBT" se refiere a hidrato de 1-hidroxilbenzotriazol; "IC₅₀" se refiere a la
5 concentración de un agente que produce 50% de la respuesta inhibidora máxima posible para ese agente; "HRP" se refiere a peroxidasa de rábano picante; "IgG₁" se refiere a receptor gamma de dominio Fc similar a la inmunoglobulina; "MBP" se refiere a proteína de unión a la maltosa; "MEM" se
10 refiere a Medio Esencial Mínimo; "PBS" se refiere a solución salina amortiguada con fosfato; "PDAPP" se refiere a proteína precursora de amiloide derivada de plaquetas; "PyBOP" se refiere a (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfonio); "PyBrOP" se refiere a
15 hexafluorofosfato de bromo(tri-pirrolidinil)fosfonio; "RFU" se refiere a unidad de fluorescencia relativa; "RT-PCR" se refiere a reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa; "SDS-PAGE" se refiere a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio; "THF" se refiere
20 a tetrahidrofurano; "TMB" se refiere a tetrametilbencidina; "TMEM" se refiere a la proteína de transmembrana; "Tris" se refiere a tris(hidroximetil)aminometano; "tritilo" se refiere a un grupo de la fórmula "(Ph)₃C-"; "XRD" se refiere a Difracción de Polvo de Rayos X; "XtalFluor-E® o sal de
25 difluorosulfinio DAST" se refiere a tetrafluoroborato de

(dietilamino)difluorosulfonio o tetrafluoroborato de *N,N*-dietil-*S,S*-difluorosulfiliminio; y "XtalFluor-M® o morfo-
sal de difluorosulfinio DAST" se refiere a
tetrafluoroborato de difluoro(morfolino)sulfonio o
5 tetrafluoroborato de difluoro-4-morfolinilsulfonio.

Se entiende por un experto ordinario en la técnica
que los términos "tosilato", "ácido toluensulfónico", "ácido
p-toluensulfónico", y "ácido 4-metilbencensulfónico" se
refieren al compuesto de la siguiente estructura:

10



Los compuestos de la presente invención, o sales
15 de los mismos, se pueden preparar por una variedad de
procedimientos conocidos por un experto ordinario en la
técnica, algunos de los cuales se ilustran en los
esquemas de reacción, preparaciones, y ejemplos a
continuación. Un experto ordinario en la técnica reconoce
20 que las etapas de síntesis específicas para cada una de
las rutas descritas se pueden combinar en diferentes
maneras, o en conjunto con las etapas de diferentes
esquemas de reacción, para preparar compuestos de la
invención, o sales de los mismos. Los productos de cada
25 etapa de los esquemas de reacción siguientes se pueden

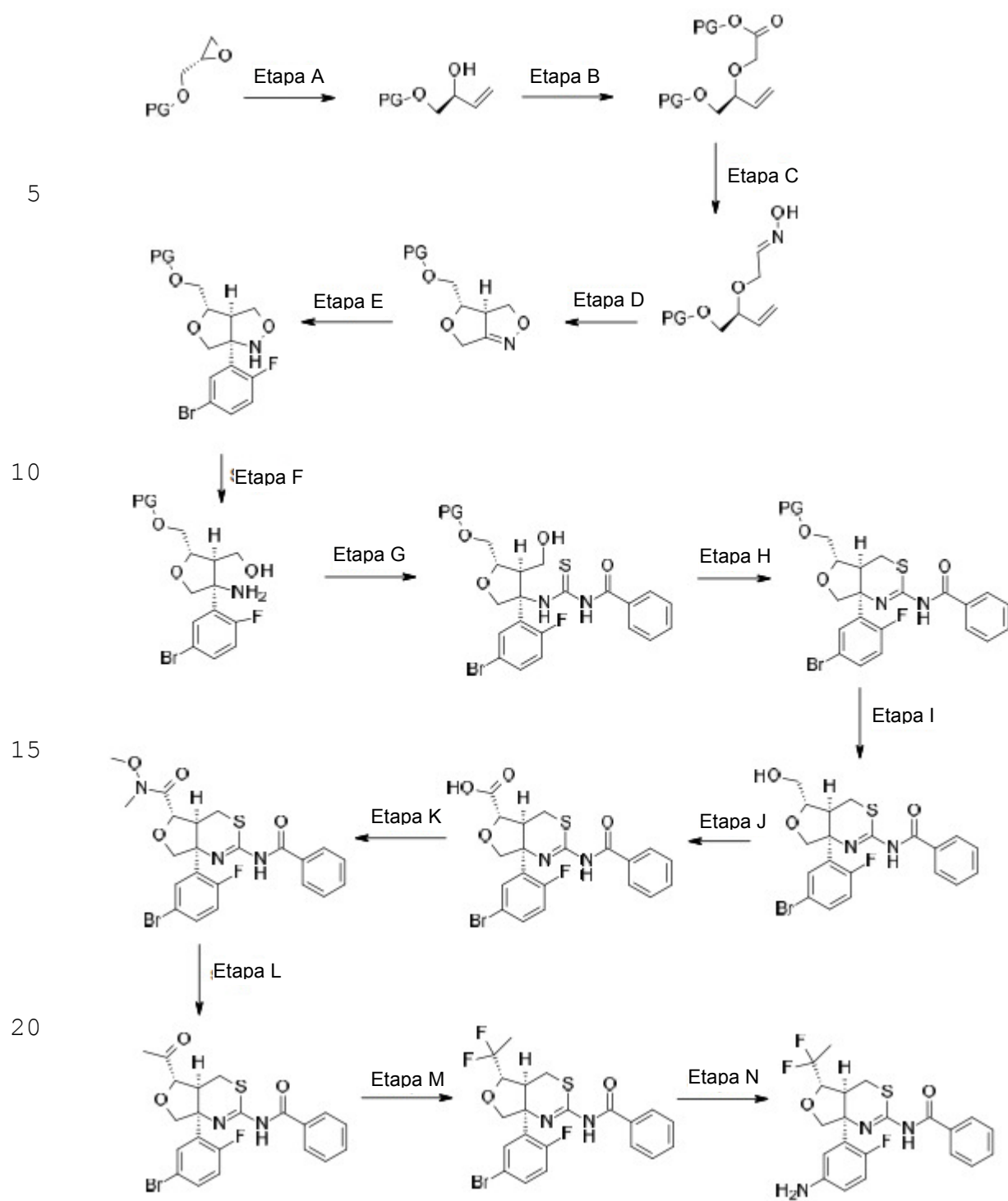
recuperar por métodos convencionales bien conocidos en la técnica, incluyendo extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización. En los esquemas de reacción a
5 continuación, todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son como se definieron previamente. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles para un experto ordinario en la técnica. Sin limitar el alcance de la invención, los siguientes
10 esquemas de reacción, preparaciones y ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención.

15

20

25

Esquema de reacción 1



En el Esquema de reacción 1, etapa A, el yoduro de
 25 trimetilsulfonio se trató con una base orgánica tal como n-

butil-litio a una temperatura de aproximadamente -50°C en un solvente tal como THF. Un oximetil oxirano protegido, protegido con un grupo protector adecuado, tal como un grupo tritilo, luego se añadió a la solución básica a -10°C y se
5 dejó agitar durante aproximadamente 2 horas para producir el producto protegido del Esquema de reacción 1, Etapa A. "PG" es un grupo protector desarrollado para el grupo amino o grupo oxígeno tales como carbamatos, amidas, o éteres. Tales grupos protectores son bien conocidos y apreciados en la
10 técnica. El producto protegido de la Etapa A se hizo reaccionar con un α -haloéster tal como bromoacetato de *terc*-butoxi usando sulfato de tetra-N-butilamonio u otros catalizadores de transferencia de fase de sal de amonio cuaternario en un solvente tal como tolueno y una base
15 inorgánica acuosa tal como hidróxido de sodio a aproximadamente temperatura ambiente para producir el compuesto del Esquema de reacción 1, Etapa B. Tales alquilaciones son bien conocidas en la técnica. Alternativamente, una base tal como hidruro de sodio al 60%
20 en aceite con solventes tales como N,N-dimetilformamida o THF y un rango de temperatura de 0 a 100°C se puede usar para producir el producto protegido de la Etapa B. El acetato de *terc*-butoxi carbonilo se convirtió a una oxima en un procedimiento de 2 etapas. Un agente reductor tal como
25 hidruro de isobutilaluminio en hexanos se añadió por goteo a

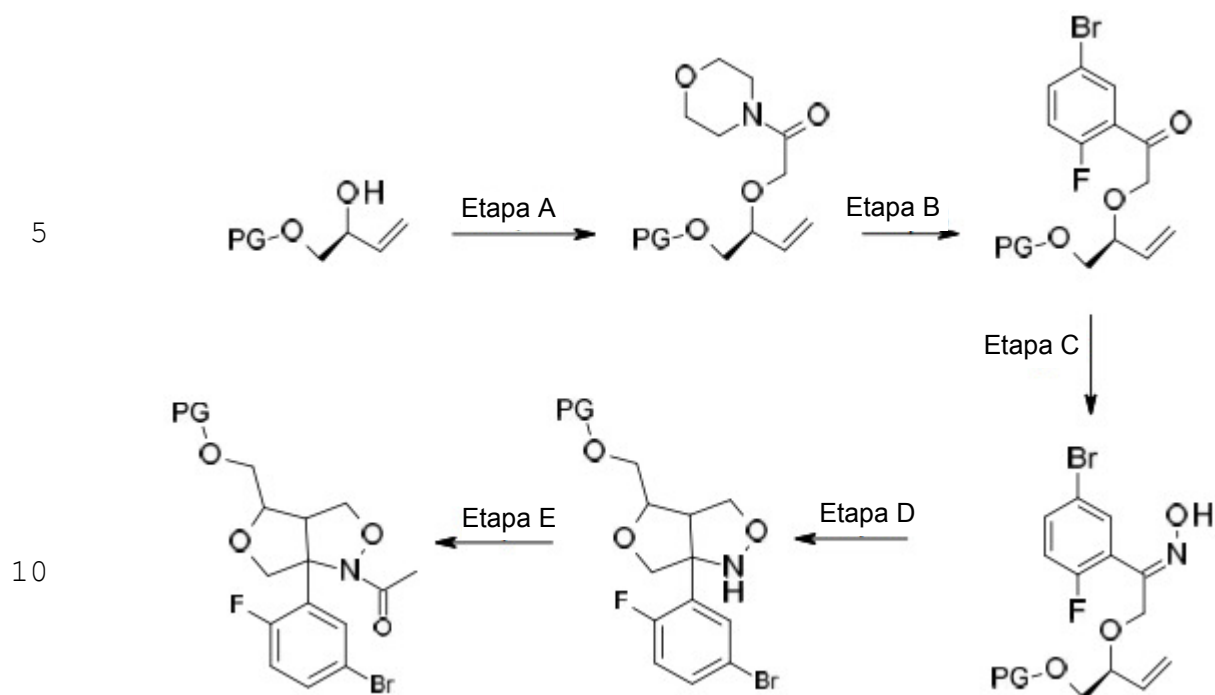
una temperatura de aproximadamente -70°C seguido de la adición por goteo de un ácido acuoso tal como ácido clorhídrico a una temperatura de aproximadamente -60°C . La elaboración se realizó con una extracción orgánica para
5 producir el material intermediario. Este material se disolvió en un solvente orgánico tal como diclorometano y se trató con acetato de sodio seguido por clorhidrato de hidroxilamina para producir el producto oxima de la Etapa C. El producto oxima del Esquema de reacción 1, Etapa C se puede convertir
10 al producto 4,5-dihidroisoxazol bicíclico de la Etapa D en una ciclación 3 + 2 por varios métodos tal como usando una solución acuosa de hipoclorito de sodio o un oxidante alternativo tal como N-clorosuccinimida y en un solvente tal como éter *terc*-butil metílico, tolueno, diclorometano, o
15 xileno a una temperatura de aproximadamente $10-15^{\circ}\text{C}$ o con calentamiento. El grupo 2-fluoro, 5-bromo fenilo se puede añadir al dihidroisoxazol generando el reactivo organometálico. El reactivo organometálico se puede generar a partir de 4-bromo-1-fluoro-2-yodo-benceno usando intercambio
20 de halógeno-metal con reactivos tales como *n*-butil-litio o complejo de cloruro isopropilmagnesio-cloruro de litio y adición por goteo a un rango de temperatura de aproximadamente -78°C a 15°C en un solvente tal como THF. Luego se añadió un ácido de Lewis tal como dietil eterato de
25 trifluoruro de boro para producir el producto del Esquema de

reacción 1, Etapa E. El tetrahidroisoxazol bicíclico resultante se puede tratar con zinc en ácido acético para formar el producto de anillo abierto del Esquema de reacción 1, Etapa F. Un método alternativo para abrir el anillo de isoxazol usa Níquel Raney en un solvente polar tal como 5 etanol bajo presión con condiciones de hidrogenación. El producto de la Etapa F luego se puede hacer reaccionar con isotiocianato de benzoilo en un solvente tal como diclorometano o THF a una temperatura de aproximadamente 5°C a temperatura ambiente para producir el compuesto de tiourea 10 de la Etapa G. El anillo de tiazina se puede formar usando anhídrido trifluorometansulfónico y una base orgánica tal como piridina en un solvente tal como diclorometano a una temperatura de aproximadamente -20°C para producir el 15 producto de la etapa H. El grupo protector hidroximetilo tal como un grupo tritilo se puede remover en el Esquema de reacción 1, Etapa I usando métodos bien conocidos en la técnica tal como ácido fórmico a temperatura ambiente para producir el compuesto de la Etapa I. El hidroximetilo se 20 puede oxidar al ácido carboxílico usando agentes oxidantes tal como ácido 2-yodoxibenzoico (IBX) a temperatura ambiente en un solvente tal como DMSO o adición por en porciones de (diacetoxiyodo)benceno en un solvente tal como acetonitrilo con agitación a una temperatura de aproximadamente 5°C para 25 producir el compuesto del Esquema de reacción 1, Etapa J. La

amida de Weinreb se preparó en el Esquema de reacción 1, Etapa K a partir del producto ácido de la Etapa J con la adición de clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina, una base orgánica, tal como trietilamina, y un reactivo de acoplamiento tal como HATU. La mezcla se agitó a temperatura ambiente para producir el producto de la Etapa K. Otros agentes de acoplamiento que se podría usar incluyen CDI, carbodiimidas tales como DCC, DIC, o EDCI u otras sales de uronio o fosfonio de aniones no nucleofílicos, tales como HBTU, PyBOP, y PyBrOP. La amida de Weinreb luego se convirtió a la cetona usando un reactivo organometálico tal como un reactivo de Grignard o un reactivo de organolitio en la Etapa L en un solvente tal como THF. Específicamente, bromuro de metilmagnesio como una solución en solventes tales como éter o 2-metiltetrahidrofurano se puede se añadió a la amida de Weinreb a una temperatura de aproximadamente -78°C a -40°C para producir la cetona de la Etapa L. En el Esquema de reacción 1, Etapa M, el grupo metil cetona del compuesto de la Etapa L se convirtió a un grupo difluoroetilo usando tetrafluoroborato de difluoro(morfolino)sulfonio en un solvente tal como diclorometano a aproximadamente 0°C seguido por la adición por goteo de trihidrofluoruro de trietilamina y agitación a 0°C a temperatura ambiente para producir el compuesto del Esquema de reacción 1, Etapa M. Alternativamente, otros agentes de fluoración que se pueden

usar los cuales son bien conocidos en la técnica son Deoxo-Fluor®, DAST, XtalFluor-E® o XtalFluor-M® con un aditivo tal como tri(fluoruro de hidrógeno) trietilamina o FLUOLEAD™ usando un aditivo tal como HF-piridina. El 5-bromo del fenilo
5 se convirtió a la amina usando (1R,2R)-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexanodiamina en un solvente tal como etanol y adición de azida de sodio seguida por ascorbato de sodio y sulfato cúprico. La reacción se calentó a aproximadamente 80°C durante varias horas y luego se elaboró con una extracción
10 usando un solvente tal como acetato de etilo. El intermediario luego se redujo bajo condiciones de hidrogenación usando paladio sobre carbono tal como 10% de paladio en solventes tales como etanol y THF a una presión de aproximadamente 50 psi de hidrógeno para producir el producto
15 de anilina del Esquema de reacción 1, Etapa N.

Esquema de reacción 1a



Alternativamente en el Esquema de reacción 1a, el producto protegido del Esquema de reacción 1, Etapa A, se puede tratar con 4-(2-cloroacetil)morfolino y una base tal como sulfato ácido de tetrabutil amonio en un solvente tal como tolueno a una temperatura de aproximadamente 5°C para producir el producto del Esquema de reacción 1a, Etapa A. El grupo morfolino luego puede servir como un grupo saliente en el Esquema de reacción 1a, Etapa B. Por ejemplo, el producto del Esquema de reacción 1a, Etapa A se puede tratar con el reactivo de Grignard apropiado el cual se puede preparar in situ a partir de complejo de cloruro de isopropil magneio-cloruro de litio y 4-bromo-1-fluoro-2-yodobenceno o si el reactivo de Grignard apropiado está disponible, el reactivo

15

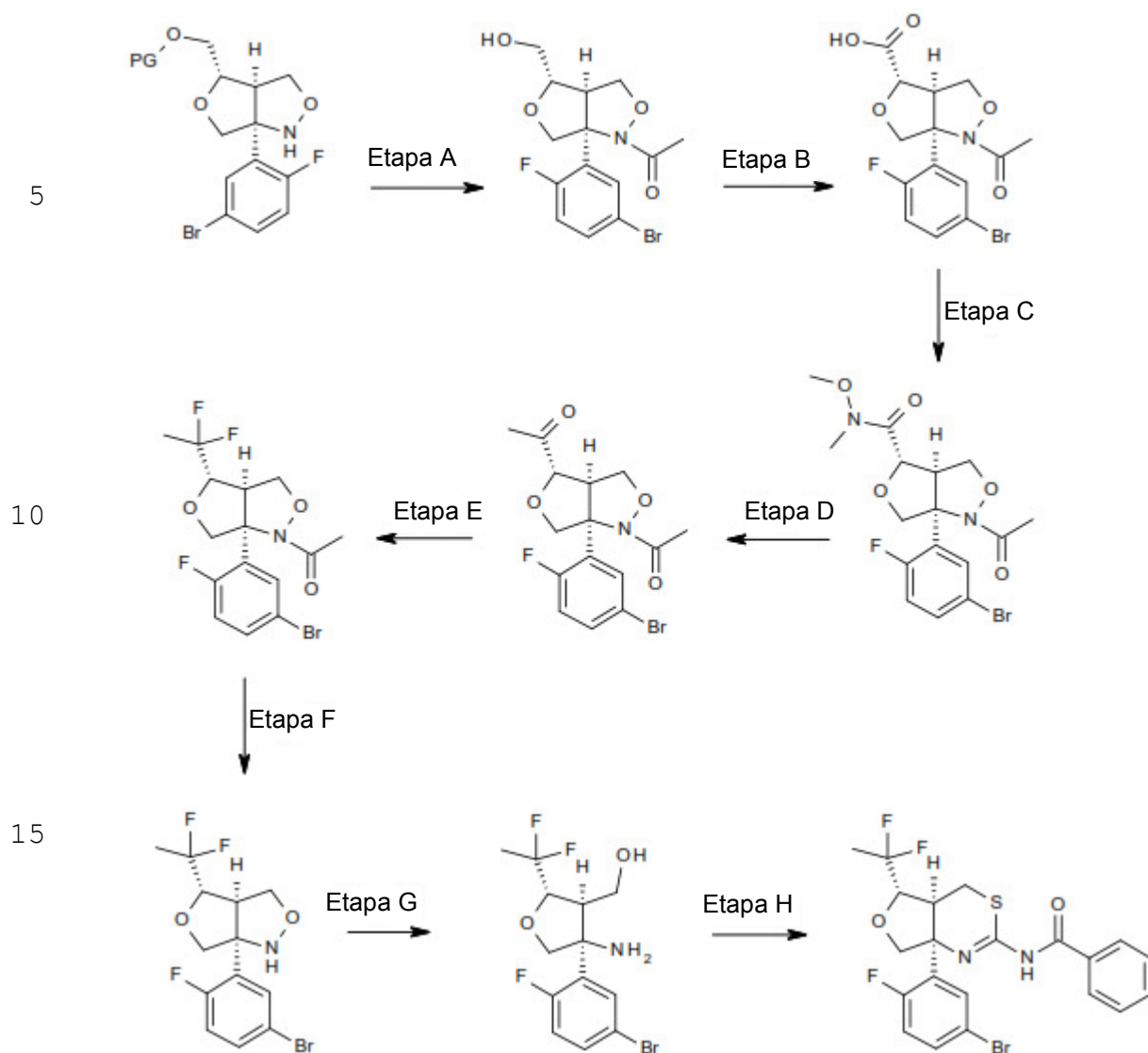
20

25

se puede se añadió directamente al producto del Esquema de reacción 1a, Etapa A a una temperatura de aproximadamente 5°C para producir el producto del Esquema de reacción 1a, Etapa B. El acetato de carbonilo se puede convertir a una oxima con
5 clorhidrato de hidroxilamina y acetato de sodio con calentamiento a aproximadamente 50°C para producir el producto del Esquema de reacción 1a, Etapa C. El producto oxima del Esquema de reacción 1a, Etapa C luego se puede convertir al producto del Esquema de reacción 1a, Etapa D (el
10 mismo producto que el Esquema de reacción 1, Etapa E) usando hidroquinona en un solvente tal como tolueno y calentamiento a reflujo. El producto de amina del Esquema de reacción 1a, Etapa D se puede acilar con cloruro de acetilo usando una base orgánica tal como DMAP y piridina en un solvente tal
15 como diclorometano a una temperatura de aproximadamente 0-5°C para producir el producto del Esquema de reacción 1a, Etapa E. El producto del Esquema de reacción 1a, Etapa E luego se puede convertir al producto del Esquema de reacción 2, Etapa A como se discute a continuación.

20

Esquema de reacción 2



En una ruta alternativa, como se describe en el Esquema de reacción 2, el isoxazol nitrógeno del compuesto del Esquema de reacción 1, Etapa E, se protegió con un grupo acetilo y el grupo protector del hidroximetilo se removió en un procedimiento de dos etapas. Por ejemplo, el tetrahydroisoxazol se trató con una base orgánica tal como

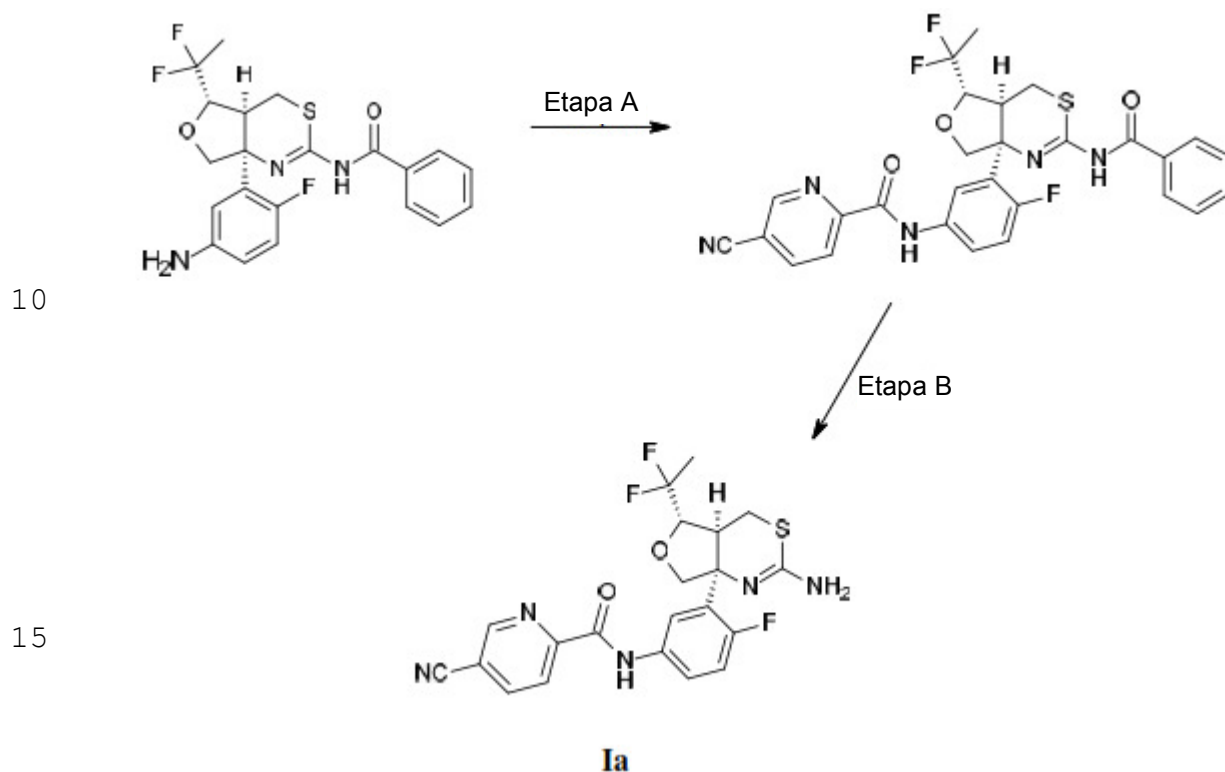
DMAP y se añadió piridina en un solvente tal como diclorometano y cloruro de acetilo. La temperatura se mantuvo por debajo de aproximadamente 10°C y luego se dejó agitar a aproximadamente temperatura ambiente. La reacción se diluyó con agua y se extrajo con un solvente tal como diclorometano. Los extractos orgánicos se lavaron con un ácido acuoso tal como ácido clorhídrico 1 N y lo acuoso se extrajo de nuevo con un solvente tal como diclorometano seguido por un lavado acuoso. El solvente orgánico se removi6 parcialmente y se añadió un ácido tal como ácido fórmico para desproteger el hidroximetilo. La mezcla se puede agitar a temperatura ambiente o se calienta a una temperatura de aproximadamente 40°C hasta que la desprotección del hidroxilo se completó para producir el compuesto del Esquema de reacción 2, Etapa A. El producto hidroximetilo del Esquema de reacción 2, Etapa A se puede oxidar al producto de ácido carboxílico del Esquema de reacción 2, Etapa B de una manera análoga al procedimiento descrito en el Esquema de reacción 1, Etapa J, y la amida de Weinreb se puede preparar adicionalmente de una manera análoga al procedimiento descrito en el Esquema de reacción 1, Etapa K usando un agente de acoplamiento tal como CDI en una adición en porciones con un solvente tal como diclorometano, enfriamiento a -20°C y agitación durante aproximadamente 1 hora y adición de clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina en porciones. Adiciones adicionales de

CDI y N,O-dimetilhidroxilamina se pueden se añadió hasta que se observa una reacción completa para producir el producto de amida de Weinreb del Esquema de reacción 2, Etapa C. La cetona del Esquema de reacción 2, Etapa D se puede formar a partir de la amida de Weinreb de una manera análoga al procedimiento descrito en el Esquema de reacción 1, Etapa L. La cetona de la Etapa D se puede convertir a un grupo difluoroetilo de una manera análoga al procedimiento descrito en el Esquema de reacción 1, Etapa M para producir el producto del Esquema de reacción 2, Etapa E. El acetil tetrahydroisoxazol se puede desproteger bajo condiciones ácidas bien conocidas en la técnica tal como usando ácido clorhídrico y calentamiento a aproximadamente 100°C para producir el producto del Esquema de reacción 2, Etapa F. La tetrahydroisoxazol bicíclica se puede tratar con zinc en ácido acético para formar el producto de anillo abierto del Esquema de reacción 2, Etapa G de una manera análoga al procedimiento descrito en el Esquema de reacción 1, Etapa F. El producto tiazina del Esquema de reacción 2, Etapa H se puede preparar en una reacción de 2 etapas de un recipiente usando isotiocianato de benzoilo en una de manera análoga al procedimiento descrito en el Esquema de reacción 1, Etapa G y H. La mezcla se evaporó a un residuo y se añadió ciclohexano. La mezcla se calentó a aproximadamente 60°C y se añadió éter metil *terc*-butílico para disolver el residuo. La solución se

filtró y se concentró hasta sequedad. El anillo de tiazina luego se puede formar de una manera análoga al procedimiento descrito en el Esquema de reacción 1, Etapa H para producir el producto del Esquema de reacción 2, Etapa H.

5

Esquema de reacción 3



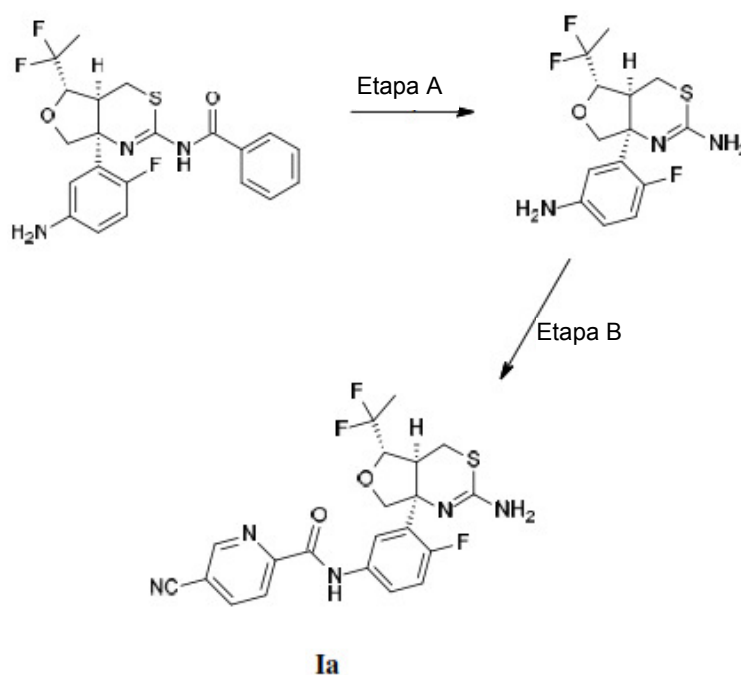
En el Esquema de reacción 3, Etapa A, el producto de anilina del Esquema de reacción 1, Etapa N se puede acoplar con un ácido carboxílico heteroaromático usando condiciones de acoplamiento bien conocidas en la técnica. Un experto ordinario en la técnica reconocerá que hay una serie de métodos y reactivos para la formación de amidas que resultan de la reacción de ácidos carboxílicos y aminas. Por ejemplo, la reacción de una anilina apropiada con un ácido

20

25

apropiado en la presencia de un reactivo de acoplamiento y una base de amina tal como DIPEA o trietilamina, producirá un compuesto del Esquema de reacción 3, Etapa A. Los reactivos de acoplamiento incluyen carbodiimidas tales como DCC, DIC, EDCI, y oximas aromáticas tales como HOBt y HOAt. Adicionalmente, las sales de uronio o fosfonio de aniones no nucleofílicos tales como HBTU, HATU, PyBOP, y PyBrOP o un anhídrido fosfórico cíclico tal como anhídrido propilfosfónico (T3P®) se pueden usar en lugar de los reactivos de acoplamiento más tradicionales. Aditivos tal como DMAP se pueden usar para mejorar la reacción. Alternativamente, la amina anilina se puede acilar usando cloruros de benzoilo sustituidos en la presencia de una base tal como trietilamina o piridina. En el Esquema de reacción 3, Etapa B, la amina tiazina protegida luego se puede desproteger con una base orgánica tal como piridina y clorhidrato de O-metilhidroxilamina en solventes tales como THF y etanol y una base orgánica tal como piridina para proporcionar el compuesto de la Fórmula Ia. Alternativamente, una base inorgánica tal como hidróxido de litio en metanol se puede usar para desproteger la tiazina para proporcionar el compuesto de la Fórmula Ia.

Esquema de reacción 4



Alternativamente, en el Esquema de reacción 4, Etapa A, el producto de anilina del Esquema de reacción 1, Etapa N se puede desproteger bajo condiciones estándar bien conocidas en la técnica, por ejemplo con una base orgánica tal como piridina y clorhidrato de O-metilhidroxilamina en solventes tales como THF y etanol para proporcionar el compuesto diamino desprotegido. Alternativamente una base inorgánica tal como hidróxido de litio en metanol se puede usar para la desprotección para proporcionar el compuesto diamino desprotegido.

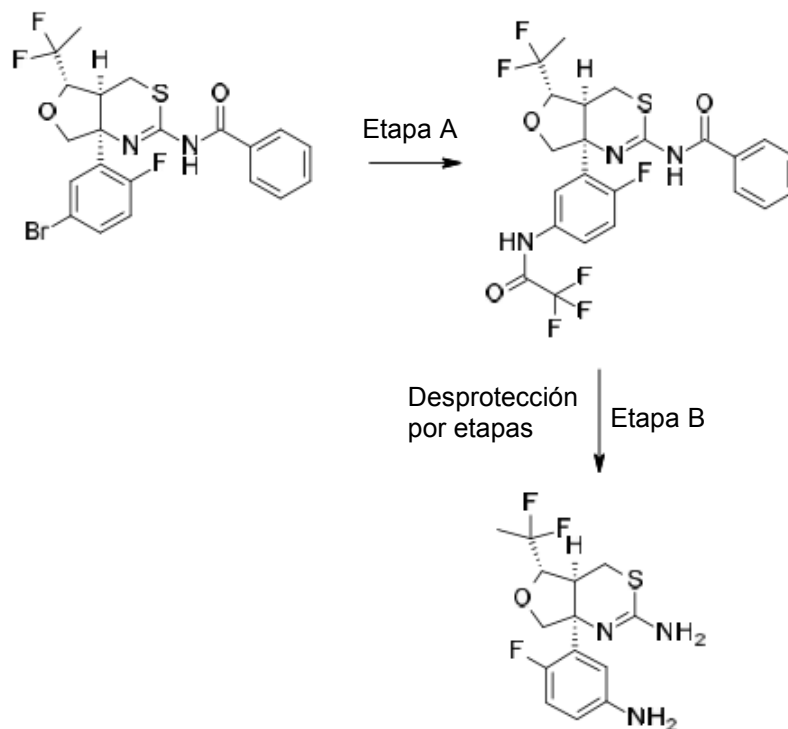
En el Esquema de reacción 4, Etapa B, el compuesto diamino desprotegido luego se puede acoplar selectivamente en el grupo amino anilina con un ácido carboxílico heteroaromático usando condiciones de acoplamiento bien

conocidas en la técnica para proporcionar el compuesto de la
Fórmula Ia. Un experto ordinario en la técnica reconocerá que
hay una serie de métodos y reactivos para la formación de
amidas que resultan de la reacción de ácidos carboxílicos y
5 aminas. Por ejemplo, la reacción de una amina apropiada con
un ácido apropiado en la presencia de un reactivo de
acoplamiento y una base de amina tal como DIPEA o
triethylamina, proporcionará un compuesto de la Fórmula Ia.
Los reactivos de acoplamiento incluyen carbodiimidas tales
10 como DCC, DIC, EDCI, y oximas aromáticas tales como HOBT y
HOAt. Adicionalmente, las sales de uronio o fosfonio de
aniones no nucleofílicos tales como HBTU, HATU, PyBOP, y
PyBrOP o un anhídrido fosfórico cíclico tal como anhídrido
propilfosfónico (T3P®) se pueden usar en lugar de los
15 reactivos de acoplamiento más tradicionales. Aditivos tal
como DMAP se pueden usar para mejorar la reacción.

20

25

Esquema de reacción 5



5

10

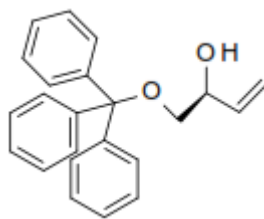
Alternativamente, en el Esquema de reacción 5, el producto bromuro del Esquema de reacción 1, Etapa M se convirtió a una anilina protegida usando trifluoroacetamida, yoduro de cobre, una diamina tal como trans, racémica-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexano diamina, una base inorgánica tal como carbonato de potasio, y yoduro de sodio con calentamiento a aproximadamente 100-130°C para producir el producto de anilina protegida del Esquema de reacción 5, Etapa A. La anilina protegida y tiazina amina luego se pueden desproteger por etapas. La trifluoroacetamida se puede hidrolizar usando una base tal como amoníaco 7N en metanol para producir una anilina y tiazina protegida, el mismo producto del Esquema de reacción 1, Etapa N. La tiazina luego se puede desproteger

bajo condiciones bien conocidas en la técnica y descritas en el Esquema de reacción 4, Etapa A usando clorhidrato de O-metilhidroxilamina en un solvente tal como etanol y THF con una base orgánica tal como piridina seguido por calentamiento a aproximadamente 55°C o agitación a temperatura ambiente seguida por concentración y purificación para producir el producto del Esquema de reacción 5, Etapa B. Alternativamente, el orden de desprotección se podría invertir con la tiazina desprotegida primero y la anilina desprotegida a lo último.

Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Preparación 1

(2S)-1-Tritiloxibut-3-en-2-ol



Esquema de reacción 1, etapa A: Se agitó yoduro de trimetilsulfonio (193.5 g, 948.2 mmol) en THF (1264 ml) a temperatura ambiente durante 75 minutos. La mezcla se enfrió a -50°C y se añadió n-butil litio (2.5 mol/L en hexanos, 379 ml, 948.2 mmol) vía una cánula, durante un período de 30 minutos. La reacción se dejó calentar gradualmente a -30°C y se agitó durante 60 minutos. Se añadió (2S)-2-tritiloximetil

oxirano (100 g, 316,1 mmol) en porciones, manteniendo la temperatura por debajo de -10°C . Después de la adición completa, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La reacción
5 se vertió en cloruro de amonio saturado, se separaron las fases, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de magnesio. Se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para producir un residuo. El residuo se purificó por
10 cromatografía en gel de sílice, eluyendo con éter metil t-butílico:hexanos (10-15% de gradiente), para producir el compuesto del título (56.22 g, 54%). ES/MS m/z 353 ($M+\text{Na}$).

Preparación Alternativa 1

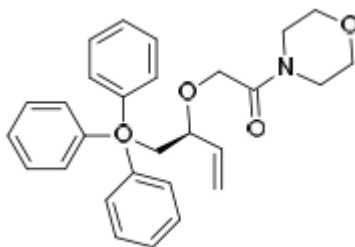
(2S)-1-Tritiloxibut-3-en-2-ol

15 Material de partida del Esquema de reacción 1a, Etapa A: Se añadió cloruro de trifenilmetilo (287 g, 947.1 mmol), DMAP (7.71 g, 63.1 mmol) y trietilamina (140 g, 1383.5 mmol) a una solución de (2S)-but-2-eno-1,2-diol (preparado como en JACS, 1999, 121, 8649) (64.5 g, 631 mmol) en
20 diclorometano (850 ml). Se agitó durante 24 horas a 24°C . Se añadió ácido cítrico acuoso 1 N (425 ml). Las capas se separaron y el extracto orgánico se concentró bajo presión reducida hasta sequedad. Se añadió metanol (900 ml) y se enfrió a 5°C durante 1 hora. Los sólidos se recolectaron por
25 filtración y se lavaron con metanol a 5°C (50 ml). Los

sólidos se desecharon y el licor madre se concentró bajo presión reducida hasta sequedad. Se añadió tolueno (800 ml) y se concentró a una masa de 268 g para obtener el compuesto del título (129 g, 67%) en una solución a 48% en peso de tolueno.

Preparación 2

1-Morfolino-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]etanona

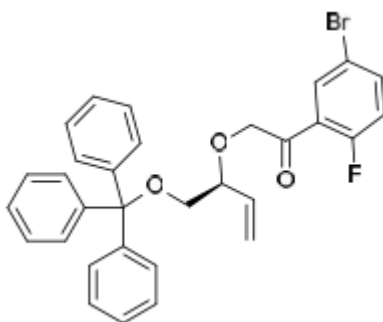


Esquema de reacción 1a, Etapa A: Se añadió sulfato ácido de tetrabutyl amonio (83.2 g, 245.0 mmol) y 4-(2-cloroacetil)morfolina (638.50 g, 3902.7 mmol) a una solución de 1-tritoloxibut-3-en-2-ol (832.4, 2519 mmol) en tolueno (5800 ml) que estuvo entre 0 y 5°C. Se añadió hidróxido de sodio (1008.0 g, 25202 mmol) en agua (1041 ml). Se agitó durante 19 horas entre 0 y 5°C. Se añadió agua (2500 ml) y tolueno (2500 ml). Las capas se separaron y el extracto orgánico se lavó con agua (2 × 3500 ml). El extracto orgánico se concentró bajo presión reducida hasta sequedad. Se añadió tolueno (2500 ml) al residuo y luego se añadió n-heptano (7500 ml) lentamente. Se agitó durante 16 horas. Los sólidos resultantes se recolectaron por filtración y se lavaron con n-heptano (1200 ml). El sólido se secó bajo vacío para

obtener el compuesto del título (1075.7 g, 98%).

Preparación 3

1-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]etanona

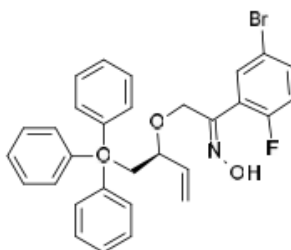


Esquema de reacción 1a, Etapa B: Se añadió una solución 1.3 M de complejo de cloruro de isopropil magnesio-cloruro de litio (3079 ml, 2000 mmol) en THF a una solución de 4-bromo-1-fluoro-2-yodobenceno (673.2 g, 2237.5 mmol) en tolueno (2500 mL) a una velocidad para la temperatura se mantuvo de reacción por debajo de 5°C. Se agitó durante 1 hora. Se añadió la solución de Grignard resultante (5150 mL) a una solución de 1-morfolino-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]-etanona (500 g, 1093 mmol) en tolueno (5000 mL) a una velocidad para la temperatura se mantuvo de reacción por debajo de 5°C. Se agitó durante 3 horas manteniendo la temperatura por debajo de 5°C. Se añadió solución de Grignard preparada adicional (429 mL) y se agitó durante 1 hora. Se añadió una solución acuosa de ácido cítrico 1 N (5000 mL) a una velocidad para la temperatura se mantuvo por debajo de 5°C. Las capas se separaron y el

extracto orgánico se lavó con agua (5000 mL). La solución se concentró bajo presión reducida hasta sequedad. Se añadió metanol (2000 mL) al residuo y se concentró para producir el compuesto del título como un residuo (793 g, 73.4% de potencia, 83%).

Preparación 4

1-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]etanona oxima

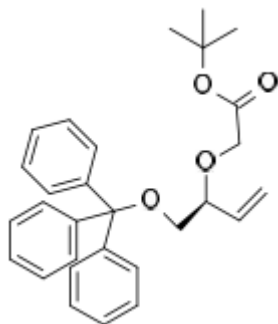


Esquema de reacción 1a, Etapa C: Se añadió clorhidrato de hidroxilamina (98.3 g) a 1-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]etanona (450 g, 707 mmol) y acetato de sodio (174 g) en metanol (3800 mL). La solución se calentó a 50°C durante 2 horas. Se enfrió a 24°C y se concentró. Se añadió agua (1000 mL) y tolueno (1500 mL) al residuo. Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con tolueno (500 mL). El extracto orgánico se combinó y se lavó con agua (2 × 400 mL). La solución se concentró bajo presión reducida para producir el compuesto del título como un residuo (567 g, 61.4% de potencia, 88%).

Preparación 5

2-[(1S)-1-(Tritiloximetil)aliloxi]acetato de *terc*-butilo

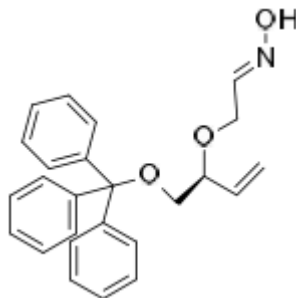
5



Esquema de reacción 1, Etapa B: Se añadió (2S)-1-tritiloxibut-3-en-2-ol (74.67 g, 226.0 mmol) a una solución de sulfato de tetra-N-butilamonio (13.26 g, 22.6 mmol) en
 10 tolueno (376 mL). Se añadió hidróxido de sodio (50% en masa) en agua (119 mL) seguido por *terc*-butil-2-bromoacetato (110.20 g, 565.0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Se vertió en agua, las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con
 15 acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de magnesio. La mezcla se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir el compuesto del título (77.86 g, 77%). ES/MS m/z 467 ($M+Na$).

Preparación 6

20 (1E)-2-[(1S)-1-(Tritiloximetil)aliloxi]acetaldehído oxima



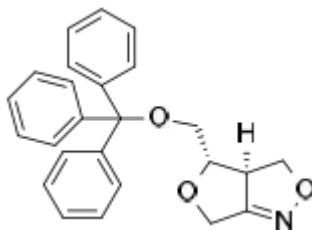
25

Esquema de reacción 1, Etapa C: Se enfrió una solución de 2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]acetato de *terc*-butilo (77.66 g, 174.7 mmol) en diclorometano (582.2 mL) a -78°C. Se añadió una solución de hidruro de diisobutilaluminio en hexanos (1 mol/L, 174.7 mL) por goteo durante un período de 35 minutos y la temperatura se mantuvo por debajo de -70°C. Se agitó a -78°C durante 5 horas. Se añadió ácido clorhídrico en agua (2 mol/L, 192.1 mL) a la mezcla de reacción por goteo, manteniendo la temperatura por debajo de -60°C. La reacción se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 60 minutos. El extracto orgánico se separó y se lavó con bicarbonato de sodio saturado. La solución se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir un residuo. El residuo se disolvió en diclorometano. Se añadió acetato de sodio (28.66 g, 349.3 mmol), seguido por clorhidrato de hidroxilamina (18.21 g, 262.0 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se vertió en agua, las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de magnesio. La mezcla se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir el compuesto del título (68.38 g, 101%). ES/MS m/z 386 (M-H).

Preparación 7

(3aR,4S)-4-(Tritiloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-

c]isoxazol



5

Esquema de reacción 1, Etapa D: Se enfrió una solución de (1E)-2-[(1S)-1-(trityloximetil)aliloxil]acetaldehído oxima (55.57 g, 143.4 mmol) en éter *terc*-butil metílico (717 mL) a 5°C. Se añadió hipoclorito de sodio (5% en agua, 591 ml, 430.2 mmol) por goteo, manteniendo la temperatura por debajo de 10°C. Se agitó a 10°C durante 30 minutos. La reacción se dejó se calentó a 15°C. Se agitó a 15°C durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con bicarbonato de sodio saturado. Las fases se separaron, la fase orgánica se lavó con una solución de 5% sulfito ácido de sodio y salmuera. La solución se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con 50% de éter metil *terc*-butílico/diclorometano:hexanos (20-27% de gradiente), para producir el compuesto del título (35.84 g, 65%). ES/MS m/z 408 (M+Na).

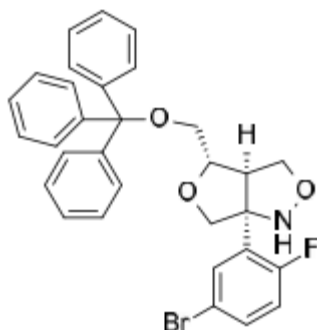
Preparación 8

(3aR,4S,6aR)-6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(trityloximetil)-

25

3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol

5



Esquema de reacción 1, Etapa E: Se enfrió una solución de 4-bromo-1-fluoro-2-yodo-benceno (86.94 g, 288.9 mmol) en THF (144.5 mL) y tolueno (1445 mL) a -78°C . Se añadió n-butil-litio (2.5 M en hexanos, 120 mL, 288.9 mmol) por goteo, manteniendo la temperatura por debajo de -70°C . Se agitó durante 30 minutos a -78°C . Se añadió dietil eterato de trifluoruro de boro (36.5 mL, 288.9 mmol) por goteo, manteniendo la temperatura por debajo de -70°C . La solución se agitó durante 30 minutos a -78°C . Se añadió una solución de (3aR,4S)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol (55.69 g, 144.5 mmol) en THF (482 mL) por goteo a la reacción, durante un período de 30 minutos, manteniendo la temperatura por debajo de -65°C . Se agitó a -78°C durante 90 minutos. Rápidamente se añadió cloruro de amonio saturado, manteniendo la temperatura por debajo de -60°C . Se vertió en salmuera y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se combinó y se secó sobre sulfato de magnesio. Se filtró y se concentró bajo presión reducida para

producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 100% de hexanos a 30% de hexanos/70% de éter dietílico, para producir el compuesto del título (36.52 g, 45%). ES/MS *m/e* (⁷⁹Br/⁸¹Br) 560/562 [M+H].

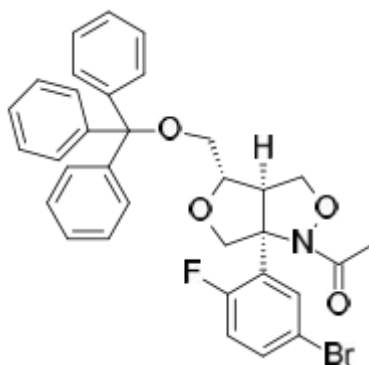
Preparación Alternativa 8

Esquema de reacción 1a, Etapa D: Se calentó una solución de 1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]etanona oxima (458 g, 502 mmol) e hidroxiquinona (56.3g 511 mmol) en tolueno (4000 mL) a reflujo bajo nitrógeno durante 27 horas. La solución se enfrió a 24°C y se añadió carbonato de sodio acuoso (800 mL). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con tolueno (300 mL). El extracto orgánico se combinó y se lavó con agua (2 × 500 mL). La solución se concentró bajo presión reducida para producir un residuo. Se añadió alcohol isopropílico (1500 mL) y se calentó a reflujo. Se enfrió a 24°C y los sólidos se recolectaron por filtración. El sólido se secó bajo vacío para obtener el compuesto del título (212 g, 75%).

Preparación 9

1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-1-il]etanona

5



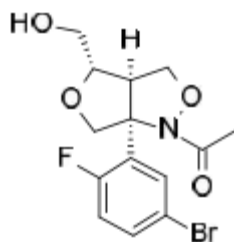
Esquema de reacción 1a, Etapa E: Se añadió cloruro de acetilo (35.56 g, 503.9 mmol) a una solución de (3aR,4S,6aR)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-
 10 3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol (235.3 g, 420 mmol), DMAP (5.13 g, 42.0 mmol), y piridina (66.45 g, 840.1 mmol) en diclorometano (720 mL) bajo nitrógeno, manteniendo la temperatura interna por debajo de 5°C. Se agitó durante 1 hora y luego se añadió agua (300 mL) y ácido sulfúrico 1 M
 15 (300 mL). La mezcla se agitó durante 10 minutos y las capas se dejaron separar. El extracto orgánico se recolectó y se lavó con carbonato de sodio saturado (500 mL) y agua (500 mL). La solución se secó sobre sulfato de magnesio. Se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir 1-
 20 [(3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-1-il]etanona (235 g, 93%) como un sólido gris.

Preparación 10

1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)tetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-1-

25

il]etanona



5

Esquema de reacción 2, Etapa A: En un reactor con
 camisa de 20 L se añadió cloruro de acetilo (290 ml, 4075
 mmol) a una solución de (3aR,4S,6aR)-6a-(5-bromo-2-fluoro-
 fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-
 10 c]isoxazol (1.996 g, 3.384 mmol), DMAP (56.0 g, 458 mmol),
 piridina (500 ml, 6180 mmol) en diclorometano (10 L) bajo
 nitrógeno manteniendo la temperatura interna por debajo de
 10°C. Después de la adición completa (1 hora) se calentó a
 20°C y se agitó durante la noche. Si la reacción no se
 15 completó, se añadió cloruro de acetilo, DMAP, piridina, y
 diclorometano hasta que se observó una reacción completa. La
 mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se añadió lentamente
 agua (5 L), la mezcla de reacción se agitó a 10°C durante 30
 minutos y las capas se dejaron separar. El extracto orgánico
 20 se recolectó y se lavó lo acuoso con diclorometano (1 L). Los
 extractos orgánicos combinados se lavaron con ácido
 clorhídrico acuoso 1 N (2 × 4 L), lo acuoso se extrajo con
 diclorometano (2 × 1 L). Los extractos orgánicos combinados
 se lavaron con agua (4 L) y el solvente se removió bajo
 25 presión reducida para producir el volumen total de

aproximadamente 5 L. Se añadió 90% ácido fórmico (1800 mL) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 días. Se calentó a 40°C durante 2 horas, luego el solvente se removió bajo presión reducida. El residuo se diluyó con metanol (4 L) y se añadió lentamente carbonato de sodio acuoso saturado (3 L). Se añadió carbonato de sodio sólido (375 g) para ajustar el pH a 8-9. Se agitó a 45°C durante 1 hora luego se enfrió a temperatura ambiente. Los sólidos se removieron por filtración, lavando con metanol (4 × 500 mL), luego se trató con hidróxido de sodio acuoso 2 N (100 mL) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Los sólidos se removieron por filtración, lavando con metanol (2 × 100 mL). El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se dividió entre acetato de etilo (5 L) y agua (2 L). Lo acuoso se extrajo con acetato de etilo (2 L) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (2 × 1 L). El solvente se removió bajo presión reducida, se añadió éter metil terc-butílico (2.5 L) y se evaporó hasta sequedad. Se añadió éter metil terc-butílico (4 L) y se agitó a 65°C durante 1 hora, se enfrió a temperatura ambiente y los sólidos se recolectaron por filtración, lavando con éter metil terc-butílico (3 × 500 mL). Se secó bajo vacío a un sólido beige. Este sólido se calentó en tolueno (7.5 L) a 110°C hasta disolución completa, se enfrió a 18°C durante 1 hora, y se agitó a esta temperatura durante 1 hora. Se

calentó a 40°C y cuando se formó un precipitado, se enfrió a 18°C una vez más. Se agitó durante 45 minutos y luego los sólidos se recolectaron por filtración, lavando con tolueno (2 × 500 mL). El sólido se secó bajo vacío para obtener el compuesto del título (443.1 g, 36%, 95% de pureza por LCMS). El filtrado se evaporó bajo vacío para producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en gel de sílice, eluyendo con 20% a 100% de acetato de etilo en isohexano. El producto se formó en pasta aguada que contiene fracciones de éter metil terc-butílico (2 L) a 60°C durante 30 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y los sólidos se recolectaron por filtración, lavando con éter metil terc-butílico (2 × 200 mL). Los sólidos se secaron bajo vacío para producir el compuesto del título como un sólido cristalino beige (304 g, 24%, 88% de pureza por LCMS). El filtrado se evaporó bajo vacío a un residuo. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en gel de sílice, eluyendo con 20% a 100% de acetato de etilo en isohexano para producir el compuesto del título (57.8 g, 5%, 88% de pureza por LCMS). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 360.0/362.0 [M+H].

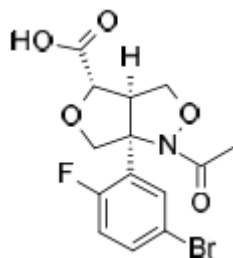
Preparación Alternativa 10

Esquema de reacción 2, Etapa A: Se añadió 1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-1-il]etanona (69 g, 114.5 mmol) a una solución a 15°C de monohidrato de ácido p-

toluensulfónico (2.2 g, 11.45 mmol), diclorometano (280 mL) y metanol (700 mL). Se agitó durante 18 horas y luego el solvente se removi6 bajo presi6n reducida. El residuo se diluy6 con diclorometano (350 mL) y se a1adi6 carbonato de sodio acuoso 1 M (140 mL) y agua (140 mL). Las capas se separaron y la capa org6nica se evapor6 bajo presi6n reducida. Se a1adi6 tolueno (350 mL) al residuo y se calent6 a reflujo durante 1 hora. Se enfri6 a 10-15°C a una velocidad de 10°C/hora. Los s6lidos se recolectaron por filtraci6n y se lavaron con tolueno (70 mL). El s6lido se sec6 bajo vaci6 para obtener el compuesto del t6tulo (30 g, 65%) como un s6lido gris.

Preparaci6n 11

15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000



20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

enfrió a una temperatura interna de 5°C. Se añadió (diacetoxiyodo)benceno (1693 g, 4993.43 mmol) en porciones durante 30 minutos. La exoterma se controló usando enfriamiento del reactor y luego se mantuvo a 20°C hasta que
5 la LCMS mostró una reacción completa. Se añadió lentamente una suspensión de bisulfito de sodio (70 g, 672.68 mmol) en agua (300 mL) a temperatura ambiente, manteniendo la temperatura interna por debajo de 25°C. Se agitó durante 30 minutos y luego se enfrió a 5°C. Se añadió agua (2 L), luego
10 se añadió lentamente 47% en peso de hidróxido de sodio acuoso (780 mL) durante un período de 1 hora manteniendo la temperatura interna por debajo de 10°C. Se añadió acetato de etilo (2 L) e isohexano (5 L), se agitó vigorosamente y las capas se separaron. Las capas orgánicas bifásicas se
15 extrajeron con agua (1 L) y lo acuosa combinado se lavó con éter metil terc-butílico (2.5 L). Los extractos acuosos se enfriaron a 5°C y se añadió lentamente 37% ácido clorhídrico (1.4 L) durante 30 minutos manteniendo la temperatura interna alrededor de 5°C. Se añadió acetato de etilo (5 L), las capas
20 se separaron y lo orgánico se lavó con salmuera (3 × 1 L). Los extractos acuosos combinados se extrajeron con acetato de etilo (2.5 L), las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1 L), luego se secaron con sodio sulfato, y se filtraron. Los orgánicos se diluyeron con heptano (2.5 L) y
25 se evaporaron hasta sequedad bajo presión reducida. Se añadió

éter metil terc-butílico (1.5 L) y heptano (1.5 L) y se evaporó hasta sequedad. Se añadió heptano (2.5 L) y se evaporó hasta sequedad dos veces. Se añadió heptano (500 mL) y éter metil terc-butílico (500 mL) y se agitó a 40°C durante 5 30 minutos, luego el precipitado se recolectó por filtración, lavando con heptano/éter metil terc-butílico (1:1, 1 L), luego éter metil terc-butílico (3 × 300 mL) y se secó con aire para producir el compuesto del título como un sólido cristalino beige (779 g, 91%). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 10 374.0/376.0 [M+H]. $[\alpha]_D^{20} = -19.0^\circ$ (C = 1.004, cloroformo).

Preparación Alternativa 11

Esquema de reacción 2, Etapa B: Se añadió agua (150 mL) y acetonitrilo (150 mL) a 1-[(4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4- 15 c]isoxazol-1-il]etanona (30 g, 73.3 mmol), TEMPO (1.14 g, 7.30 mmol) y (diacetoxiyodo)benceno (51.9 g, 161 mmol). Se enfrió a 15°C y se agitó durante 2 horas. Se añadió lentamente tiosulfato de sodio (21 g) y carbonato de potasio (22 g) en agua (150 mL) a temperatura ambiente. Se agitó 20 durante 1 hora y luego se añadió éter metil terc-butílico (150 mL). Las capas se separaron y el pH de la capa acuosa se ajustó a 2-3 con ácido sulfúrico concentrado. Se añadió acetato de etilo (150 mL) y las capas se separaron. La capa orgánica se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida. Se 25 añadió n-heptano (90 mL) y se calentó a reflujo durante 1

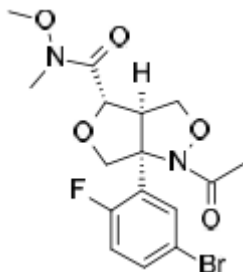
hora. Se enfrió a 15°C y luego el precipitado se recolectó por filtración, lavando con n-heptano (90 mL). Se secó bajo vacío para producir el compuesto del título como un sólido blanco (27 g, 98%).

5

Preparación 12

(3aR,4S,6aS)-1-Acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-N-metoxi-N-metiltetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-4-carboxamida

10



Esquema de reacción 2, Etapa C: En un reactor con camisa de 10 L, se enfrió una solución de ácido (3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-4-carboxílico (771 g, 2.019 mmol) en diclorometano (7.0 L) a 0°C bajo nitrógeno y se añadió CDI (400 g, 2421 mmol) en porciones durante 40 minutos. Se enfrió la camisa del reactor a -20°C y se agitó durante 1 hora y luego se añadió clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (260.0 g, 2612 mmol) en porciones durante aproximadamente 30 minutos. Se agitó a -20°C durante 1 hora, a 0°C durante 2 horas, y a 10°C durante 7 horas. Se añadió CDI (175 g, 1058 mmol) y se agitó a 10°C durante la noche. Se añadió CDI adicional (180 g, 1088 mmol) a 10°C y se

agitó durante 1 hora, luego se añadió clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (140 g, 1407 mmol) y la agitación se continuó a 10°C. Si la reacción estuvo incompleta, se hicieron cargas adicionales de CDI seguido por clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina que se observó una reacción completa. La mezcla de reacción se enfrió a 5°C y se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 N (5 L) y luego ácido clorhídrico acuoso 2 N (5 L). La solución acuosa combinada se extrajo con diclorometano (1 L), el extracto orgánico se combinó y se lavó con agua (2.5 L), hidróxido de sodio acuoso 1 N (2.5 L), y agua (2.5 L), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se evaporó bajo presión reducida para producir un residuo. Se añadió éter metil terc-butílico (3 L) y se evaporó bajo presión reducida. Se añadió éter metil terc-butílico adicional (2 L) y se agitó a 50°C durante 1 hora, se enfrió a 25°C y se agitó durante 30 minutos. Los sólidos resultantes se recolectaron por filtración, se lavaron con éter metil terc-butílico (2 × 500 mL) y se secaron bajo vacío para producir el compuesto del título (760 g, 88%) como un sólido blanco. ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 417.0/419.0 [M+H].

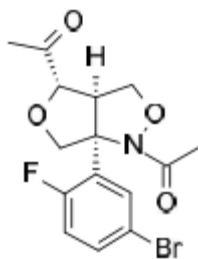
Preparación Alternativa 12

Esquema de reacción 2, Etapa C: Se enfrió una solución de ácido (3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-4-carboxílico (27 g, 70.7 mmol) en N,N-dimetilformamida (135 mL) a 0°C bajo

nitrógeno y se añadió CDI (14.9 g, 91.9 mmol). Se agitó
 durante 1 hora y luego se añadió clorhidrato de N,O-
 dimetilhidroxilamina (9.0 g, 92 mmol) y trietilamina (14.3 g,
 141 mmol). Se agitó a 15°C durante 16 horas. La mezcla de
 5 reacción se enfrió a 0°C y se añadió ácido sulfúrico acuoso
 0.5 M (675 mL). Se agitó durante 1 hora. Los sólidos
 resultantes se recolectaron por filtración. Los sólidos se
 formaron en pasta aguada en éter metil terc-butílico (90 mL)
 durante 1 hora. Los sólidos se recolectaron por filtración,
 10 se lavaron con éter metil terc-butílico (30 mL). Se secaron
 bajo vacío para producir el compuesto del título (23 g, 78%)
 como un sólido.

Preparación 13

1-[(3aR,4S,6aS)-1-Acetil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-
 15 3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-4-il]etanona



20 Esquema de reacción 2, Etapa D: En un reactor con
 camisa de 20 L, se enfrió una solución de (3aR,4S,6aS)-1-
 acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-N-metoxi-N-metiltetrahidro-
 1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-4-carboxamida (654.0 g, 1536
 mmol) en THF (10 L) a -60°C y se añadió una solución de
 25 bromuro de metilmagnesio 3.2 M en 2-metiltetrahidrofurano

(660 ml, 2110 mmol) por goteo, mientras se mantuvo la temperatura interna por debajo de -40°C . La mezcla de reacción se agitó a -40°C durante 30 minutos, luego se enfrió a -50°C y se añadió una solución de ácido clorhídrico acuoso 1 N (2 L) en THF (2 L) manteniendo la temperatura interna por debajo de -38°C . La temperatura se aumentó a 10°C y se añadió acetato de etilo (5 L) y agua (1 L), se agitó y se dejó que la temperatura interna alcanzara 5°C y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (1 L) y los extractos orgánicos se combinaron. Los extractos orgánicos se lavaron con agua (2 L) y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (1 L). El extracto orgánico se combinó y se lavó con salmuera (3×2 L) luego se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se evaporó bajo presión reducida a un residuo. Se añadió ciclohexano (2.5 L), se agitó a 60°C durante 1 hora, luego a 20°C durante 30 minutos, y el sólido se recolectó por filtración, se lavó con ciclohexano (500 mL). El sólido se secó bajo vacío para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (565 g, 99%). ES/MS: m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 372.0/374.0 $[\text{M}+\text{H}]$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -58.0^{\circ}$ (C = 1.000, cloroformo).

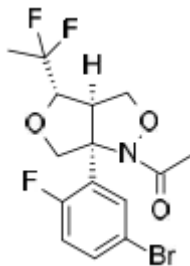
Preparación Alternativa 13

Esquema de reacción 2, Etapa D: Se enfrió una solución de (3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-N-metoxi-N-metiltetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-4-

carboxamida (4.0 g, 9.59 mmol) en THF (60 mL) a -5°C y se
 añadió una solución 3.0 M de bromuro de metilmagnesio en 2-
 metiltetrahidrofurano (5.0 mL, 15 mmol) por goteo, mientras
 se mantuvo la temperatura interna entre -5 y 0°C . La mezcla
 5 de reacción se agitó entre -5 y 0°C durante 60 minutos y
 luego se añadió una solución de cloruro de amonio saturado
 (20 mL). Se añadió éter metil terc-butílico (40 mL), se dejó
 que la temperatura interna alcanzara 5°C y las capas se
 separaron. La fase orgánica se evaporó bajo presión reducida
 10 a un residuo. Se añadió n-heptano (50 mL), se agitó, y el
 sólido se recolectó por filtración. El sólido se secó bajo
 vacío para obtener el compuesto del título como un sólido
 (3.0 g, 77%).

Preparación 14

15 1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluorofenil)-4-(1,1-
 difluoroetil)tetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-1-
 il]etanona



20

Esquema de reacción 2, Etapa E: Se añadió 1-
 [(3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-
 25 tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-4-il]etanona (5.08 g, 13.6

mmol) en una porción única a una suspensión agitada de tetrafluoroborato de difluoro(morfolino)sulfonio (10.02 g, 39.18 mmol) en diclorometano anhidro (100 mL) a 0-5°C. La mezcla se agitó durante 10 minutos y se añadió
5 trifluorohidrato de trietilamina (4.5 mL, 27 mmol) por goteo durante 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó en el baño de hielo durante 8 horas, luego se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se añadió carbonato de sodio acuoso saturado (100 mL) y se agitó durante 1 hora. Las
10 capas se separaron y lo acuoso se extrajo con diclorometano (2 × 50 mL). Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con bicarbonato de sodio acuoso saturado (100 mL), ácido clorhídrico acuoso 2 N (2 × 100 mL), y salmuera (100 mL). Se evaporaron hasta sequedad a un sólido marrón claro y
15 se disolvieron en éter metil terc-butílico (300 mL) a 60°C. La solución caliente se filtró y el filtrado se evaporó para producir un sólido marrón (5.3 g, 81%, 82% de pureza por LCMS) que se utilizó sin purificación adicional. ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 393.8/395.8 [M+H].

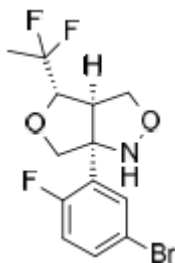
20 Preparación Alternativa 14

Esquema de reacción 2, Etapa E: Se añadió XtalFluor-M® (1.21 kg, 4.73 mol) en porciones a una solución agitada de 1-[(3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-4-il]etanona
25 (565 g, 1.51 mol) en diclorometano anhidro (5 L) a -14°C. La

mezcla se agitó durante 10 minutos y se añadió trifluorohidrato de trietilamina (550 g, 3.34 mol) por goteo durante 20 minutos. La mezcla de reacción se agitó a -10°C durante aproximadamente 10 horas, luego se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se añadió 50% hidróxido de sodio acuoso (750 mL) lentamente, manteniendo la temperatura interna por debajo de 10°C , luego se añadió agua (1.5 L) y carbonato ácido de sodio acuoso saturado (1 L) y se agitó durante 30 minutos. Las capas se separaron y lo acuoso se extrajo con diclorometano (1 L). Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con salmuera (3 L), ácido clorhídrico acuoso 2 N (5 L), y salmuera (3 L). Se evaporaron para producir un residuo y se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 50-100% de diclorometano en iso-hexano, luego 10% de éter metil terci-
butílico en diclorometano para producir el compuesto del título como un polvo blanco (467 g, 73%, 94% pureza por LCMS). ES/MS: m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 393.8/395.8 $[\text{M}+\text{H}]$.

Preparación 15

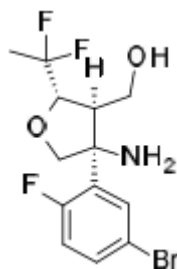
(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(1,1-difluoroetil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]isoxazol



Esquema de reacción 2, Etapa F: Se añadió 37% en peso de ácido clorhídrico acuoso (1.3 L, 16 mol) a una solución de 1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4-(1,1-difluoroetil)tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-1-
 5 il]etanona (570 g, 1.45 mol) en 1,4-dioxano (5 L) en un reactor con camisa de 10 L y se agitó a 100°C durante aproximadamente 3 horas o hasta que la LCMS mostró una reacción completa. La mezcla de reacción se enfrió a 10°C, se diluyó con agua (1 L) y se añadió una mezcla de 50% en peso
 10 de hidróxido de sodio acuoso (800 mL) y agua (1 L) lentamente, manteniendo la temperatura interna por debajo de 20°C. Se añadió acetato de etilo (2.5 L) y se agitó vigorosamente, antes las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (2 L), salmuera adicional (1
 15 L), y agua (1 L). Se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró hasta sequedad bajo presión reducida para producir un residuo. Se añadió ciclohexano (2.5 L) y se evaporó hasta sequedad y luego se repitió para obtener el compuesto del título como un aceite marrón (527 g, 89%, 86%
 20 de pureza por LCMS). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 351.8/353.8 [M+H].

Preparación 16

[(2S,3R,4S)-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(1,1-difluoroetil)tetrahydrofuran-3-yl]metanol



5

Esquema de reacción 2, Etapa G: Se añadió polvo de zinc (6.0 g, 92 mmol) a una solución de (3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(1,1-difluoroetil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]isoxazol (5.06 g, 13.4 mmol) en ácido acético (100 mL) a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (200 mL) y agua (300 mL) y se agitó vigorosamente mientras se adicionó carbonato de sodio (97 g, 915 mmol). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera (2 × 200 mL), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró para producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 0% a 100% de éter metil terc-butílico en isohexano para producir el compuesto del título como un sólido ceroso (4.67 g, 89%, 90% de pureza por LCMS). ES/MS: m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 354.0/356.0 [M+H].

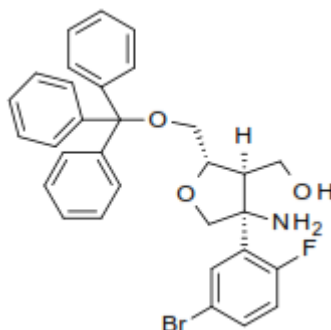
Preparación Alternativa 16

Esquema de reacción 2, Etapa G: Se añadió polvo de zinc (200 g, 3.06 mol) en porciones a una solución de (3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(1,1-difluoroetil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]isoxazol (304

g, 75% de pureza, 647 mmol) en ácido acético (2 L) y agua (2 L) a 20°C, luego se calentó a 40°C y se agitó durante la noche. La mezcla se diluyó con agua (2 L) y se agitó vigorosamente mientras se añadió carbonato de sodio (4 kg, 5 43.4 mol), luego el pH se ajustó a 8-9 con carbonato de sodio adicional. Se añadió acetato de etilo (5 L) y agua (2.5 L), se agitó durante 30 minutos y se filtró a través de tierra de diatomeas lavando con 2:1 de acetonitrilo/agua. Las capas se separaron, lo acuoso se extrajo con acetato de etilo (2 × 2.5 10 L) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (2 × 2.5 L), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron para producir un residuo. El residuo se purificó por SFC, columna: Chiralpak AD-H (5), 50 × 250 mm; eluyente: 12% de etanol (0.2% de dietilmetilamina en CO₂; velocidad de flujo: 340 g/minuto a UV 220 nm para 15 producir el compuesto del título como un sólido blanco (197.7 g, 84%). $[\alpha]_D^{20} = -6.93^\circ$ (C = 0.678, cloroformo). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 354.0/356.0 [M+H].

Preparación 17

20 [(2S,3R,4S)-4-Amino-4-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol



5

Esquema de reacción 1, Etapa F: Se añadió (3aR,4S,6aR)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol (31.30 g, 55.9 mmol) a ácido acético (186 mL) para producir una suspensión. Se añadió zinc (25.6 g, 391 mmol) y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 18 horas. La mezcla se diluyó con tolueno y se filtró a través de tierra de diatomeas. El filtrado se concentró bajo presión reducida. El residuo se solubilizó con acetato de etilo, se lavó con salmuera, y bicarbonato de sodio saturado. Las fases se separaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron bajo presión reducida para producir el compuesto del título (31.35 g, 99%). ES/MS m/e ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 562/564 [M+H].

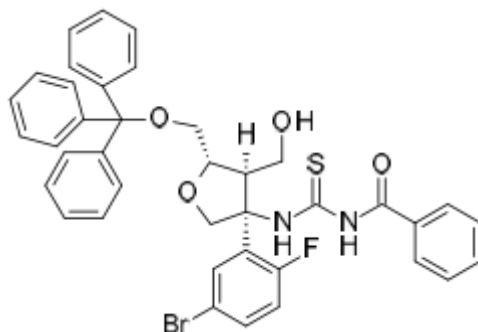
20

Preparación 18

N-[[(3S,4R,5S)-3-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)-5-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]carbamotioil]benzamida

25

5



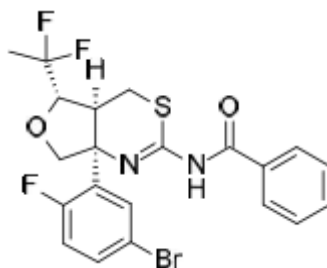
Esquema de reacción 1, Etapa G: Se disolvió [(2*S*,3*R*,4*S*)-4-amino-4-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol (31.35 g, 55.73 mmol) en diclorometano (557 mL) y se enfrió a 5°C. Se añadió isotiocianato de benzoilo (9.74 mL, 72.45 mmol). Después que la adición se completó, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Se vertió en bicarbonato de sodio saturado, las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con diclorometano. El extracto orgánico se combinó y se secó sobre sulfato de magnesio. La solución se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir el compuesto del título (42.95 g, 106%). ES/MS *m/e* (⁷⁹Br/⁸¹Br) 747/749 [M+Na].

20

Preparación 19

N-[(4*aS*,5*S*,7*aS*)-7*a*-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4*a*,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-2-il]benzamida

25



5

Esquema de reacción 2, Etapa H: Se añadió isotiocianato de benzoilo (1.80 ml, 13.3 mmol,) a una solución de [(2S,3R,4S)-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(1,1-difluoroetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol (4.67 g, 11.9

10 mmol) en diclorometano (20 mL) a temperatura ambiente durante 1 hora hasta que la LCMS mostró que la reacción se completó. La mezcla de reacción se evaporó a un residuo bajo vacío. Se añadió ciclohexano (50 mL), se calentó a 60°C y se añadió éter metil terc-butílico hasta que el precipitado se disolvió

15 completamente (100 mL). La solución caliente se filtró, se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó lentamente bajo presión reducida hasta la formación de un precipitado blanco. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano anhidro (30 mL), se añadió piridina

20 (2.4 ml, 30 mmol), y la solución se enfrió a -25°C. Se añadió anhídrido trifluorometansulfónico (2.2 mL, 13 mmol) por goteo durante 30 minutos y se dejó calentar a 0°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se lavó con agua (25 mL), ácido clorhídrico acuoso 2 N (25 mL), agua (25 mL), bicarbonato de

25 sodio saturado acuoso (25 mL), y agua (25 mL), se secó sobre

sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 5% de éter metil terc-butílico en diclorometano para producir el compuesto del título como una
5 espuma amarilla clara (5.0 g, 76%, 90% de pureza por LCMS).
ES/MS: m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 499.0/501.0 [M+H].

Preparación Alternativa 19

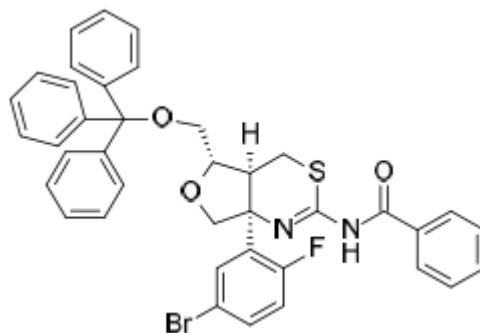
Esquema de reacción 2, Etapa H: Se añadió isotiocianato de benzoilo (98 ml, 724.9 mmol,) a una solución
10 de [(2S,3R,4S)-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(1,1-difluoroetil)tetrahydrofuran-3-yl]metanol (197.6 g, 546.7 mmol) en diclorometano (1.2 L) a 30°C durante 1 hora. Se añadió CDI (101 g, 610.4 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se pudieron hacer cargas
15 adicionales de CDI para asegurar el consumo completo del intermediario tiourea. Se calentó a 90°C durante 42 horas y la solución se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (2 L) y se añadió ácido clorhídrico acuoso 2 N (2 L), se agitó, se añadió
20 salmuera (1 L) y las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con ácido clorhídrico acuoso 2 N (0.5 L), salmuera (2 × 1 L) y bicarbonato de sodio acuoso saturado (1 L). Se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró para producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía
25 en gel de sílice eluyendo con 0-100% de acetato de etilo en

iso-hexano para producir el compuesto del título como un sólido amarillo claro (234 g, 83%). ES/MS: m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 499.0/501.0 [M+H].

Preparación 20

5 N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-5-(tritoloximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida

10

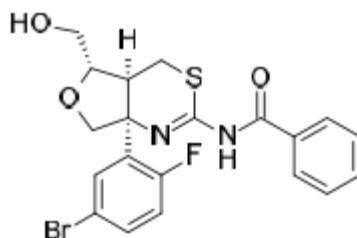


Esquema de reacción 1, Etapa H: Se disolvió N-
 15 [[(3S,4R,5S)-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)-5-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]carbamotioil]benzamida (42.95 g, 59.18 mmol) en diclorometano (591 mL) y se enfrió a -20°C. Se añadió piridina (12.0 mL, 148.0 mmol), seguido por anhídrido trifluorometansulfónico (10.97 mL, 65.10 mmol). Se
 20 monitoreó la adición manteniendo la temperatura por debajo de -20°C. La mezcla de reacción se agitó a -20°C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Se vertió en cloruro de amonio saturado, las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con diclorometano.
 25 El extracto orgánico se combinó y se secó sobre sulfato de

magnesio. La solución se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir el compuesto del título (45.24 g, 108%). ES/MS m/e ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 707/709 [M+H].

Preparación 21

5 N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-5-(hidroximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



10

Esquema de reacción 1, Etapa I: Se disolvió N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-5-(tritoloximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (45.24 g, 63.93 mmol) en ácido fórmico (160 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (29 mL) durante un período de 5 minutos. Se agitó durante 50 minutos. La mezcla se concentró bajo presión reducida a un residuo. El residuo se disolvió en metanol (639 mL), se añadió trietilamina (26.7 mL, 191.8 mmol) y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se vertió en salmuera, las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con cloroformo. El extracto orgánico se combinó y se secó sobre sulfato de magnesio. Se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetona:hexanos

15

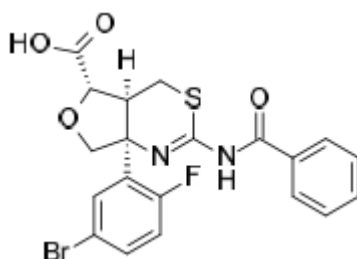
20

25

(25-38% de gradiente), para producir el compuesto del título (16.04 g, 54%). ES/MS m/e ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 465/467 [M+H].

Preparación 22

Ácido (4aS,5S,7aS)-2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-
4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-5-carboxílico



Esquema de reacción 1, Etapa J: Se añadió N-

[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-5-(hidroximetil)-
4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida

(16.04 g, 34.47 mmol) a DMSO (172 mL). Se añadió ácido 2-

yodoxibenzoico (35.56 g, 120.70 mmol) y se agitó a
temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción

se diluyó con cloroformo (300 mL) y se vertió en cloruro de
amonio saturado (400 mL). La fase orgánica se separó y se

secó sobre sulfato de magnesio. La solución se filtró y se

concentró bajo presión reducida para producir un residuo. El

residuo se disolvió en acetato de etilo (400 mL) y se lavó

con cloruro de amonio saturado (2 × 250 mL). La fase orgánica

se separó, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se

concentró bajo presión reducida para producir un residuo. El

residuo se disolvió en una mezcla de diclorometano:metanol y

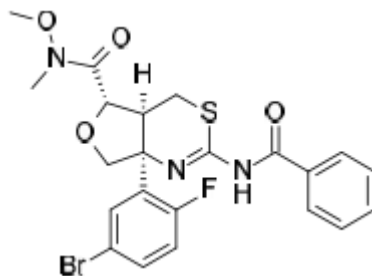
se añadió éter dietílico hasta que se precipitó un sólido. El sólido se recolectó por filtración y se secó bajo presión reducida para producir el compuesto del título (5.78 g, 35%). ES/MS m/e ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 479/481 $[\text{M}+\text{H}]$.

5

Preparación 23

(4aS,5S,7aS)-2-Benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-N-metoxi-N-metil-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-5-carboxamida

10



Esquema de reacción 1, Etapa K: Se disolvió ácido
 15 (4aS,5S,7aS)-2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-
 4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-5-carboxílico (5.78
 g, 12.1 mmol) en diclorometano (201 mL) y clorhidrato de N,O-
 dimetilhidroxilamina (1.76 g, 18.1 mmol). Se añadió
 trietilamina (5.29 mL, 36.2 mmol) seguido por HATU (7.02 g,
 20 18.1 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante 3 días.
 Se vertió en cloruro de amonio saturado, las fases se
 separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo.
 Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron sobre
 sulfato de magnesio. Se filtraron y se concentraron bajo
 25 presión reducida para producir un residuo. El residuo se

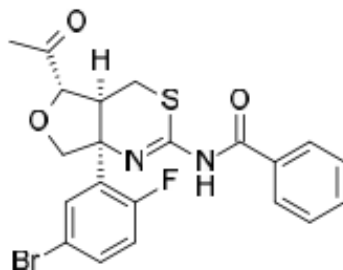
purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo:diclorometano (0-50% de gradiente) para producir el compuesto del título (4.15 g, 66%). ES/MS *m/e* ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 522/524 [M+H].

5

Preparación 24

N-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-5-Acetil-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-2-il]benzamida

10



15

20

25

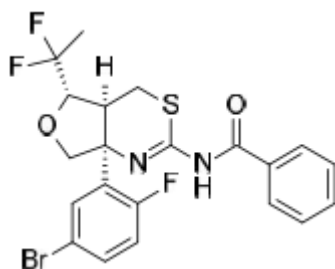
Esquema de reacción 1, Etapa L: Se añadió por goteo a una solución a -78°C de (4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-N-metoxi-N-metil-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-5-carboxamida (1.51 g, 2.89 mmol) en THF (57.8 mL) bromuro de metilmagnesio (3.0 mol/L en éter dietílico, 4.8 mL, 14.5 mmol). La reacción se agitó a -78°C durante 5 minutos y se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente. Se agitó durante 30 minutos. La reacción se enfrió con metanol (4 mL), se diluyó con cloruro de amonio saturado, y se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se combinó y se secó sobre sulfato de sodio. Se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía

en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo:hexanos (0-100% de gradiente) para producir el compuesto del título (1.28 g, 93%). ES/MS m/e ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 477/479 [M+H].

Preparación 25

5 N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida

10



Esquema de reacción 1, Etapa M: Se añadió conjuntamente diclorometano (34 mL), trifluoruro de bis(2-metoxietil)aminoazufre (1.52 mL, 6.88 mmol), y dietil eterato de trifluoruro de boro (0.89 mL, 6.88 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió N-[(4aS,5S,7aS)-5-acetil-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0.821 g, 1.72 mmol) en una porción, seguido por trifluorohidrato de trietilamina (1.13 mL, 6.88 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se vertió en cloruro de amonio saturado, las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se combinó y se secó sobre sulfato de magnesio. Se filtró y se concentró bajo presión reducida para producir un residuo. El residuo se

15

20

25

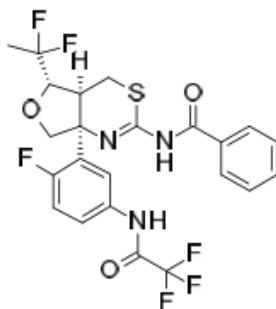
purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con diclorometano:hexanos (80-100% de gradiente), para producir el compuesto del título (0.552 g, 64%). ES/MS m/e ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 499/501 [M+H].

5

Preparación 26

N-[(5S,7aS)-5-(1,1-Difluoroetil)-7a-{2-fluoro-5-[(trifluoroacetil)amino]fenil}-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida

10

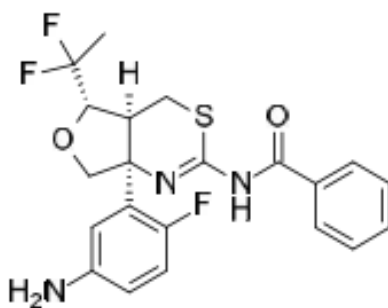


Esquema de reacción 5, Etapa A: Se disolvió N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (234 g, 454.6 mmol) en 1,4-dioxano (2 L) y se añadieron tamices moleculares de 4 Å (37 g), 2,2,2-trifluoroacetamida (91 g, 780.9 mmol), carbonato de potasio finamente molido (114 g, 824.9 mmol), yoduro de sodio (117 g, 780.6 mmol), yoduro de cobre (I) (17.5 g, 91.9 mmol) y trans-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexano diamina racémica (20 g, 140.6 mmol) bajo una corriente de nitrógeno. El recipiente se purgó con 3 interruptores de nitrógeno de vacío y se calentó a 123°C durante 18 horas. Se enfrió a temperatura ambiente y la

solución se filtró a través de tierra de diatomeas, y se lavó con acetato de etilo. Se añadió cloruro de amonio acuoso saturado (2 L) y se agitó vigorosamente durante 45 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado (3 × 1 L), salmuera (300 mL), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó para producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 0-100% de acetato de etilo en iso-hexano para producir el compuesto del título como un sólido amarillo claro (297.9 g, 95%, 81% de pureza). ES/MS: m/z 532.0 [M+H].

Preparación 27

N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Esquema de reacción 1, Etapa N: Se combinó N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0.372 g, 0.74 mmol) y (1R, 2R)-N,N'-dimetil-

1,2-ciclohexanodiamina (0.037 ml, 0.22 mmol) en etanol (30 mL). Se añadió azida de sodio (0.194 g, 2.98 mmol), seguido por ascorbato de sodio (solución 0.66 M, 0.50 ml, 0.33 mmol). La parte superior del matraz se purgó con nitrógeno y se
 5 añadió sulfato cúprico (solución 0.33 M, 0.68 ml, 0.22 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 80°C y se agitó durante 5 horas. La reacción se enfrió y se añadió agua fría. La mezcla se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se combinó y se secó sobre sulfato de sodio. Se filtró y se
 10 concentró bajo presión reducida para producir un residuo. El residuo se combinó con paladio (10% en masa sobre carbono, 0.35 g, 0.16 mmol) en etanol (50 mL) y THF (10 mL). La mezcla se purgó con nitrógeno y con hidrógeno. Se agitó a temperatura ambiente bajo 50 psi de hidrógeno durante 1 hora.
 15 El catalizador se separó por filtración y se lavó con acetato de etilo. La solución se concentró bajo presión reducida para producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo:diclorometano (0-20% de gradiente), para producir el compuesto del título
 20 (0.2184 g, 67%). ES/MS m/z 436 (M+H).

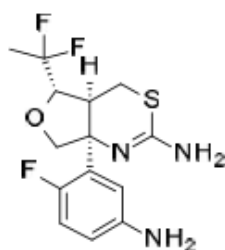
Preparación Alternativa 27

Esquema de reacción 5, Etapa B: Se añadió amoníaco
 7 N en metanol (600 ml, 4.2 mol) a una suspensión agitada de
 25 N-[(5S,7aS)-5-(1,1-difluoroetil)-7a-{2-fluoro-5-

[(trifluoroacetil)amino]fenil}-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (250 g, 80% de pureza, 376.3 mmol) en metanol (200 mL) a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se evaporó hasta sequedad para producir el compuesto del título como una goma marrón (190 g, 375.2 mmol, 86% de pureza). ES/MS: m/z 436.0 [M+H].

Preparación 28

(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluorofenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina



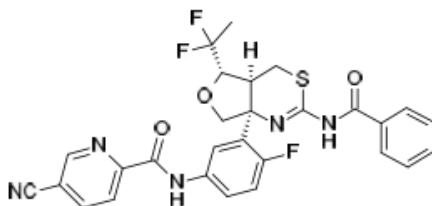
Esquema de reacción 4, Etapa A: Se disolvió N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (216.4 g, 88% de pureza, 435.9 mmol) en piridina (400 mL), etanol (100 mL) y THF (300 mL). Se añadió clorhidrato de O-metilhidroxilamina (190 g, 2275.0 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se diluyó con 2-metiltetrahidrofurano (1 L) y se lavó con agua (2 × 300 mL). La capa orgánica se aisló y se añadió 35% hidróxido de amonio acuoso (100 mL) a lo acuoso. Se extrajo con 2-metiltetrahidrofurano (300 mL), luego se saturó con cloruro

de sodio y se extrajo con 2-metiltetrahidrofurano (2 × 300 mL). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera (300 mL), y se evaporaron a un residuo. Se disolvió en metanol (200 mL), se añadió amoníaco 7 N en metanol (100
5 ml, 700 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se puede añadir amoníaco adicional si permanece cualquier impureza de trifluoroacetamida. El solvente se removi6 bajo presión reducida y el residuo se disolvió en ácido clorhídrico acuoso 2 N (1.5 L). Se extrajo con
10 diclorometano (6 × 500 mL), las capas orgánicas se combinaron y el solvente se removi6 bajo presión reducida hasta un volumen total de aproximadamente 1 L. Se lavó con ácido clorhídrico acuoso 2 N (300 mL) y todos los lavados acuosos se combinaron. Se añadió 2-metiltetrahidrofurano (1 L) y se
15 agitó vigorosamente mientras se ajustó el pH a básico con bicarbonato de sodio hasta que no se observó desprendimiento de gas. Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con 2-metiltetrahidrofurano (2 × 500 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron con sulfato de magnesio, se
20 filtraron, y se evaporaron para producir un sólido marrón. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 0-100% de diclorometano en THF. El producto que contiene fracciones se evaporó con acetato de etilo/heptano para producir el compuesto del título como un polvo beige
25 fino (106 g, 70%, 95% de pureza). ES/MS: m/z 332.0 [M+H],

$[\alpha]_D^{20} = 42.11^\circ$ (C = 0.532, cloroformo).

Preparación 29

N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-Benzamido-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida

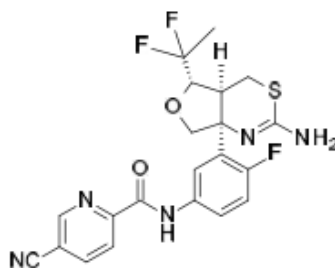


Esquema de reacción 3, Etapa A: Se añadió N,N-diisopropiletilamina (0.032 ml, 0.1837 mmol) a una mezcla de N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0.040 g, 0.09185 mmol), ácido 5-cianopiridin-2-carboxílico (0.0203 g, 0.1378 mmol) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (0.0191 g, 0.1378 mmol) en diclorometano (2 mL) y dimetilformamida (0.5 mL). Se añadió clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0.026 g, 0.1378 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua y salmuera. Se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio. Se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con éter metil terc-butílico:diclorometano (0-10% de

gradiente), para producir el compuesto del título (0.0465 g, 90%). ES/MS m/z 566 (M+1).

Ejemplo 1

N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-Amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida



10

Esquema de reacción 3, Etapa B: Se calentó a 50°C durante 18 horas una mezcla de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-benzamido-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida (0.0465 g, 0.0822 mmol), clorhidrato de O-metilhidroxilamina (0.0687 g, 0.8220 mmol) y piridina (0.066 ml, 0.8220 mmol) en THF (1.5 mL) y etanol (1.5 mL). La mezcla se concentró bajo presión reducida para producir un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con NH₃ 7 N en metanol:diclorometano (0-2% de gradiente), para producir el compuesto del título (0.026 g, 68%). ES/MS m/z 462 (M+1).

15

20

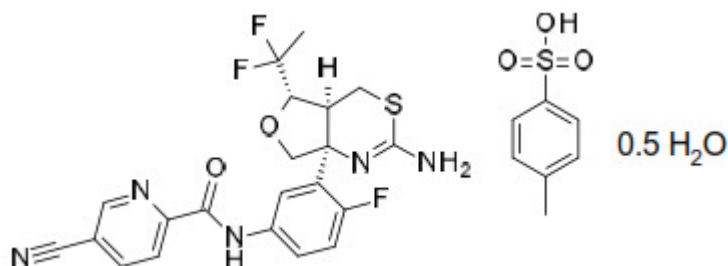
Ejemplo 1a

Hemihidrato de 4-metilbencensulfonato de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-

25

d] [1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida (1:1:0.5)

5



Se añadió N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida (150 mg, 0.33 mmol) y THF (2 mL) juntos y se agitó a temperatura ambiente para disolver. Se añadió hidrato de ácido p-toluensulfónico (0.095 g, 0.5 mmol) y la solución se calentó a 50°C. Se añadió agua en alícuotas de 200 microlitros y se observó la precipitación después de aproximadamente 2 ml de adición total. Se agitó a 50°C durante varias horas para producir una suspensión espesa. Se añadió THF adicional (1 mL) para mejorar la mezcla. Se enfrió a temperatura ambiente durante unas pocas horas y se filtró por filtración en vacío. Se lavó con THF mínimo. Se dejó secar con aire durante la noche para producir el compuesto del título.

Preparación Alternativa del Ejemplo 1a

Hemihidrato de 4-metilbencensulfonato de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-

carboxamida de (1: 1: 0.5)

Se añadió N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida (1.5 g, 3.3 mmol) y THF (12 mL) juntos y se agitó a temperatura ambiente para disolver. Se calentó a 60°C y se añadió hidrato de ácido p-toluensulfónico (0.75 g, 3.96 mmol) y agua (5 mL). Se formó un precipitado blanco después de 5 minutos de agitación. Se agitó a 60°C durante varias horas para producir una suspensión espesa. Se enfrió a temperatura ambiente durante unas pocas horas y se filtró por filtración en vacío. Se dejó secar con aire durante la noche para producir el compuesto del título.

Difracción de Polvo de Rayos X (XRD)

Los patrones de XRD de los sólidos cristalinos se obtuvieron en un difractómetro de polvo de rayos X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente de CuK α ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) y un detector Vantec, operando a 35 kV y 50 mA. La muestra se escaneó entre 4 y 40° en 2 θ , con un tamaño de paso de 0.009° en 2 θ y una velocidad de escaneo de 0.5 segundos/paso, y con divergencia de 0.6 mm, anti-dispersor fijo de 5.28, y hendiduras de detector de 9.5 mm. El polvo seco se empacó en un soporte de muestra de cuarzo y se obtuvo una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. Los patrones de difracción de la forma cristalina se recolectaron a

temperatura ambiente y humedad relativa. Es bien conocido en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma cristalina dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida
5 resultante de factores tales como el hábito y morfología cristalina. Cuando los efectos de orientación preferida estuvieron presentes, las intensidades de pico se alteraron, pero las posiciones del pico característico del polimorfo se mantuvieron sin cambios. Véase, *por ejemplo*, The United
10 States Pharmacopeia # 23, National Formulary # 18, páginas 1843-1844, 1995. Además, también es bien conocido en la técnica cristalográfica que para cualquier forma cristalina dada las posiciones de picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de picos se pueden
15 desplazar debido a una variación en la temperatura o humedad a la cual se analiza una muestra, desplazamiento de la muestra, o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad de la posición de pico de ± 0.2 en 2θ tendrá en cuenta estas variaciones potenciales
20 sin impedir la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina se puede hacer con base en cualquier combinación única de picos distinguidos (en unidades de $^{\circ} 2\theta$), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de forma
25 cristalina, recolectados a temperatura ambiente y humedad

relativa, se ajustaron con base en los picos estándar NIST 675 a 8.853 y 26.774 ° 2-theta.

Una muestra preparada de hemihidrato de 4-metilbencensulfonato de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida cristalino (1:1:0.5) se caracterizó por un patrón de XRD usando radiación CuK α como teniendo picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1, y en particular teniendo picos a 6.8° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste de 19.7°, 14.9°, y 10.3°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0.2 grados.

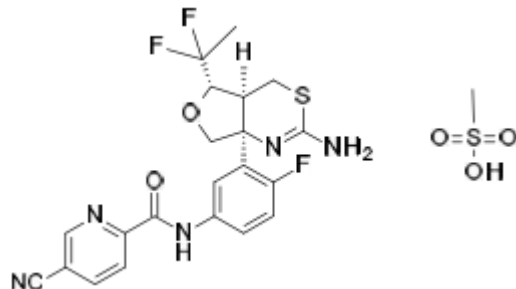
Tabla 1: Picos de difracción de polvo de rayos X del Ejemplo 1a cristalino

Pico	Posiciones de Pico del Ejemplo 1A	
	Ángulo (°2-Theta) +/- 0.2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	5.9	12.5%
2	6.8	100.0%
3	10.3	17.2%
4	14.9	18.7%
5	18.8	3.7%
6	19.7	46.5%
7	21.0	14.3%
8	24.5	4.8%
9	28.6	8.1%
10	39.7	5.1%

Ejemplo 1b

Metansulfonato de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida

5



10 Se añadió N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamida (150 mg, 0,33 mmol) y THF (2 ml) juntos y se agitó a temperatura ambiente para disolver. Se añadió ácido metansulfónico (0.095 g, 0.5 mmol) y la solución se calentó a 50°C. Se añadió agua en alícuotas de 200 microlitros hasta 2 ml de adición total. Se agitó a 25°C y no se observó precipitación. Se concentró bajo nitrógeno a ½ volumen y se observó un precipitado. La suspensión se calentó a 60°C y se observó una solución clara

15 después de aproximadamente 10 minutos. Se calentó a 60°C durante 1 hora. Se enfrió a temperatura ambiente para producir una suspensión blanca y la mezcla se agitó durante varias horas. El sólido se aisló por filtración en vacío y se lavó con una cantidad mínima de agua. Se dejó secar con aire

20 durante la noche para producir el compuesto del título como

25

un sólido cristalino.

Procedimientos de Ensayo *In Vitro*:

Para evaluar la selectividad de BACE1 sobre BACE2, el compuesto de prueba se evaluó en FRET y ensayos 5 enzimáticos de base de detección de inmunoensayo que usan sustratos específicos para BACE1 y BACE2 como se describe a continuación. Para los ensayos celulares y enzimáticos *in vitro*, el compuesto de prueba se preparó en DMSO para preparar una solución madre 10 mM. La solución madre se 10 diluyó en serie en DMSO para obtener una curva de dilución de diez puntos con concentraciones de compuesto finales que varían desde 10 μ M a 0.05 nM en una placa de fondo redondo de 96 cavidades antes de realizar los ensayos de células completas y enzimáticos *in vitro*.

15 Ensayos de inhibición de proteasa *in vitro*:

Expresión de *huBACE1:Fc* y *huBACE2:Fc*.

BACE1 humana (número de acceso: AF190725) y BACE2 humana (número de acceso: AF 204944) se clonaron a partir de cADN de cerebro total por RT-PCR. Las secuencias de 20 nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos #1 a 460 se insertaron en el polipéptido de IgG₁ (Fc) humana codificante de cADN (Vassar et al., *Science*, **286**, 735-742 (1999)). Esta proteína de fusión de BACE1 (1-460) o BACE2 (1-460) y Fc humano, llamadas *huBACE1:Fc* y *huBACE2:Fc* 25 respectivamente, se construyeron en el vector pJB02. BACE1(1-

460):Fc (*huBACE1:Fc*) humana y BACE2(1-460):Fc (*huBACE2:Fc*) humana se expresaron transitoriamente en células HEK293. El cADN (250 µg) de cada constructo se mezcló con Fugene 6 y se añadió a 1 litro de células HEK293. Cuatro días después de la transfección, el medio acondicionado se cosechó para purificación. *huBACE1:Fc* y *huBACE2:Fc* se purificaron por cromatografía de Proteína A como se describe a continuación. Las enzimas se almacenaron a -80°C en pequeñas alícuotas. (Véase Yang, *et. al.*, *J. Neurochemistry*, **91**(6) 1249-1259 (2004).

Purificación de *huBACE1:Fc* y *huBACE2:Fc*

El medio acondicionado de células HEK293 transfectadas transitoriamente con cADN de *huBACE1:Fc* o *huBACE2:Fc* se recolectó. Los restos celulares se removieron filtrando el medio acondicionado a través de filtro estéril de 0.22 µm. 5 ml de Proteína A-agarosa (volumen de lecho) se añadieron a 4 litros de medio acondicionado. Esta mezcla se agitó suavemente durante la noche a 4°C. La resina de Proteína A-agarosa se recolectó y se empacó en una columna de cromatografía de baja presión. La columna se lavó con 20× volúmenes de lecho de PBS a una velocidad de flujo de 20 ml por hora. La proteína de *huBACE1:Fc* o *huBACE2:Fc* unida se eluyó con ácido acético 50 mM, pH 3.6, a velocidad de flujo de 20 ml por hora. 1 ml de fracciones de eluyente se neutralizó inmediatamente con acetato de amonio (0.5 ml, 200

mM), pH 6.5. La pureza del producto final se evaluó por electroforesis en 4-20% de Tris-Glicina SDS-PAGE. La enzima se almacenó a -80°C en pequeñas alícuotas.

Ensayo FRET de BACE1

5 Las diluciones en serie del compuesto de prueba se prepararon como se describió anteriormente. El compuesto se diluyó adicionalmente 20× en amortiguador de KH₂PO₄. 10 µL de cada dilución se añadió a cada cavidad en la fila A a H de una placa negra de baja unión de proteína correspondiente (25
10 µl de KH₂PO₄ 50 mM, pH 4.6, TRITON® 1 mM X-100, 1 mg/ml de BSA, y 15 µM de sustrato FRET con base en la secuencia de APP) (Véase Yang, *et. al.*, *J. Neurochemistry*, **91**(6) 1249-1259 (2004)). El contenido se mezcló bien en un agitador de placa durante 10 minutos. 15 µL de BACE1(1-460):Fc humana 200 pM
15 (Véase Vasser, *et al.*, *Science*, **286**, 735-741 (1999)) en el amortiguador de KH₂PO₄ se añadieron a la placa que contiene sustrato y el compuesto de prueba para iniciar la reacción. La RFU de la mezcla en el tiempo 0 se registró a la longitud de onda de excitación de 355 nm y longitud de onda de emisión
20 de 460 nm, después de un breve mezclado en un agitador de placa. La placa de reacción se cubrió con papel de aluminio y se mantuvo en un horno humidificado oscuro a temperatura ambiente durante 16 a 24 horas. La RFU al final de la incubación se registró con los mismos ajustes de excitación y
25 emisión usados en el tiempo 0. La diferencia de la RFU en el

tiempo 0 y el final de la incubación es representativa de la actividad de BACE1 bajo el tratamiento con el compuesto. Las diferencias de RFU se graficaron versus concentración de inhibidor y una curva se ajustó con una ecuación logística de
 5 cuatro parámetros para obtener el valor de IC₅₀. (Mayo, et al., *Journal of Neuroscience*, **31**, 16507-16516 (2011)).

El compuesto del Ejemplo 1 se analizó esencialmente como se describió anteriormente y exhibe una IC₅₀ para BACE1 de 0.509 nM ± 0. 104, n = 4 (Media ± desviación estándar de
 10 la media). Estos datos demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la actividad de la enzima BACE1 recombinante purificada *in vitro*.

Ensayo MBP-C125Swe de BACE2

Diluciones en serie de 10 puntos de los compuestos
 15 de prueba se prepararon en el rango apropiado. Los compuestos se diluyeron adicionalmente 6× en amortiguador de ensayo de acetato de amonio (acetato de amonio 50 mmol, pH 4.6, Triton X-100 1 mM, 1 mg/ml de BSA). 10 µL de cada dilución se añadieron a cada cavidad en la fila A a H de una placa de
 20 baja unión de proteína correspondiente a la cual se pre-
 añadieron 10 µl de un sustrato derivado de *Escherichia coli* de afinidad purificada (MBPC125swe, 1 µg/ml) para la actividad de BACE2. El contenido se mezcló bien en un agitador de placa durante 10 minutos. 10 µL de BACE2(1-
 25 460):Fc humana 200 picomolar en el mismo amortiguador de

reacción descrito anteriormente se añadieron a la placa que contiene sustrato y compuestos de prueba para iniciar la reacción. Después de 4 horas, la reacción se detuvo por la adición de amortiguador de detención (40 μ L). La cantidad de producto se midió por ELISA usando estándar MBP-C26swe. El anticuerpo anti-MBP se inmovilizó sobre la superficie de una placa de poliestireno de alta unión y se bloqueó usando un amortiguador de bloqueo de caseína/PBS. La muestra o estándar (40 μ L) se añadió a la placa de ELISA y se incubó a 4°C durante la noche. Las placas luego se lavaron y se añadieron 40 μ L del anticuerpo de detección específico de escisión (GN405) y se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente. El GN405 no unido luego se removió por lavado y 40 μ L de conjugado de anti-conejo-HRP de cabra (Southern Biotech, 4010-05) se añadieron a la placa y se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó de nuevo y se añadió sustrato de TMB (40 μ L). La cantidad correspondiente de producto liberado es una medida de la actividad de BACE2 en la solución en cualquier concentración analizada de inhibidor. La curva de inhibición de 10 puntos se graficó y ajustó con la ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores de EC₅₀ e IC₅₀. (Véase: Sinha, et al., *Nature*, **402**, 537-540 (2000)).

El compuesto del Ejemplo 1 se analizó esencialmente como se describió anteriormente y exhibe una

IC₅₀ de BACE2 de 17.6 nM ± 7.4, n = 6 (media ± desviación estándar de la media). La relación de BACE1 (ensayo de enzima de IC₅₀ de FRET) a BACE2 (ensayo de células de MBP-C125Swe) es aproximadamente 35 veces, lo que indica selectividad funcional para inhibir la enzima BACE1. Los datos descritos anteriormente demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 es selectivo para BACE1 sobre BACE2.

Ensayo de Célula Completa SH-SY5YAPP695Wt

El ensayo de célula completa de rutina para la medición de la inhibición de la actividad de BACE1 usa la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (No. de Acceso de ATCC CRL2266) que expresa establemente un cADN de APP695Wt humano. Las células se usaron rutinariamente hasta el paso número 6 y luego se desecharon.

Las células SH-SY5YAPP695Wt se colocaron en placas de cultivo de tejido de 96 cavidades a 5.0×10^4 células/cavidad en 200 µL de medio de cultivo (50% MEM/EBSS y F12 de Ham, 1× cada uno de piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y NaHCO₃ que contiene 10% FBS). Al siguiente día, los medios se removieron de las células, el medio fresco añadido luego se incubó a 37°C durante 24 horas en la presencia/ausencia de compuesto de prueba en el rango de concentración deseado.

Al final de la incubación, el medio acondicionado se analizó para la evidencia de la actividad de beta-

secretasa por análisis de péptidos Abeta 1-40 y 1-42 por ELISA de intercalación específicos. Para medir estas isoformas específicas de Abeta, el 2G3 monoclonal se utilizó como un anticuerpo de captura para Abeta 1-40 y el 21F12 monoclonal como un anticuerpo de captura para Abeta 1-42. Los ELISA tanto de Abeta 1-40 como Abeta 1-42 usaron 3D6 biotinilado como el anticuerpo de referencia (para la descripción de anticuerpos, véase Johnson-Wood, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **94**, 1550-1555 (1997)). La concentración de Abeta liberado en el medio acondicionado después del tratamiento de compuesto corresponde a la actividad de BACE1 bajo tales condiciones. La curva de inhibición de 10 puntos se graficó y se ajustó con la ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores de IC₅₀ para el efecto de disminución de Abeta.

El compuesto del Ejemplo 1 se analizó esencialmente como se describió anteriormente y exhibe una IC₅₀ de 0.157 nM $\pm$ 0.048, n = 4 para ELISA de A-beta (1-40) de SH-SY5YAPP695Wt y una IC₅₀ de 0.177 nM $\pm$ 0.050, n = 4 para ELISA de A-beta (1-42) de SH-SY5YAPP695Wt (Media $\pm$ desviación estándar de la media). Los datos descritos anteriormente demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe BACE1 en el ensayo de células completas.

Inhibición *in vivo* de Beta-Secretasa

Varios modelos animales, incluyendo ratón, cobayo,

perro, y mono, se pueden usar para detectar la inhibición de la actividad de beta-secretasa *in vivo* después del tratamiento con compuesto. Los animales usados en esta invención pueden ser de tipo salvaje, transgénicos, o
5 animales con inactivación de genes. Por ejemplo, el modelo de ratón PDAPP, preparado como se describe en Games *et al.*, *Nature* **373**, 523-527 (1995), y otros animales no transgénicos o con inactivación de genes son útiles para analizar la inhibición *in vivo* de la producción de Abeta y sAPPbeta en la
10 presencia de compuestos inhibidores. Generalmente, ratones PDAPP de 2 meses de edad, ratones con inactivación de genes o animales no transgénicos se administraron con el compuesto formulado en vehículos, tales como aceite de maíz, beta-ciclodextrano, amortiguadores de fosfato, PHARMASOLVE®, u
15 otros vehículos adecuados vía oral, subcutánea, intra-venosa, alimentación, u otra ruta de administración. 1 a 24 horas después de la administración del compuesto, los animales se sacrificaron, y los cerebros se removieron para análisis de Abeta 1-x. "Abeta 1-x" como se usa en la presente, se refiere
20 a la suma de especies de Abeta que comenzaron con el residuo 1 y terminaron con un extremo C-terminal mayor que el residuo 28. Esto detecta la mayoría de las especies de Abeta y a menudo se llama "Abeta total". Los niveles de péptidos A-beta total (Abeta 1-x) se midieron por un ELISA de intercalación,
25 usando 266 monoclonal como un anticuerpo de captura y 3D6

biotinilado como anticuerpo de referencia. (Véase May, et al., *Journal of Neuroscience*, **31**, 16507-16516 (2011)).

Para los estudios agudos, se administró vehículo o compuesto apropiado y los animales se sacrificaron a
5 aproximadamente 3 horas después de la dosificación. El tejido cerebral, se obtuvo de los animales seleccionados y se analizó para la presencia de Abeta 1-x. Después de la dosificación crónica, los tejidos cerebrales de animales transgénicos con APP mayores también se pueden analizar para
10 la cantidad de placas de beta-amiloide después del tratamiento con compuesto.

Los animales (PDAPP u otros ratones transgénicos o no transgénicos APP) administrados con un compuesto inhibidor pueden demostrar la reducción de Abeta en los tejidos
15 cerebrales, en comparación con los controles tratados con vehículo o controles de tiempo cero. Por ejemplo, una dosis oral de 0.1, 0.3 y 1 mg/kg del Ejemplo 1, a ratones PDAPP hembras jóvenes redujo los niveles de péptido de Abeta 1-x en el hipocampo del cerebro por 32%, 40%, y 55% (todos los
20 valores $p < 0.01$), respectivamente. En el tejido cortical cerebral, las dosis de 0.1, 0.3, y 1 mg/kg del Ejemplo 1 redujeron los niveles de Abeta 1-x por 38%, 50% y 67% (todos los valores $p < 0.01$) en comparación con los ratones tratados con vehículo tres horas después de la dosificación.

25 Dada la actividad del compuesto del Ejemplo 1

contra la enzima BACE 1 *in vitro*, estos efectos de disminución de Abeta son consistentes con la inhibición de BACE 1 *in vivo* y, adicionalmente demuestran la penetración en el SNC del compuesto del Ejemplo 1.

5 Estos estudios muestran que los compuestos de la presente invención inhiben BACE1 y, por lo tanto, son útiles en la reducción de los niveles de Abeta.

10

15

20

25