PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X20430	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US2016/018160	International filing date *(day/month/year)* 17 February 2016 (17-02-2016)	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 23 February 2015 (23-02-2015)
Applicant ELI LILLY AND COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____ , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [ ] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.
2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)
3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)
4. With regard to the **title,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority
6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/018160

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D513/04 A61K31/542
ADD. A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/098461 A1 (EISAI R&D MAN CO LTD [JP]; TAKAIHSI MAMORU [JP]; ISHIDA TASUKU [JP]) 26 July 2012 (2012-07-26) claims 1-15	1-20

A	EP 2 233 474 A1 (EISAI R&D MAN CO LTD [JP]) 29 September 2010 (2010-09-29) claims 1-15; examples 49-63,67-77,150,151,281-284	1-20

A	WO 2012/098213 A1 (EISAI R&D MAN CO LTD [JP]; HALL ADRIAN [GB]; FARTHING CHRISTOPHER NEIL) 26 July 2012 (2012-07-26) claims 1-15	1-20

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 April 2016	03/05/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Rufet, Jacques

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/018160

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DANIEL OEHLRICH ET AL: "The evolution of amidine-based brain penetrant BACE1 inhibitors", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 24, no. 9, 20 March 2014 (2014-03-20) , pages 2033-2045, XP55233028, AMSTERDAM, NL ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.03.025 abstract; figures 16, 20 and 30 -----	1-20

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2016/018160

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012098461 A1	26-07-2012	AU 2012208348 A1	01-08-2013
		CA 2823675 A1	26-07-2012
		CN 103459401 A	18-12-2013
		EP 2665731 A1	27-11-2013
		JP 2014506564 A	17-03-2014
		KR 20140020867 A	19-02-2014
		RU 2013138733 A	27-02-2015
		US 2014179690 A1	26-06-2014
		WO 2012098461 A1	26-07-2012
EP 2233474 A1	29-09-2010	AU 2009205072 A1	23-07-2009
		BR PI0906962 A2	14-07-2015
		CA 2711655 A1	23-07-2009
		CN 101910143 A	08-12-2010
		DK 2233474 T3	19-10-2015
		EP 2233474 A1	29-09-2010
		ES 2548774 T3	20-10-2015
		HK 1147490 A1	10-01-2014
		HK 1147743 A1	19-02-2016
		HR P20151030 T1	06-11-2015
		IL 206952 A	30-09-2014
		JP 4520533 B2	04-08-2010
		KR 20100103702 A	27-09-2010
		NZ 586796 A	28-10-2011
		PE 14382009 A1	26-09-2009
		PT 2233474 E	26-10-2015
		RU 2010134403 A	27-02-2012
		SI 2233474 T1	30-11-2015
		TW 200936581 A	01-09-2009
		US 2009209755 A1	20-08-2009
		US 2010317850 A1	16-12-2010
		US 2012094984 A1	19-04-2012
		US 2013203741 A1	08-08-2013
		WO 2009091016 A1	23-07-2009
WO 2012098213 A1	26-07-2012	AR 084903 A1	10-07-2013
		AU 2012208526 A1	02-05-2013
		CA 2828738 A1	26-07-2012
		CL 2013002083 A1	06-12-2013
		CN 103328486 A	25-09-2013
		EP 2665732 A1	27-11-2013
		JP 2014502987 A	06-02-2014
		KR 20140002724 A	08-01-2014
		NZ 611365 A	24-04-2015
		PE 11822014 A1	14-09-2014
		RU 2013138717 A	27-02-2015
		SG 190908 A1	31-07-2013
		TW 201309710 A	01-03-2013
		UA 109927 C2	26-10-2015
		US 2012190672 A1	26-07-2012
		US 2013203740 A1	08-08-2013
		US 2014142091 A1	22-05-2014
		WO 2012098213 A1	26-07-2012

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2016/018160	17.02.2016	23.02.2015

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07D513/04 A61K31/542 ADD. A61P25/28

Applicant
ELI LILLY AND COMPANY

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office Gitschiner Str. 103 D-10958 Berlin Tel. +49 30 25901 - 0 Fax: +49 30 25901 - 840	see form PCT/ISA/210	Rufet, Jacques Telephone No. +49 30 25901-0

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))

3. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-20
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-20
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-20
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Reference is made to the following documents:

D1 WO 2012/098461 A1 (EISAI R&D MAN CO LTD [JP]; TAKAIHSI MAMORU [JP]; ISHIDA TASUKU [JP]) 26 July 2012

D2 EP 2 233 474 A1 (EISAI R&D MAN CO LTD [JP]) 29 September 2010

D3 WO 2012/098213 A1 (EISAI R&D MAN CO LTD [JP]; HALL ADRIAN [GB]; FARTHING CHRISTOPHER NEIL) 26 July 2012

D4 DANIEL OEHLRICH ET AL: "The evolution of amidine-based brain penetrant BACE1 inhibitors", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 24, no. 9, 1 May 2014 (2014-05-01), pages 2033-2045, XP55233028

2 Method for treatment of the human or animal body by therapy

Claims 14 and 15 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT.

The patentability can also dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for in a first or further medical treatment.

3 Novelty

The present application meets the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1 to 20 is considered to be new over the prior art D1 to D4 in the sense of Article 33(2) PCT for the following reasons:

D1 to D4 refer to substituted tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]thiazine derivatives as BACE1 inhibitors also useful for treating Alzheimer's disease (see the relevant passages cited in the search report accordingly). The structural distinguishing features of the claimed compounds of formula (I) should be seen in present R and the 1,2,4 triazolyl group.

4 Inventive step

The present application addresses the problem of providing BACE1 inhibitors useful for treating Alzheimer's disease.

4.1 Closest State of the Art and Difference

D1 is considered to represent the closest prior art, since it refers to substituted tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]thiazine derivatives as BACE1 inhibitors useful for treating Alzheimer's disease.

The structural distinguishing features of the compounds of present claim 1 are to be seen in the 1,2,4-triazolyl ring and variable R; see formula of claim 1.

4.2 Technical effect and objective problem

There is no comparative data in the present application showing that these distinguishing features as mentioned above are responsible for an unexpected effect, thus the objective technical problem solved by the subject-matter of claim 1 should be seen in the provision of further substitutions in order to provide alternative BACE1 inhibitors.

In view of the examples and the biological data given in pages 60 to 65, more especially table 4, it is credible that these distinguishing features solve the above-mentioned problem.

4.3 Obviousness of the solution

Starting from D1 as closest prior art, there is no technical link in D2 nor in D3 or D4 which would have incited the skilled worker to select a substituent R of present claim 1 in combination with a 1,2,4-triazolyl ring as alternative substitutions for the compounds of D1 if he was looking for alternative BACE1 inhibitors.

The subject-matter of claims 1 to 20 involves therefore an inventive step.

Inhibidores selectivos de BACE1

La presente invención se refiere a ciertos nuevos inhibidores selectivos de BACE1, a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, a los métodos para utilizar los compuestos para el tratamiento de trastornos fisiológicos, y a compuestos intermedios y procedimientos útiles en la síntesis de los compuestos.

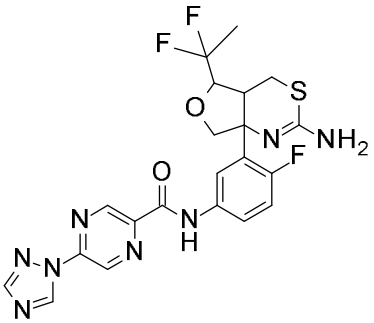
La presente invención se encuentra en el campo del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades y trastornos que implican el péptido β amiloide (Abeta), un segmento de péptido altamente agregante y neurotóxico de la proteína precursora amiloide (APP). La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa devastadora que afecta a millones de pacientes en todo el mundo. En vista de los agentes aprobados actualmente en el mercado que proporcionan beneficios sintomáticos solamente transitorios al paciente en lugar de frenar, interrumpir, o revertir la enfermedad, hay una necesidad no satisfecha en el tratamiento de 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-secretasa (enzima de escisión de la proteína precursora amiloide de β-sitio; BACE) se ha demostrado que tiene un efecto significativo sobre patologías dependientes de las plaquetas y relacionadas con las plaquetas en modelos de ratón que sugieren que incluso pequeñas reducciones en los niveles de péptido Abeta podrían dar lugar a una reducción significativa de largo plazo en la carga de plaquetas y déficits sinápticos, proporcionando así beneficios terapéuticos significativos, sobre todo en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer. Además, se han identificado dos homólogos de BACE que son referidos como BACE1 y BACE2, y se cree que BACE1 es el más importante clínicamente para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. BACE1 se expresa principalmente en las neuronas, mientras que BACE2 se ha demostrado 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 se ha identificado que tiene un papel en el procesamiento de la proteína de melanocitos específica de células de pigmento (Véase L. Rochin, *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**(26), 10658-10663 (2013)). Se desea que los Inhibidores de BACE con la penetración del sistema nervioso central (CNS), particularmente los inhibidores que son selectivos para BACE1 respecto de BACE2 proporcionen tratamientos para los trastornos mediados por el péptido Abeta, tal como enfermedad de Alzheimer.

La Patente de Estados Unidos No. 8.158.620 describe derivados fusionados de aminodihidrotiazina que poseen actividad inhibidora de BACE1 y se describen adicionalmente como agentes terapéuticos útiles para una enfermedad neurodegenerativa causada por el péptido Aß, tal como demencia del tipo de Alzheimer. Además, la Patente de Estados Unidos No. 8.338.407 describe ciertos derivados de aminodihidrotiazina condensados que tienen efecto inhibidor de BACE1 útil en el tratamiento de ciertas enfermedades neurodegenerativas, tal como demencia de tipo Alzheimer.

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 respecto de BACE2. Además, la presente invención proporciona ciertos nuevos compuestos que penetran en el CNS. La presente invención también proporciona ciertos nuevos compuestos que tienen el potencial de un mejor perfil de efectos secundarios, por ejemplo por medio de la inhibición selectiva de BACE1 respecto de BACE2.

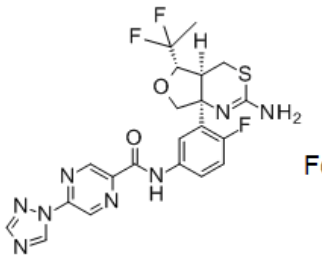
Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:



Fórmula I

o una sal aceptable para uso farmacéutico.

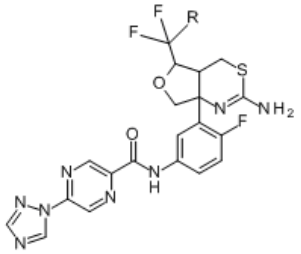
Además, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula Ia:



Fórmula Ia

o una sal aceptable para uso farmacéutico.

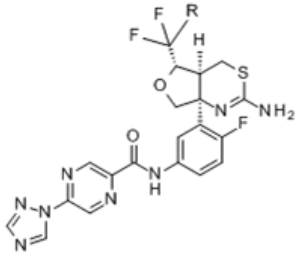
La presente invención además proporciona un compuesto de Fórmula II:



Fórmula II

en donde R es metilo, etilo, o ciclopropilo;
o una sal aceptable para uso farmacéutico.

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



Fórmula IIa

o una sal aceptable para uso farmacéutico.

La presente invención también proporciona un método para tratar enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmulas I, Ia, II, o IIa, o una sal aceptable para uso farmacéutico.

La presente invención además proporciona un método para tratar el avance de deterioro cognitivo leve de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmulas I, Ia, II, o IIa, o una sal aceptable para uso farmacéutico. La presente invención también proporciona un método para inhibir BACE en un paciente, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmulas I, Ia, II, IIa, o una sal aceptable para uso farmacéutico. La presente invención también proporciona un método para inhibir Escisión mediada por BACE de la proteína precursora amiloide, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmulas I, Ia, II, o IIa, o una sal aceptable para uso farmacéutico. La invención además proporciona un método para inhibir la producción

de péptido Abeta, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmulas I, Ia, II, o IIa, o una sal aceptable para uso farmacéutico.

Además, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmulas I, Ia, II, o IIa, o una sal aceptable para uso farmacéutico para su uso en terapia, en particular para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer o para el tratamiento del avance de deterioro cognitivo leve de la enfermedad de Alzheimer. Incluso además, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmulas I, Ia, II, o IIa, o una sal aceptable para uso farmacéutico, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.

La invención además proporciona una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de Fórmulas I, Ia, II, o IIa, o una sal aceptable para uso farmacéutico, con uno o más vehículos aceptables para uso farmacéutico, diluyentes, o excipientes. La invención además proporciona un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar un compuesto de Fórmulas I, Ia, II, o IIa, o una sal aceptable para uso farmacéutico, con uno o más vehículos aceptables para uso farmacéutico, diluyentes, o excipientes. La presente invención también contempla nuevos compuestos intermedios y procesos para la síntesis de los compuestos de Fórmulas I, Ia, II, y IIa.

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

Como se utiliza en el presente documento, los términos “tratamiento” o “tratar” incluyen restringir, ralentizar, detener, o revertir el avance o gravedad de un síntoma existente o trastorno.

Como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un ser humano.

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

Como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad efectiva" se refiere a la dosis o cantidad de compuesto de la invención, o una sal aceptable para uso farmacéutico que, después de la administración de múltiples dosis o dosis simple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.

Una cantidad efectiva puede ser determinada fácilmente por el médico tratante, como experto en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad efectiva para un paciente, una serie de factores son considerados por el médico tratante, incluyendo, pero sin limitarse a: la especie de paciente; su tamaño, edad, y salud general; trastorno o enfermedad específica implicada; el grado de o implicación 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 régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

Los compuestos de la presente invención son generalmente eficaces en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente caen 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 intervalo mencionado anteriormente pueden ser más adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores con efectos secundarios aceptables, y por lo tanto el intervalo de dosificación anterior no pretende limitar de ninguna manera el alcance de la invención.

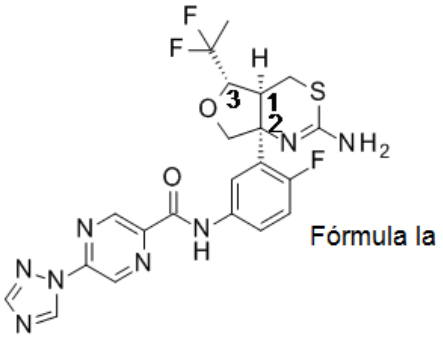
Los compuestos de la presente invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas administradas por cualquier vía que haga que el compuesto esté biodisponible, incluyendo vías transdérmicas y orales. Mucho más preferiblemente, tales composiciones son para administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procesos para preparar los mismos son bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Remington: The Science y Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21 edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

Los compuestos de Fórmulas I, Ia, II, o IIa, o sales aceptables para uso farmacéutico de los mismos son particularmente útiles en los métodos de tratamiento de la invención, pero se prefieren ciertos grupos, sustituyentes, y configuraciones. Los siguientes párrafos describen, sustituyentes, configuraciones y el preferido. Se

entenderá que estas preferencias son aplicables tanto a los métodos de tratamiento como a nuevos compuestos de la invención.

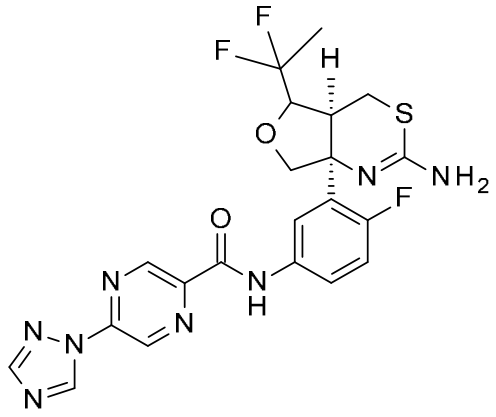
De ese modo, los compuestos de Fórmula I y II en donde es preferente el anillo bicíclico condensado está en la configuración cis, o sal aceptable para uso farmacéutico del mismo. Por ejemplo, una persona con experiencia ordinaria en la técnica apreciará que el compuesto de Fórmula Ia está en la configuración relativa cis para los centros marcados 1 y 2 como se muestra en el Esquema A a continuación. Además, el compuesto de Fórmula Ia se compone de un núcleo que contiene tres centros quirales en los átomos de carbono marcados 1, 2, y 3. Un experto en la técnica entiende que el sistema de numeración utilizado en el Esquema A puede no corresponderse con el sistema de numeración utilizado para nombrar compuestos en el presente documento, y como tal, el sistema de numeración utilizado en el Esquema A es con fines ilustrativos. La configuración relativa preferida para los tres centros quirales de Fórmula IA se muestra en el Esquema A:

Esquema A



Fórmula Ia

Otros compuestos la presente invención son:



;

N-[3-[(4aS,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida;

N-[3-[(4aSR,5SR,7aSR)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida, y sales aceptables para uso farmacéutico de la misma.

Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros y diastereómeros individuales, así como mezclas de los enantiómeros de dichos compuestos, incluyendo racemato, los compuestos con la configuración absoluta como se expone a continuación son especialmente 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida, y las sales aceptables para uso farmacéutico de la misma; y

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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida hidratada.

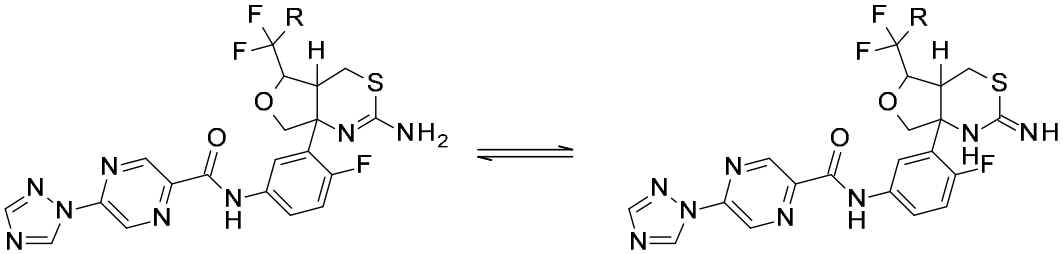
Además, es particularmente preferente N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida.

Además, malonato 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida; y

4-metilbencenosulfonato 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida son especialmente preferentes.

Una persona con experiencia ordinaria en la técnica apreciará que pueden existir compuestos de la invención en formas tautómeras, tal como se representa a continuación en el Esquema B. Cuando se da cualquier referencia en esta solicitud a uno de los tautómeros específicos de los compuestos de la invención, se entiende que abarca ambas formas tautoméricas y todas las mezclas de los mismos.

Esquema B



Además, ciertos compuestos intermedios que se describen en las siguientes preparaciones pueden contener uno o más grupos protectores de nitrógeno u oxígeno. Se entiende que los grupos protectores pueden ser variados como apreciará un experto en la técnica dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las transformaciones particulares que deben realizarse. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas por el experto en la materia y son como se describen en la literatura (Véase, por ejemplo "*Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*", Cuarta Edición, por Peter G.M. Wuts y Theodora W. Greene, John Wiley y Sons, Inc. 2007).

Los isómeros individuales, enantiómeros, y diastereómeros pueden ser separados o resueltos por un experto con experiencia común en la técnica en cualquier punto conveniente en la síntesis de los compuestos de la invención, mediante métodos tal como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (Véase por ejemplo, J. Jacques, *et al*., "*Enantiomers, Racemates, y Resolutions*", John Wiley y Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel y S.H. Wilen," *Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994).

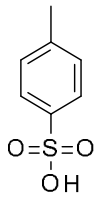
Una sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos de la invención, tal como una sal de hidrocloruro, se puede formar, por ejemplo, por reacción de una base libre adecuada de un compuesto de la invención, un ácido apropiado farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico en un disolvente adecuado tal como éter dietílico bajo condiciones estándar bien conocidas en la técnica. Además, la formación de tales sales puede ocurrir de forma simultánea, tras la desprotección de un grupo protector de nitrógeno. La formación de dichas 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 y Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities,” *Organic Process Research y 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 de la siguiente manera: "APP" se refiere a la proteína precursora amiloide; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "CDI" se refiere a 1,1'-carbonildiimidazol; "ADNc" se refiere a ácido deoxiribonucleico complementario; "DCC" se refiere a 1,3-diciclohexilcarbodiimida; "Desoxo-Fluor®" se refiere a trifluoruro de bis(2-metoxietil)aminoazufre; “DIC” se refiere a 1,3-diisopropilcarbodiimida; “DMAP” se refiere a 4-dimetilaminopiridina; “DMEM” se refiere a Medio de Eagle Modificado de Dulbecco; “DMSO” se refiere a sulfóxido de dimetilo; “EBSS” se refiere a Solución Salina equilibrada de Earle; “EDCI” se refiere a hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; “ELISA” se refiere a ensayo inmunoabsrobente ligado a enzimas; “F12” se refiere a medio F12 de Ham; “FBS” se refiere a Suero Fetal Bovino; “Fc” se refiere a fragmento cristalizable; “FLUOLEAD™” se refiere a trifluoruro de 4-*terc*-butil-2,6-dimetilfenilazufre; “FRET” se refiere a transferencia de energía por resonancia de fluorescencia; “HATU” se refiere a hexafluorofosfato de (dimetilamino)-N,N-dimetil(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-iloxi)metaniminio; “HBTU” se refiere a hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi)(dimetilamino)-N,N-dimetilmethaniminio; “HEK” se refiere a riñón de embrión humano; “HF-piridina” se refiere a fluoruro de hidrógeno piridina o reactivo de Olah o poli (fluoruro de piridina); "HOAt" se refiere a 1-hidroxi-7-azabenzotriazol; "HOBT" se refiere a hidrato de 1-hidroxilbenzotriazol; “IC_{50}" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibidora máxima posible para ese agente; " IgG_1" se refiere a un receptor Fc-gamma de dominio similar a la inmunoglobulina; "MEM" se refiere a medio esencial mínimo; “PBS” se refiere una solución salina tamponada con fosfato; "PDAPP" se refiere a proteína precursora de amiloide derivada de plaquetas; "Ph" se refiere a un grupo fenilo; "PyBOP" se refiere a hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio); “PyBrOP” se refiere a fosfoniohexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino; “RFU” se refiere a unidad de fluorescencia relativa; "RT-PCR" se refiere a reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; "SDS-PAGE" se refiere a electroforesis en gel de sulfato de sodio dodecil poliacrilamida; "SCX" se refiere a fuerte intercambio catiónico; "SFC" se refiere a cromatografía supercrítica; "T3P®" se refiere a anhídrido propilfosfónico;

"THF" se refiere a tetrahidrofurano; “TEMPO”se refiere a (2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-il)oxil; “TMEM” se refiere una proteína transmembrana; "Tritilo" se refiere a un grupo de la fórmula “$(Ph)_3C$-; "XtalFluor-E ® o sal de difluorosulfinio DAST " se refiere a tetrafluoroborato de (dietilamino)difluorosulfonio o tetrafluoroborato de N,N-dietil-S,S-difluorosulfiliminio; y " XtalFluor-M® o sal de difluorosulfinio morfo-DAST " se refiere a tetrafluoroboratode difluoro(morfolino)sulfonio o tetrafluoroborato de fluoro-4-morfolinilosulfonio.

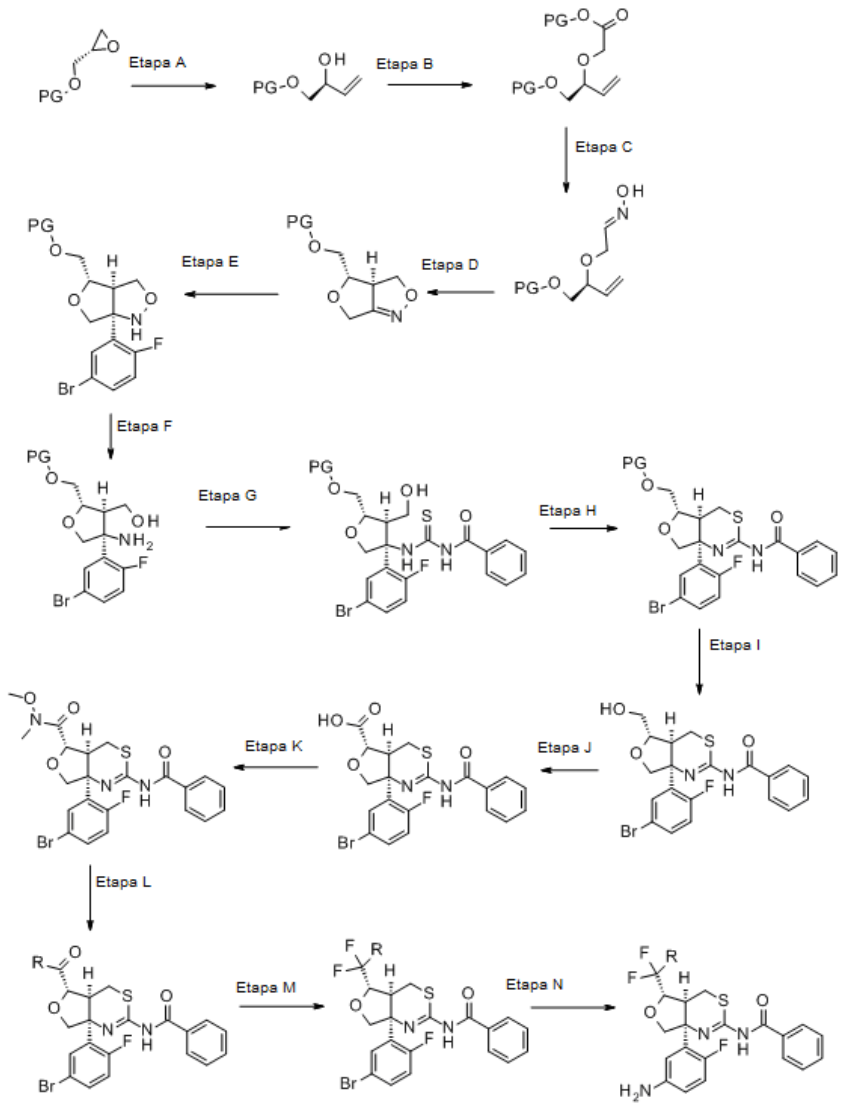
Un experto con experiencia común en la técnica entiende que los términos "tosilato", "ácido toluenosulfónico", "ácido p-toluenosulfónico", y "ácido sulfónico 4-metilbenceno" se refieren al compuesto de la siguiente estructura:



.

Los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos, pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos por una persona con experiencia común en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los esquemas, preparaciones y ejemplos a continuación. Un experto en la técnica reconoce que las etapas sintéticas específicas para cada una de las vías que se describen se pueden combinar de diferentes maneras, o en conjunción con etapas de diferentes esquemas, para preparar los compuestos de la invención, o sales de los mismos. Los productos de cada etapa en los esquemas a continuación pueden ser recuperados por métodos convencionales bien conocidos en la técnica, incluyendo extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración, y cristalización. En los esquemas a continuación, todos los sustituyentes a menos que se indique lo contrario, se definen como antes. Los reactivos y materiales partidas están fácilmente disponibles para un experto con experiencia común en la técnica. Los siguientes esquemas, preparaciones, y ejemplos además ilustran la invención.

Esquema 1



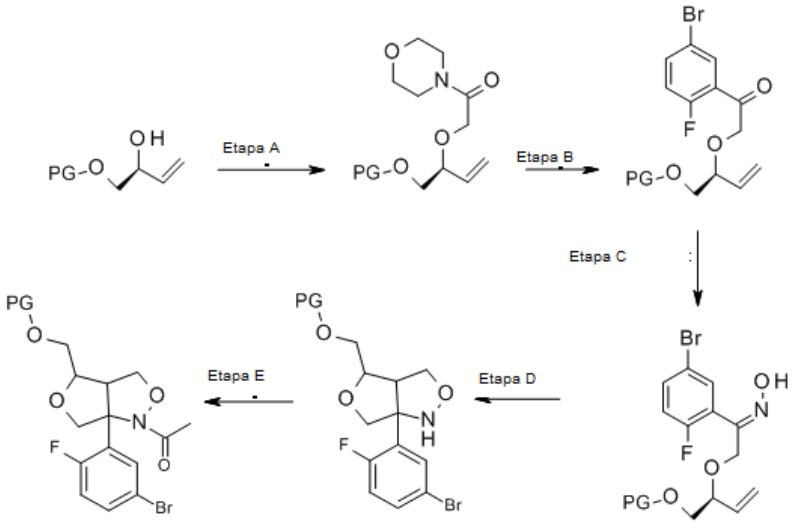
En el Esquema 1, etapa A, yoduro de trimetilsulfonio es tratado con una base orgánica tal como n-butillitio a una temperatura de aproximadamente -50 °C en un disolvente tal como THF. Un oximetil oxirano protegido, protegido con un grupo protector apropiado, tal como un grupo tritilo, después se añade a la solución básica a -10 °C y se permite agitar durante aproximadamente 2 horas para dar el producto protegido del Esquema 1, Etapa A. "PG" es un grupo protector desarrollado para el grupo oxigeno o grupo amino tal como carbamatos, amidas, o éteres. Tales grupos protectores son bien conocidos y apreciados en la técnica. El grupo protegido de la Etapa A se hace reaccionar con un α-haloéster tal como sulfato de tetra-N-butilamonio

utilizando bromoacetato de terc-butoxi u otros catalizadores de transferencia de fase sal de amonio cuaternaria en un disolvente tal como tolueno y una base inorgánica acuosa tal como hidróxido de sodio a aproximadamente temperatura ambiente para dar el compuesto del Esquema 1, Etapa B. Tales alquilaciones son bien conocidas en la técnica. Alternativamente se puede utilizar una base tal como hidruro de sodio al 60% en aceite con disolventes tal como N,N-dimetilformamida o THF y un rango de temperatura de 0 a 100 ° C para dar el grupo protegido de la Etapa B. El acetato de terc-butoxi carbonilo es convertido en una oxima en un procedimiento de 2 etapas. Un agente reductor tal como hidruro de isobutilaluminio en hexanos se añade en gotas a una temperatura de aproximadamente -70 °C seguido por la adición en gotas de un ácido acuoso tal como ácido clorhídrico a una temperatura de aproximadamente -60 °C. El procesamiento se logra con una extracción orgánica para dar el material intermedio. Este material se disuelve en un disolvente orgánico tal como diclorometano y se trata con acetato de sodio seguido por hidrocloruro de hidroxilamina para dar el producto de oxima de la Etapa C. El producto de oxima del Esquema 1, Etapa C puede convertirse en el producto de 4,5-dihidroisoxazol bicíclico de la Etapa D en una ciclación 3+2 mediante varios métodos tal como utilizando una solución acuosa de hipoclorito de sodio o un oxidante alternativo tal como N-clorosuccinimida y en un disolvente tal como *terc*-butil metil éter, tolueno, diclorometano, o xileno a una temperatura de aproximadamente 10-15 °C o con calentamiento. El grupo 2-fluoro, 5-bromo fenilo puede añadirse al dihidroisoxazol generando el reactivo organometálico. El reactivo organometálico se puede generar a partir de 4-bromo-1-fluoro-2-yodo-benceno utilizando intercambio de halógeno-metal con reactivos tal como n-butillitio o complejo de cloruro de isopropilmagnesio cloruro de litio y la adición en gotas a una temperatura de aproximadamente -78 °C a 15 °C en un disolvente tal como THF. Un ácido de Lewis tal como trifluoruro de boro éter dietílicoato después se añade para dar el producto del Esquema 1, Etapa E. El tetrahidro isoxazol bicíclico resultante puede tratarse con zinc en ácido acético para formar el producto anular abierto del Esquema 1, Etapa F. Un método alternativo para abrir el anillo de isoxazol utiliza níquel Raney en un disolvente polar tal como etanol en condiciones de hidrogenación con presión. El producto de la Etapa F después puede hacerse reaccionar con isotiocianato de benzoilo en un disolvente tal como diclorometano o THF a una temperatura de aproximadamente 5 °C a temperatura ambiente para dar el compuesto de tiourea de la Etapa G. El anillo de tiazina puede formarse utilizando anhídrido trifluorometanosulfónico y una base orgánica tal como piridina en un disolvente tal

como diclorometano a una temperatura de aproximadamente -20 °C para dar el producto de la Etapa H. El grupo protector de hidroximetilo tal como un grupo tritilo puede eliminarse en el Esquema 1, Etapa I utilizando métodos bien conocidos en la técnica tal como ácido fórmico a temperatura ambiente o con ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado en disolventes tal como diclorometano y metanol para dar el compuesto de la Etapa I. El hidroxi metilo puede oxidarse generando ácido carboxílico utilizando agentes de oxidación tal como ácido 2-iodoxibenzoico (IBX) a temperaturas de 0-22 °C en un disolvente tal como DMSO o adición de (diacetoxiiodo)benceno en porciones o todo a la vez en un disolvente tal como acetonitrilo o acetonitrilo y agua con agitación a una temperatura de aproximadamente 5-25 °C para dar el compuesto del Esquema 1, Etapa J. TEMPO también puede utilizarse como catalizador en la oxidación. La amida de Weinreb se prepara en el Esquema 1, Etapa K a partir del producto ácido de la Etapa J con la adición de hidrocloruro de N,O-dimetilhidroxilamina, una base orgánica, tal como trietilamina, y un reactivo de acoplamiento tal como HATU. La mezcla se agita a temperatura ambiente para dar el producto de la Etapa K. Otros agentes de acoplamiento que pueden ser usados incluyen CDI, carbodiimidas tal como DCC, DIC, o EDCI u otras sales de uronio o fosfonio de aniones no nucleófilos, tal como HBTU, PyBOP, y PyBOP. La amida de Weinreb después se convierte en la cetona utilizando un reactivo organometálico tal como un reactivo de Grignard o un reactivo de organolitio en la Etapa L en un disolvente tal como THF. El reactivo de Grignard apropiado puede añadirse como una solución en disolventes tal como éter o 2-metiltetrahidrofurano a la amida de Weinreb a una temperatura de aproximadamente -78 °C a 0 °C para dar la cetona de la Etapa L. En el Esquema 1, Etapa M, R y el grupo cetona del compuesto de la Etapa L puede convertirse en un grupo difluoro-R utilizando Deoxo-Fluor® en un disolvente tal como diclorometano a aproximadamente -78 °C hasta temperatura ambiente. Otro procedimiento alternativo implica la pre-mezcla de reactivo de fluoración tal como Deoxo-Fluor® con trifluoruro de boro-éter dietílicoato seguido por la adición del producto del Esquema 1, Etapa L y trihidrofluoruro de trietilamina para dar el producto del Esquema 1, Etapa M. Alternativamente, otros agentes de fluoración que pueden ser utilizados que son bien conocidos en la técnica son, trifluoruro de dietilaminoazufre (también referido como "DAST"), XtalFluor-E ® o XtalFluor-M® con un aditivo tal como trihidrofluoruro de trietilamina o FLUOLEAD ™ utilizando un aditivo tal como HF-piridina. El 5-bromo de fenilo se convierte en la amina utilizando (1R,2R)-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexanodiamina o trans-N,N'dimetilciclohexano-1,2-diamina en un disolvente

tal como etanol y añadiendo azida sódica seguido por L-ascorbato de sodio y sulfato cúprico. La reacción se calienta hasta aproximadamente 80-100 °C durante varias horas y después se procesa con una extracción utilizando un disolvente tal como acetato de etilo. El intermedio después se reduce en condiciones de hidrogenación utilizando paladio sobre carbono tal como 5-10% de paladio en disolventes tal como metanol o etanol y THF a una presión de aproximadamente 40-50 psi de hidrógeno para dar el producto de anilina del Esquema 1, Etapa N.

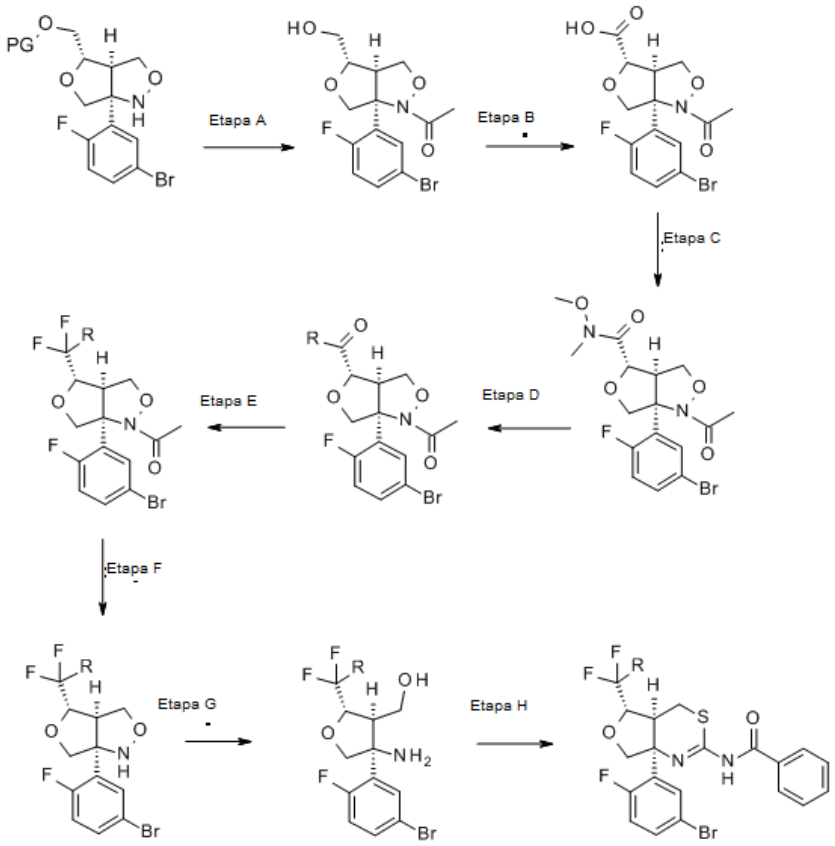
Esquema 2



Alternativamente en el Esquema 2, el producto protegido del Esquema 1, Etapa A, puede tratarse con 4-(2-cloroacetil)morfolino y una base tal como sulfato hidrógeno de tetrabutil amonio en un disolvente tal como tolueno a una temperatura de aproximadamente 5 °C para dar el producto del Esquema 2, Etapa A. El grupo morfolino después puede servir como un grupo saliente en el Esquema 2, Etapa B. Por ejemplo, el producto del Esquema 2, Etapa A puede tratarse con el reactivo de Grignard apropiado que puede prepararse in situ a partir del complejo de cloruro de litio cloruro de isopropil magnesio y 4-bromo-1-fluoro-2-iodobenceno o si el reactivo de Grignard apropiado está disponible, el reactivo puede añadirse directamente al producto del Esquema 2, Etapa A a una temperatura de aproximadamente 5 °C para dar el producto del Esquema 2, Etapa B. El acetato de carbonilo puede convertirse en una oxima con hidrocloruro de hidroxilamina y acetato de sodio con calentamiento hasta aproximadamente 50 °C para dar el producto del Esquema 2, Etapa C. el producto de oxima del Esquema 2, Etapa C después puede convertirse en el producto del Esquema 2, Etapa D (el mismo producto que en el Esquema 1, Etapa E) utilizando

hidroquinona en un disolvente tal como tolueno y calentando hasta reflujo. El producto de amina del Esquema 2, Etapa D puede acilarse con cloruro de acetilo utilizando una base orgánica tal como DMAP y piridina en un disolvente tal como diclorometano a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C para dar el producto del Esquema 2, Etapa E. El producto del Esquema 2, Etapa E después puede convertirse en el producto del Esquema 3, Etapa A como se debate más abajo.

Esquema 3

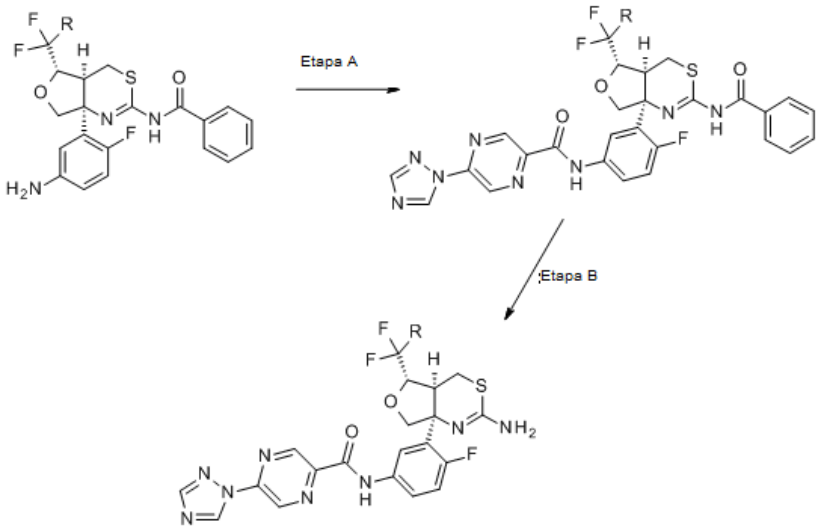


En una vía alternativa, como se describe en el Esquema 3, el isoxazol nitrógeno del compuesto del Esquema 1, Etapa E, se protege con un grupo acetilo y el grupo protector del hidroxi metilo es eliminado en un procedimiento de dos etapas. Por ejemplo, el tetrahidroisoxazol es tratado con una base orgánica tal como DMAP y piridina en un disolvente tal como diclorometano y se añade cloruro de acetilo. La temperatura se mantiene por debajo de aproximadamente 10 °C y después se permite agitar a aproximadamente temperatura ambiente. La reacción se diluye con agua y se extrae con un disolvente tal como diclorometano. Los extractos orgánicos se lavan con un ácido acuoso tal como ácido clorhídrico1 N y la fase acuosa se extrae nuevamente

con un disolvente tal como diclorometano seguido por un lavado acuoso. El disolvente orgánico puede eliminarse parcialmente y un ácido tal como ácido fórmico o ácido p-toluenosulfónico monohidratado en disolventes tal como diclorometano y metanol puede añadirse para desproteger el hidroxi metilo. La mezcla puede agitarse a temperatura ambiente o calentarse hasta temperatura de aproximadamente 40 °C hasta que esté completa la desprotección del hidroxi para dar el compuesto del Esquema 3, Etapa A. El producto hidroxi metilo del Esquema 3, Etapa A puede oxidarse generando el producto de ácido carboxílico del Esquema 3, Etapa B en una forma análoga a la del procedimiento que se describe en el Esquema 1, Etapa J, y la amida de Weinreb además puede prepararse en una forma análoga a la del procedimiento que se describe en el Esquema 1, Etapa K utilizando un agente de acoplamiento tal como CDI en una adición en porciones o añadiendo directamente con un disolvente tal como diclorometano, enfriando hasta -20 °C y agitando durante aproximadamente 1 hora y añadiendo hidrocloruro de N,O-dimetilhidroxilamina en porciones o todo a la vez. Una base orgánica tal como trietilamina también puede utilizarse para promover la reacción. Otras adiciones de CDI y N,O-dimetilhidroxilamina pueden añadirse hasta que se observe la reacción completa para dar el producto de amida de Weinreb del Esquema 3, Etapa C. La cetona del Esquema 3, Etapa D puede formarse a partir de la amida de Weinreb en una forma análoga a la del procedimiento que se describe en el Esquema 1, Etapa L. La cetona de la Etapa D puede convertirse en un grupo difluoro-R en una forma análoga a la del procedimiento que se describe en el Esquema 1, Etapa M para dar el producto del Esquema 3, Etapa E. El acetil tetrahidroisoxazol puede desprotegerse en condiciones ácidas bien conocidas en la técnica tal como utilizando ácido clorhídrico y calentando hasta aproximadamente 100 °C para dar el producto del Esquema 3, Etapa F. El tetrahidroisoxazol bicíclico puede tratarse con zinc en ácido acético para formar el producto abierto anular del Esquema 3, Etapa G en una forma análoga a la del procedimiento que se describe en el Esquema 1, Etapa F. El producto de triazina del Esquema 3, Etapa H puede prepararse en una reacción de etapa 2 en crisol utilizando isotiocianato de benzoilo en una forma análoga a la del procedimiento que se describe en el Esquema 1, Etapa G. La mezcla se evapora hasta un residuo y se añade ciclohexano. La mezcla se calienta hasta aproximadamente 60 °C y se añade metil *terc-butil éter* para disolver el residuo. La solución se filtrad y se concentra hasta sequedad. El anillo de tiazina después puede formarse en una forma análoga a la del

procedimiento que se describe en el Esquema 1, Etapa H para dar el producto del Esquema 3, Etapa H.

Esquema 4

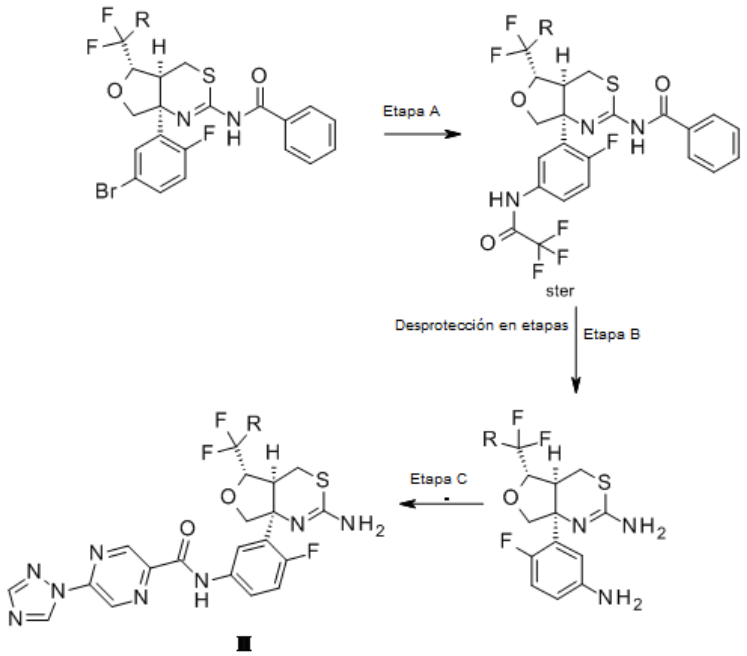


II

En el Esquema 4, Etapa A, el producto de anilina del Esquema 1, Etapa N puede acoplarse con un ácido carboxílico heteroaromático utilizando condiciones de acoplamiento bien conocidas en la técnica. Un experto en la técnica reconocerá que hay una serie de métodos y reactivos para la formación de amida resultante de la reacción de ácidos carboxílicos y aminas. Por ejemplo, la reacción de una anilina apropiada con un ácido apropiado en presencia de un reactivo de acoplamiento y una base de amina tal como diisopropiletilamina o trietilamina, dará un compuesto del Esquema 4, Etapa A. Los reactivos de acoplamiento incluyen carbodiimidas tal como DCC, DIC, EDCI, y oximas aromáticas tal como HOBt y HOAt. Además, sales de uronio o fosfonio de aniones no nucleófilos tal como HBTU, HATU, PyBOP, y PyBOP o un anhídrido fosfórico cíclico tal como T3P® se puede utilizar en lugar de los reactivos de acoplamiento más tradicionales. Aditivos tal como DMAP pueden utilizarse para mejorar la reacción. Alternativamente, la amina anilina puede acilarse utilizando cloruros de benzoilo sustituidos en presencia de una base tal como trietilamina o piridina. En el Esquema 4, Etapa B, la tiazina amina protegida después puede desprotegerse con una base orgánica tal como piridina y O-metilhidrocloruro de hidroxilamina en disolventes tal como THF y etanol y una base orgánica tal como piridina para proporcionar el compuesto de Fórmula II. Alternativamente una base

inorgánica tal como hidróxido de litio en metanol puede utilizarse para desproteger la tiazina para proporcionar el compuesto de Fórmula II.

Esquema 5



Alternativamente, en el Esquema 5, el producto de bromuro del Esquema 1, Etapa M se convierte en una anilina protegida utilizando trifluoroacetamida, yoduro de cobre, una diamina tal como trans, racemic-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexano diamina, una base inorgánica tal como carbonato de potasio, y yoduro de sodio con calentamiento hasta aproximadamente 100-130 °C para dar el producto de anilina protegida del Esquema 5, Etapa A. La anilina y tiazina amina protegida puede desprotegerse después paso a paso. La trifluoroacetamida puede ser hidrolizada utilizando una base tal como amoníaco 7 N en metanol para dar una anilina y tiazina protegida, el mismo producto del Esquema 1, Etapa N. La tiazina después puede desprotegerse en condiciones bien conocidas en la técnica y que se describen en el Esquema 4, Etapa B utilizando hidrocloruro de O-metil hidroxilamina en un disolvente tal como etanol y THF con una base orgánica tal como piridina seguido por calentamiento hasta aproximadamente 55 °C o agitación a temperatura ambiente seguido por concentración y purificación para dar el producto del Esquema 5, Etapa B. Alternativamente, el orden de desprotección podría revertirse con la tiazina desprotegida primero y la anilina desprotegida última. En el Esquema 5, Etapa C, el producto de anilina de la Etapa B después puede hacerse reaccionar con el ácido

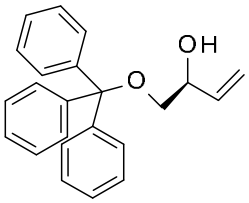
carboxílico apropiado o cloruro de ácido como se describe en el Esquema 4, Etapa A para dar los productos de Fórmula II.

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 adecuada de las Fórmulas I, Ia, II, o IIa y un ácido farmacéuticamente apropiado tal como ácido clorhídrico, ácido p-toluenosulfónico, ácido malónico o en un disolvente adecuado tal como éter dietílico en condiciones estándar bien conocidas en la técnica. Además, la formación de tales sales puede ocurrir de forma simultánea, tras la desprotección de un grupo protector de nitrógeno. La formación de dichas 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 y Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities,"

Las siguientes preparaciones y ejemplos además ilustran la invención.

Preparación 1

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



Esquema 1, etapa A: Agitar yoduro de trimetilsulfonio (193,5 g, 948,2 mmol) en THF (1264 ml) a temperatura ambiente durante 75 minutos. Enfriar la mezcla hasta -50 °C y añadir n-butillitio (2,5 mol/L en hexanos, 379 ml, 948,2 mmol) a través de cánula, durante un período de 30 minutos. Permitir que la reacción se caliente gradualmente hasta -30 °C y agitar durante 60 minutos. Añadir oxirano(2S)-2-de tritiloximetilo (100 g, 316,1 mmol) en porciones, manteniendo la temperatura debajo de -10 °C. Después de la adición completa, permitir que la mezcla de reacción se caliente hasta temperatura ambiente y agitar durante 2 horas. Verter la reacción en cloruro de amonio saturado, separar las fases, y extraer la fase acuosa con acetato de etilo. Combinar las capas orgánicas y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con metil t-butil éter: hexanos (10-15% de gradiente), para dar el compuesto del título (56,22 g, 54%). ES/MS m/z 353 (M+Na).

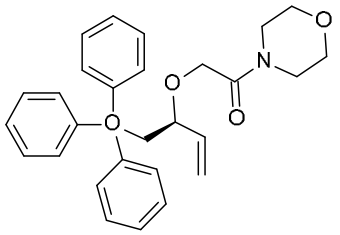
Preparación alternativa 1

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

Esquema 2, etapa A material de partida: Añadir 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 diclorometano (850 ml). Agitar durante 24 horas a 24 °C. Añadir ácido cítrico acuoso 1N (425 ml). Separar las capas y concentrar el extracto orgánico con presión reducida hasta sequedad. Añadir metanol (900 ml) y enfriar hasta 5 °C durante 1 hora. Recolectar los sólidos por filtración y lavar con 5 °C metanol (50 ml). Descartar los sólidos y concentrar las aguas madres con presión reducida hasta sequedad. Añadir tolueno (800 ml) y concentrar hasta una masa de 268 g para obtener el compuesto del título (129 g, 67%) en una solución 48% en peso de tolueno.

Preparación 2

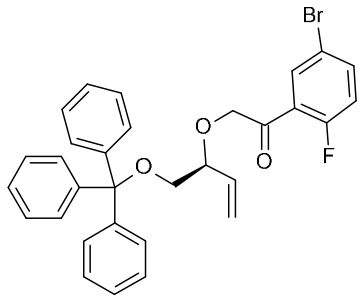
1-morfolino-2-[(1S)-1-(tritiloximetil)aliloxi]etanona



Esquema 2, etapa A: Añadir sulfato hidrógeno de tetrabutil amonio (83,2 g, 245,0 mmol) y 4-(2-cloroacetil)morfolina (638,50 g, 3902,7 mmol) a una solución de 1-tritiloxibut-3-en-2-ol (832,4 , 2519 mmol) en tolueno (5800 ml) que está entre 0 y 5 °C. Añadir hidróxido de sodio (1008,0 g, 25202 mmol) en agua (1041 ml). Agitar durante 19 horas entre 0 y 5 °C. Añadir agua (2500 ml) y tolueno (2500 ml). Separar las capas y lavar el extracto orgánico con agua (2 × 3500 ml). Concentrar el extracto orgánico con presión reducida hasta sequedad. Añadir tolueno (2500 ml) al residuo y después añadir n-heptano (7500 ml) lentamente. Agitar durante 16 horas. Recolectar los sólidos resultantes por filtración y lavar con n-heptano (1200 ml). Secar el sólido al vacío para obtener el compuesto del título (1075,7 g, 98%).

Preparación 3

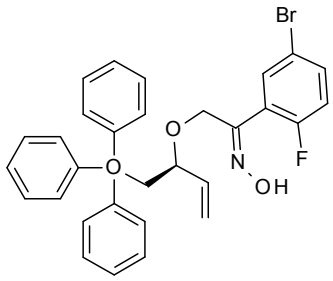
1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-[(1S)-1-(tritiloximetil)aliloxi]etanona



Esquema 2, etapa B: Añadir una solución 1,3 M de complejo de cloruro de litio cloruro de isopropil magnesio (3079 ml, 2000 mmol) en THF a una solución de 4-bromo-1-fluoro-2-iodobenceno (673,2 g, 2237,5 mmol) en tolueno (2500 ml) a una velocidad para mantener la temperatura de reacción por debajo de 5 °C. Agitar durante 1 hora. Añadir la solución de Grignard resultante (5150 ml) a una solución de 1-morfolino-2-[(1S)-1-(tritiloximetil)aliloxi]etanona (500 g, 1093 mmol) en tolueno (5000 ml) a una velocidad para mantener la temperatura de reacción por debajo de 5 °C. Agitar durante 3 horas manteniendo la temperatura por debajo de 5 °C. Añadir solución de Grignard preparada adicional (429 ml) y agitar durante 1 hora. Añadir una solución de ácido cítrico acuoso 1N (5000 ml) a una velocidad para mantener la temperatura por debajo de 5 °C. Separar las capas y lavar el extracto orgánico con agua (5000 ml). Concentrar la solución con presión reducida hasta sequedad. Añadir metanol (2000 ml) al residuo y concentrar para dar 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-(tritiloximetil)aliloxi]etanona oxima

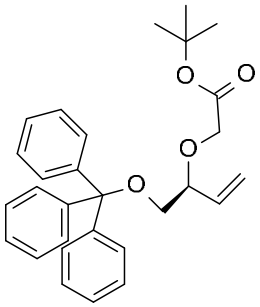


Esquema 2, etapa C: Añadir hidrocloruro de hidroxilamina (98,3 g) a 1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-[(1S)-1-(tritiloximetil)aliloxi]etanona (450 g, 707 mmol) y acetato de sodio (174 g) en metanol (3800 ml). Calentar la solución hasta 50 °C durante 2 horas. Enfriar hasta 24 °C y concentrar. Añadir agua (1000 ml) y tolueno (1500 ml) al residuo. Separar las capas y extraer la fase acuosa con tolueno (500 ml). Combinar el extracto orgánico y lavar con agua (2 × 400 ml). Concentrar la solución con presión

reducida para dar el compuesto del título as un residuo (567 g, 61,4% de potencia, 88%).

Preparación 5

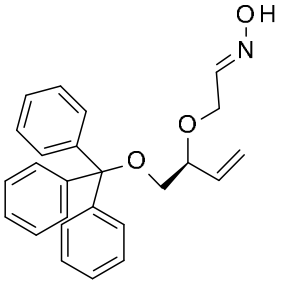
2-[(1S)-1-(tritiloximetil)aliloxi]acetato de terc-butilo



Esquema 1, etapa B: Añadir (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 tolueno (376 ml). Añadir hidróxido de sodio (50% de masa) en agua (119 ml) seguido por *terc*-butil-2-bromoacetato (110,20 g, 565,0 mmol). Agitar la mezcla de reacción durante 18 horas a temperatura ambiente. Verter en agua, separar las fases, y extraer la fase acuosa con acetato de etilo. Combinar las capas orgánicas y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar la mezcla y concentrar con presión reducida para dar el compuesto del título (77,86 g, 77%). ES/MS m/z 467 (M+Na).

Preparación 6

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

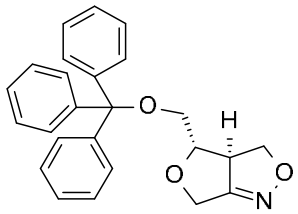


Esquema 1, etapa C: Enfriar una solución de 2-[(1S)-1-(tritiloximetil)aliloxi]acetato de terc-butilo (77,66 g, 174,7 mmol) en diclorometano (582,2 ml) hasta -78 °C. Añadir una solución de hidruro de diisobutilaluminio en hexanos (1 mol/L, 174,7 ml) en gotas durante un período de 35 minutos y mantener la temperatura por debajo de -70 °C. Agitar a -78 °C durante 5 horas. Añadir ácido clorhídrico en agua (2 mol/L, 192,1 ml) a la mezcla de reacción en gotas, manteniendo la temperatura debajo de -60 °C. Permitir que la reacción se caliente gradualmente hasta temperatura ambiente y agitar durante

60 minutos. Separar el extracto orgánico y lavar con bicarbonato de sodio saturado. Secar la solución sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Disolver el residuo en diclorometano. Añadir acetato de sodio (28,66 g, 349,3 mmol), seguido por hidrocloruro de hidroxilamina (18,21 g, 262,0 mmol). Agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Verter en agua, separar las fases, y extraer la fase acuosa con diclorometano. Combinar las capas orgánicas y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar la mezcla y concentrar con presión reducida para dar el compuesto del título (68,38 g, 101%). ES/MS m/z 386 (M-H).

Preparación 7

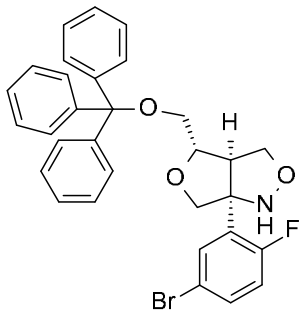
(3aR,4S)-4-(tritiloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol



Esquema 1, etapa D: Enfriar una solución de (1E)-2-[(1S)-1-(tritiloximetil)aliloxi]acetaldehído oxima (55,57 g, 143,4 mmol) en *terc*-butil metil éter (717 ml) hasta 5 °C. Añadir hipoclorito de sodio (5% en agua, 591 ml, 430,2 mmol) en gotas, manteniendo la temperatura debajo de 10 °C. Agitar a 10 °C durante 30 minutos. Permitir que la reacción se caliente hasta 15 °C. Agitar a 15 °C durante 18 horas. Diluir la mezcla de reacción con acetato de etilo y lavar con bicarbonato de sodio saturado. Separar las fases, lavar la fase orgánica con una solución de sulfito hidrógeno de sodio al 5% y salmuera. Secar la solución sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con 50% metil *terc-butil éter*/diclorometano: hexanos (20-27% de gradiente), para dar 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-(tritiloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol



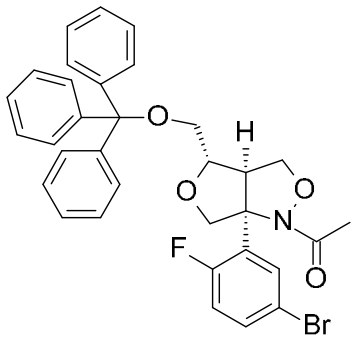
Esquema 1, etapa E: Enfriar una solución de 4-bromo-1-fluoro-2-iodo-benceno (86,94 g, 288,9 mmol) en THF (144,5 ml) y tolueno (1445 ml) hasta -78 °C. Añadir n-butillitio (2,5 M en hexanos, 120 ml, 288,9 mmol) en gotas, manteniendo la temperatura debajo de -70 °C. Agitar durante 30 minutos a -78 °C. Añadir eterato de dietil trifluoruro de boro (36,5 ml, 288,9 mmol) en gotas, mantener la temperatura por debajo de -70 °C. Agitar la solución durante 30 minutos a -78 °C. Añadir una solución de (3aR,4S)-4-(tritiloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol (55,69 g, 144,5 mmol) en THF (482 ml) en gotas a la reacción, durante un período de 30 minutos, mantener la temperatura por debajo de -65 °C. Agitar a -78 °C durante 90 minutos. Añadir rápidamente cloruro de amonio saturado, mantener la temperatura por debajo de -60 °C. Verter en salmuera, y extraer la fase acuosa con acetato de etilo. Combinar el extracto orgánico y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con 10-15% éter dietílico:hexanos (0-70% de gradiente), para dar el compuesto del título (36,52 g, 45%). ES/MS *m/*e (^{79}Br/^{81}Br) 560/562 [M+H].

Preparación alternativa 8

Esquema 2, etapa D: Calentar una solución de 1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-[(1S)-1-(tritiloximetil)aliloxi]etanona oxima (458 g, 502 mmol) y hidroquinona (56,3g 511 mmol) en tolueno (4000 ml) hasta reflujo bajo nitrógeno durante 27 horas. Enfriar la solución hasta 24 °C y añadir carbonato de sodio acuoso (800 ml). Separar las capas y extraer la fase acuosa con tolueno (300 ml). Combinar el extracto orgánico y lavar con agua (2 × 500 ml). Concentrar la solución con presión reducida para dar un residuo. Añadir alcohol isopropílico (1500 ml) y calentar hasta reflujo. Enfriar hasta 24 °C y recolectar los sólidos por filtración. Secar el sólido al vacío para obtener el compuesto del título (212 g, 75%).

Preparación 9

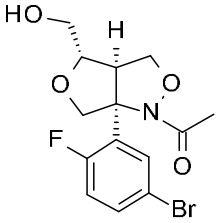
1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritiloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-1-il]etanona



Esquema 2, etapa E: Añadir cloruro de acetilo (35,56 g, 503,9 mmol) a una solución de (3aR,4S,6aR)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritiloximetil)-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. Agitar durante 1 hora y después añadir agua (300 ml) y ácido sulfúrico 1M (300 ml). Agitar la mezcla durante 10 minutos y permitir que las capas se separen. Recolectar el extracto orgánico y lavar con carbonato de sodio saturado (500 ml) y agua (500 ml). Secar la solución sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar 1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritiloximetil)-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-il]etanona



Esquema 3, etapa A: En un reactor con camisa de 20 l añadir cloruro de acetilo (290 ml, 4075 mmol) a una solución de (3aR,4S,6aR)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritiloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol (1996 g, 3384 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 completar la adición (1 hora) calentar hasta 20 °C y agitar durante toda la noche. Si la reacción está incompleta, añadir cloruro de acetilo, DMAP, piridina, y diclorometano hasta que se observe la reacción completa. Enfriar la mezcla de reacción hasta 0 °C y lentamente

añadir agua (5 l), agitar la mezcla de reacción a 10 °C durante 30 minutos y permitir que las capas se separen. Recolectar el extracto orgánico y lavar la fase acuosa con diclorometano (1 l). Lavar los extractos orgánicos combinados con ácido clorhídrico acuoso1 N (2 × 4 l), extraer la fase acuosa con diclorometano (2 × 1 l). Lavar los extractos orgánicos combinados con agua (4 l) y eliminar el disolvente con presión reducida proporcionar el volumen total de aproximadamente 5 l. Añadir ácido fórmico al 90% (1800 ml) y dejar reposar a temperatura ambiente durante 3 días. Calentar hasta 40 °C durante 2 horas después eliminar el disolvente con presión reducida. Diluir el residuo con metanol (4 l) y lentamente añadir carbonato de sodio acuoso saturado (3 l). Añadir carbonato de sodio sólido (375 g) para ajustar el pH hasta 8-9. Agitar a 45 °C durante 1 hora después enfriar hasta temperatura ambiente. Eliminar los sólidos por filtración, lavando con metanol (4 × 500 ml) después tratar con hidróxido de sodio acuoso 2 N (100 ml) y dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Eliminar los sólidos por filtración, lavando con metanol (2 × 100 ml). Evaporar el disolvente con presión reducida y dividir el residuo entre acetato de etilo (5 l) y agua (2 l). Extraer la fase acuosa con acetato de etilo (2 l) y lavar los extractos orgánicos combinados con salmuera (2 × 1 l). Eliminar el disolvente con presión reducida, añadir metil *terc-butil éter* (2,5 l) y evaporar hasta sequedad. Añadir metil *terc-butil éter* (4 l) y agitar a 65 °C durante 1 hora enfriar hasta temperatura ambiente y recolectar los sólidos por filtración, lavando con metil *terc-butil éter* (3 × 500 ml). Secar al vacío hasta un sólido color beige. Calentar este sólido en tolueno (7,5 l) hasta 110 °C hasta que se disuelva completamente, enfriar hasta 18 °C durante 1 hora, y agitar a esta temperatura durante 1 hora. Calentar hasta 40 °C y cuando se forma el precipitado, enfriar hasta 18 °C una vez más. Agitar durante 45 minutos después recolectar los sólidos por filtración, lavando con tolueno (2 × 500 ml). Secar el sólido al vacío para obtener el compuesto del título (443,1 g, 36%, 95% de pureza por LCMS). Evaporar el filtrado *al vacío* para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía flash en gel de sílice, eluyendo con 20% a 100% de acetato de etilo en isohexano. Suspender el producto que contiene fracciones en metil *terc-butil éter* (2 l) a 60 °C durante 30 minutos, enfriar hasta temperatura ambiente, y recolectar los sólidos por filtración, lavando con metil *terc-butil éter* (2 × 200 ml). Secar los sólidos al vacío para dar el compuesto del título como un sólido cristalino de color beige (304 g, 24%, 88% de pureza por LCMS). Evaporar el filtrado *al vacío* hasta un residuo. Purificar el residuo por cromatografía flash en gel de sílice, eluyendo con 20% a 100% de acetato de etilo en isohexano para

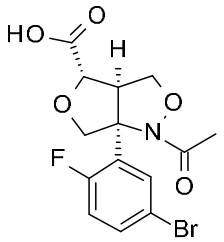
dar el compuesto del título (57,8 g, 5%, 88% de pureza por LCMS). ES/MS: m/z ($^{79}Br/^{81}Br$) 360,0/362,0 [M+H].

Preparación alternativa 10

Esquema 3, etapa A: Añadir 1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritiloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-1-il]etanona (69 g, 114,5 mmol) a una solución 15 °C de ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (2,2 g, 11,45 mmol), diclorometano (280 ml) y metanol (700 ml). Agitar durante 18 horas y después eliminar el disolvente con presión reducida. Diluir el residuo con diclorometano (350 ml) y añadir 1 M carbonato de sodio acuoso (140 ml) y agua (140 ml). Separar las capas y evaporar la capa orgánica con presión reducida. Añadir tolueno (350 ml) al residuo y calentar hasta reflujo durante 1 hora. Enfriar hasta 10-15 °C a una velocidad de 10 °C/hora. Recolectar los sólidos por filtración y lavar con tolueno (70 ml). Secar el sólido al vacío para obtener el compuesto del título (30 g, 65%) como un sólido gris.

Preparación 11

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



Esquema 3, etapa B: Añadir agua (2 l) a una suspensión de 1-[(4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-1-il]etanona (804,9 g, 2177 mmol), TEMPO (40,0 g, 251 mmol) en acetonitrilo (4,5 l) en un reactor con camisa de 20 l y enfriar hasta una temperatura interna de 5 °C. Añadir (diacetoxiiodo)benceno (1693 g, 4993,43 mmol) en porciones durante 30 minutos. Controlar la exoterma utilizando enfriamiento del reactor y después mantener a 20 °C hasta que LCMS muestre la reacción completa. Lentamente añadir 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. Agitar durante 30 minutos y después enfriar hasta 5 °C. Añadir agua (2 l), después lentamente añadir 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. Añadir acetato de etilo (2 l) e isohexano (5 l), agitar enérgicamente y separar las capas. Extraer las capas orgánicas bifásicas con agua (1 l) y lavar la fase acuosa combinada con metil *terc-butil éter*

(2,5L). Enfriar los extractos acuosos hasta 5 °C y lentamente añadir 37% de ácido clorhídrico (1,4 l) durante 30 minutos manteniendo la temperatura interna alrededor de 5 °C. Añadir acetato de etilo (5 l), separar las capas y lavar la fase orgánica con salmuera (3 × 1 l). Extraer los extractos acuosos combinados con acetato de etilo (2,5 l), lavar las fases orgánicas combinadas con salmuera (1 l), después secar con sulfato de sodio, y filtrar. Diluir las fases orgánicas con heptano (2,5 l) y evaporar hasta sequedad con presión reducida. Añadir metil *terc-butil éter* (1,5 l) y heptano (1,5 l) y evaporar hasta sequedad. Añadir heptano (2,5 l) y evaporar hasta sequedad dos veces. Añadir heptano (500 ml) y metil *terc-butil éter* (500 ml) y agitar a 40 °C durante 30 minutos después recolectar el precipitado por filtración, lavando con heptano/metil *terc-butil éter* (1:1, 1 l) después metil *terc-butil éter* (3 × 300 ml) y secar con aire para dar el compuesto del título como un sólido cristalino de color beige (779 g, 91%). ES/MS: m/z ($^{79}Br/^{81}Br$) 374,0/376,0 [M+H].

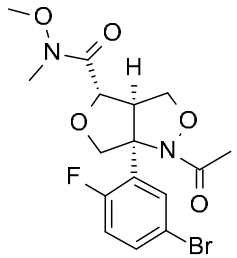
$[\alpha]_D^{20}$ = -19,0 ° (C=1,004, cloroformo).

Preparación alternativa 11

Esquema 3, etapa B: Añadir 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-c]isoxazol-1-il]etanona (30 g, 73,3 mmol), TEMPO (1,14 g, 7,30 mmol) y (diacetoxiiodo)benceno (51,9 g, 161 mmol). Enfriar hasta 15 °C y agitar durante 2 horas. Lentamente añadir tiosulfato de sodio (21 g) y carbonato de potasio (22 g) en agua (150 ml) a temperatura ambiente. Agitar durante 1 hora y después añadir metil *terc-butil éter* (150 ml). Separar las capas y ajustar el pH de la capa acuosa hasta 2-3 con ácido sulfúrico concentrado. Añadir acetato de etilo (150 ml) y separar las capas. Evaporar la capa orgánica hasta sequedad con presión reducida. Añadir n-heptano (90 ml) y calentar hasta reflujo durante 1 hora. Enfriar hasta 15 °C y después recolectar el precipitado por filtración, lavando con n-heptano (90 ml). Secar al vacío para dar el compuesto del título como un sólido blanco (27 g, 98%).

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



Esquema 3, etapa C: En un reactor con camisa de 10 lr, enfriar 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, 2019 mmol) en diclorometano (7,0 l) hasta 0 °C bajo nitrógeno y añadir CDI (400 g, 2421 mmol) en porciones durante 40 minutos. Enfriar la camisa del reactor hasta -20 °C y agitar durante 1 hora y después añadir hidrocloruro de N,O-dimetilhidroxilamina (260,0 g, 2612 mmol) en porciones durante aproximadamente 30 minutos. Agitar a -20 °C durante 1 hora, a 0 °C durante 2 horas, y a 10 °C durante 7 horas. Añadir CDI (175 g, 1058 mmol) y agitar a 10 °C durante toda la noche. Añadir además CDI (180 g, 1088 mmol) a 10 °C y agitar durante 1 hora después añadir hidrocloruro de N,O-dimetilhidroxilamina (140 g, 1407 mmol) y continuar agitando a 10 °C. si la reacción está incompleta, pueden realizarse cargas adicionales de CDI seguido por hidrocloruro de N,O-dimetilhidroxilamina hasta que se observe la reacción completa. Enfriar la mezcla de reacción hasta 5 °C y lavar con ácido clorhídrico acuoso 1 N (5 l) después ácido clorhídrico acuoso 2 N (5 l). Extraer la solución acuosa combinada con diclorometano (1 l), combinar el extracto orgánico y lavar con agua (2,5 l), hidróxido de sodio acuoso 1N (2,5 l), y agua (2,5 l), secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y evaporar con presión reducida para dar un residuo. Añadir metil *terc-butil éter* (3 l) y evaporar con presión reducida. Añadir además metil *terc-butil éter* (2 l) y agitar a 50 °C durante 1 hora, enfriar hasta 25 °C y agitar durante 30 minutos. Recolectar los sólidos resultantes por filtración, lavar con metil *terc-butil éter* (2 × 500 ml) y secar al vacío para dar el compuesto del título (760 g, 88%) como un sólido blanco. ES/MS: m/z (^{79}Br/^{81}Br) 417,0/419,0 [M+H].

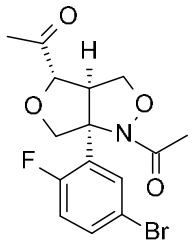
Preparación alternativa 12

Esquema 3, etapa C: Enfriar 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 (27g, 70,7 mmol) en N,N-dimetilformamida (135 ml) hasta 0 °C bajo nitrógeno y añadir CDI (14,9 g, 91,9 mmol). Agitar durante 1 hora y después añadir hidrocloruro de N,O-dimetilhidroxilamina (9,0 g, 92 mmol) y trietilamina (14,3 g, 141 mmol). Agitar a 15 °C durante 16 horas. Enfriar la mezcla de reacción hasta 0 °C y añadir ácido sulfúrico

acuoso 0,5 M (675 ml). Agitar durante 1 hora. Recolectar los sólidos resultantes por filtración. Suspender los sólidos en metil *terc-butil éter* (90 ml) durante 1 hora. Recolectar los sólidos por filtración, lavar con metil *terc-butil éter* (30 ml). Secar al vacío para dar el compuesto del título (23 g, 78%) como un sólido.

Preparación 13

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



Esquema 3, etapa D: En un reactor con camisa de 20 l, enfriar 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) hasta -60 °C y añadir una solución 3,2 M de bromuro de metilmagnesio en 2-metiltetrahidrofurano (660 ml, 2110 mmol) en gotas, manteniendo al mismo tiempo la temperatura interna por debajo de -40 °C. Agitar la mezcla de reacción a -40 °C durante 30 minutos después enfriar hasta -50 °C y añadir una solución de ácido clorhídrico acuoso 1 N (2 l) en THF (2 l) manteniendo la temperatura interna por debajo de -38 °C. Aumentar la temperatura hasta 10 °C y añadir acetato de etilo (5 l) y agua (1 l), agitar y permitir que la temperatura interna alcance 5 °C y separar las capas. Extraer la capa acuosa con acetato de etilo (1 l) y combinar los extractos orgánicos. Lavar los extractos orgánicos con agua (2 l) y extraer la capa acuosa con acetato de etilo (1 l). Combinar el extracto orgánico y lavar con salmuera (3 × 2 l) después secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y evaporar con presión reducida hasta un residuo. Añadir ciclohexano (2,5 l), agitar a 60 °C durante 1 hora después a 20 °C durante 30 minutos, y recolectar el sólido por filtración, lavando con ciclohexano (500 ml). Secar el sólido al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (565 g, 99%). ES/MS: m/z (^{79}Br/^{81}Br) 372,0/374,0 [M+H], $[\alpha]_D^{20}$ = -58,0 ° (C=1,000, cloroformo).

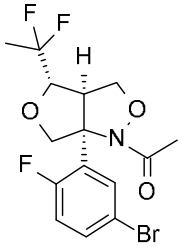
Preparación alternativa 13

Esquema 3, etapa D: Enfriar 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 (4,0g, 9,59 mmol) en THF (60 ml) hasta -5 °C y añadir una solución 3,0 M

de bromuro de metilmagnesio en 2-metiltetrahidrofurano (5,0 ml, 15 mmol) en gotas, manteniendo al mismo tiempo la temperatura interna entre -5 y 0 °C. Agitar la mezcla de reacción entre -5 y 0 °C durante 60 minutos después añadir una solución de cloruro de amonio saturado (20 ml). Añadir metil *terc-butil éter* (40 ml), permitir que la temperatura interna alcance 5 °C y separar las capas. Evaporar la capa orgánica con presión reducida hasta un residuo. Añadir n-heptano (50 ml), agitar, y recolectar el sólido por filtración. Secar el sólido al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido (3,0 g, 77%).

Preparación 14

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



Esquema 3, etapa E: Añadir 1-[(3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-4-il]etanona (5,08 g, 13,6 mmol) en una porción simple a una suspensión agitada de XtalFluor-M® (10,02 g, 39,18 mmol) en diclorometano anhidro (100 ml) a 0-5 °C. Agitar la mezcla durante 10 minutos y añadir trihidrofluoruro de trietilamina (4,5 ml, 27 mmol) en gotas durante 10 minutos. Agitar la mezcla de reacción en el baño con hielo durante 8 horas después calentar hasta temperatura ambiente y agitar durante toda la noche. Añadir carbonato de sodio acuoso saturado (100 ml) y agitar durante 1 hora. Separar las capas y extraer la fase acuosa con diclorometano (2 × 50 ml). Combinar los extractos orgánicos y lavar con bicarbonato de sodio acuosos saturado (100 ml), ácido clorhídrico acuoso 2 N (2 × 100 ml), y salmuera (100 ml). Evaporar hasta sequedad hasta un sólido marrón claro y disolver en metil *terc-butil éter* (300 ml) at 60 °C. Filtrar la solución caliente y evaporar el filtrado para dar un sólido marrón (5,3 g, 81%, 82% de pureza por LCMS) que se utiliza sin purificación adicional. ES/MS: m/z (^{79}Br/^{81}Br) 393,8/395,8 [M+H].

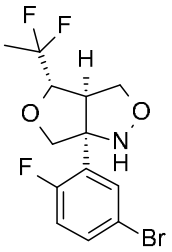
Preparación alternativa 14

Esquema 3, etapa E: Añadir 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-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol-4-il]etanona (565 g, 1,51 mol) en diclorometano anhidro (5

l) a -14 °C. Agitar la mezcla durante 10 minutos y añadir trihidrofluoruro de trietilamina (550 g, 3,34 mol) en gotas durante 20 minutos. Agitar la mezcla de reacción a -10 °C durante aproximadamente 10 horas después calentar hasta temperatura ambiente y agitar durante toda la noche. Añadir hidróxido de sodio acuoso al 50% (750 ml) lentamente, manteniendo la temperatura interna por debajo de 10 °C, después añadir agua (1,5 l) y carbonato hidrógeno de sodio acuoso saturado (1 l) y agitar durante 30 minutos. Separar las capas y extraer la fase acuosa con diclorometano (1 l). Combinar los extractos orgánicos y lavar con salmuera (3 l), ácido clorhídrico acuoso 2 N (5 l), y salmuera (3 l). Evaporar para dar un residuo y purificar por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 50-100% diclorometano en iso-hexano después metil *terc-butil éter* al 10% en diclorometano para dar el compuesto del título como un polvo blanco (467 g, 73%, 94% de pureza por LCMS). ES/MS: m/z (^{79}Br/^{81}Br) 393,8/395,8 [M+H].

Preparación 15

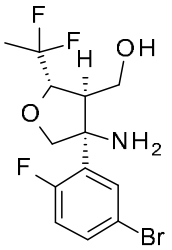
(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(1,1-difluoroetil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]isoxazol



Esquema 3, etapa F: Añadir 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)tetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-1-il]etanona (570 g, 1,45 mol) en 1,4-dioxano (5 l) en un reactor con camisa de 10 l y agitar a 100 °C durante aproximadamente 3 horas o hasta que LCMS muestra la reacción completa. Enfriar la mezcla de reacción hasta 10 °C, diluir con agua (1 l) y añadir una mezcla 50 % en peso de solución acuosa de hidróxido de sodio (800 ml) y agua (1 l) lentamente, manteniendo la temperatura interna por debajo de 20 °C. Añadir acetato de etilo (2,5 l) y agitar enérgicamente, antes de separar las capas y lavar la fase orgánica con salmuera (2 l), salmuera adicional (1 l), y agua (1 l). Secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar hasta sequedad con presión reducida para dar un residuo. Añadir ciclohexano (2,5 l) y evaporar hasta sequedad después repetir para obtener el compuesto del título como un aceite marrón (527 g, 89%, 86% de pureza por LCMS). ES/MS: m/z (^{79}Br/^{81}Br) 351,8/353,8 [M+H].

Preparación 16

[(2S,3R,4S)-4-Amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(1,1-difluoroetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol



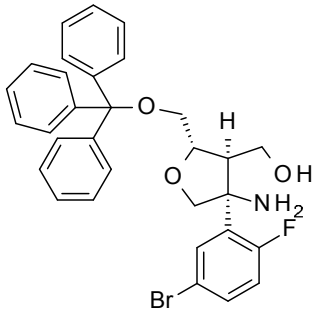
Esquema 3, etapa G: Añadir zinc en polvo (6,0 g, 92 mmol) a una solución de (3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(1,1-difluoroetil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]isoxazol (5,06 g, 13,4 mmol) en ácido acético (100 ml) a temperatura ambiente y agitar durante toda la noche. Diluir la mezcla con acetato de etilo (200 ml) y agua (300 ml) y agitar enérgicamente mientras se añade carbonato de sodio (97 g, 915 mmol). Separar las capas y lavar la capa orgánica con salmuera (2 × 200 ml), secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 0% a 100% de metil *terc-butil éter* en isohexano para dar el compuesto del título como un sólido ceroso (4,67 g, 89%, 90% de pureza por LCMS). ES/MS: m/z (^{79}Br/^{81}Br) 354,0/356,0 [M+H].

Preparación alternativa 16

Esquema 3, etapa G: Añadir zinc en polvo (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 después calentar hasta 40 °C y agitar durante toda la noche. Diluir la mezcla agua (2 l) y agitar enérgicamente mientras se añade carbonato de sodio (4 kg, 43,4 mol) después ajustar hasta pH 8-9 con carbonato de sodio adicional. Añadir acetato de etilo (5 l) y agua (2,5 l), agitar durante 30 minutos y filtrar a través de tierra de diatomeas lavando con 2:1 acetonitrilo/agua. Separar las capas, extraer la fase acuosa con acetato de etilo (2 × 2,5 l) y lavar los extractos orgánicos combinados con salmuera (2 × 2,5 l), secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar para dar un residuo. Purificar el residuo por SFC, columna: Chiralpak AD-H (5), 50 × 250 mm; eluente: 12% etanol (0,2% dietilmetilamina en CO_2; tasa de flujo: 340 g/minuto a UV 220 nm para dar el compuesto del título como un sólido blanco (197,7 g, 84%). $[\alpha]_D^{20}$ = -6,93 ° (C=0,678, cloroformo). ES/MS: m/z (^{79}Br/^{81}Br) 354,0/356,0 [M+H].

Preparación 17

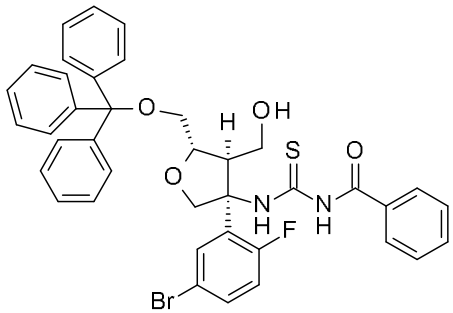
[(2S,3R,4S)-4-amino-4-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-(tritiloximetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol



Esquema 1, etapa F: Añadir (3aR,4S,6aR)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritiloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]isoxazol (31,30 g, 55,9 mmol) a ácido acético (186 ml) para dar una suspensión. Añadir zinc (25,6 g, 391 mmol) y agitar la mezcla de reacción enérgicamente durante 18 horas. Diluir la mezcla con tolueno y filtrar a través de tierra de diatomeas. Concentrar el filtrado con presión reducida. Solubilizar el residuo con acetato de etilo, lavar con salmuera, y bicarbonato de sodio saturado. Separar las fases, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar con presión reducida para dar el compuesto del título (31,35 g, 99%). ES/MS *m/e* ($^{79}Br/^{81}Br$) 562/564 [M+H].

Preparación 18

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

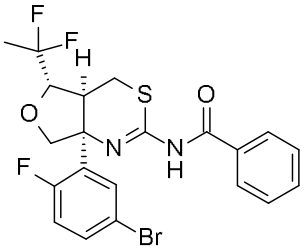


Esquema 1, etapa G: Disolver [(2S,3R,4S)-4-amino-4-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-(tritiloximetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol (31,35 g, 55,73 mmol) en diclorometano (557 ml) y enfriar hasta 5 °C. Añadir isotiocianato de benzoilo (9,74 ml, 72,45 mmol). Después de que se completa la adición, permitir que la mezcla de reacción se caliente hasta temperatura ambiente y agitar durante 2 horas. Verter en bicarbonato de sodio saturado, separar las fases, y extraer la fase acuosa con diclorometano. Combinar el extracto orgánico y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar la solución y concentrar

con presión reducida para dar el compuesto del título (42,95 g, 106%). ES/MS *m/e* ($^{79}Br/^{81}Br$) 747/749 [M+Na].

Preparación 19

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



Esquema 3, etapa H: Añadir 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 mmol) en diclorometano (20 ml) a temperatura ambiente durante 1 hora hasta que LCMS muestra que la reacción está completa. Evaporar la mezcla de reacción hasta un residuo al vacío. Añadir ciclohexano (50 ml), calentar hasta 60 °C y añadir metil *terc-butil éter* hasta que el precipitado se disuelve completamente (100 ml). Filtrar la solución caliente, enfriar hasta temperatura ambiente y lentamente evaporar con presión reducida hasta la formación de un precipitado blanco. Eliminar el disolvente con presión reducida y disolver el residuo en diclorometano anhidro (30 ml), añadir piridina (2,4 ml, 30 mmol), y enfriar la solución hasta -25 °C. Añadir anhídrido trifluorometanosulfónico (2,2 ml 13 mmol) en gotas durante 30 minutos y permitir calentar 0 °C durante 1 hora. Lavar la mezcla de reacción con agua (25 ml), ácido clorhídrico acuoso 2N (25 ml), agua (25 ml), bicarbonato de sodio saturado acuoso (25 ml), y agua (25 ml), secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar hasta sequedad. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 5% metil *terc-butil éter* en diclorometano para dar el compuesto del título como una espuma amarilla clara (5,0 g, 76%, 90 % de pureza por LCMS). ES/MS: m/z ($^{79}Br/^{81}Br$) 499,0/501,0 [M+H].

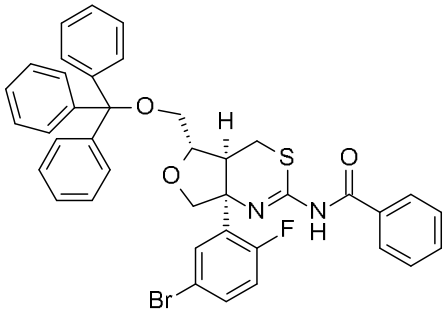
Preparación alternativa 19

Esquema 3, etapa H: Añadir isotiocianato de benzoilo (98 ml, 724,9 mmol,) a una solución de [(2S,3R,4S)-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(1,1-difluoroetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol (197,6 g, 546,7 mmol) en diclorometano (1,2 l) a 30 °C durante 1 hora. Añadir CDI (101 g, 610,4 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante 3 horas. Pueden realizarse cargas adicionales de CDI para asegurar el

consumo completo del compuesto intermedio de tiourea. Calentar hasta 90 °C durante 42 horas y enfriar la solución hasta temperatura ambiente. Diluir la mezcla de reacción con acetato de etilo (2 l) y añadir ácido clorhídrico acuoso 2N (2 l), agitar, añadir salmuera (1 l) y separar las capas. Lavar la capa orgánica con ácido clorhídrico acuoso 2N (0,5 l), salmuera (2 × 1 l) y bicarbonato de sodio saturado acuoso (1 l). Secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 0-100% acetato de etilo en iso-hexano para dar el compuesto del título como un sólido amarillo claro (234 g, 83%). ES/MS: m/z (^{79}Br/^{81}Br) 499,0/501,0 [M+H].

Preparación 20

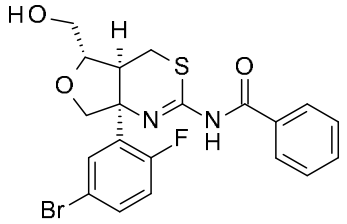
N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-5-(tritiloximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Esquema 1, etapa H: Disolver N-[[(3S,4R,5S)-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)-5-(tritiloximetil)tetrahidrofuran-3-il]carbamotioil]benzamida (42,95 g, 59,18 mmol) en diclorometano (591 ml) y enfriar hasta -20 °C. Añadir piridina (12,0 ml, 148,0 mmol), seguido por anhídrido de trifluorometanosulfónico (10,97 ml, 65,10 mmol). Monitorear la adición manteniendo la temperatura debajo de -20 °C. Agitar la mezcla de reacción a -20 °C durante 30 minutos. Permitir que la mezcla de reacción se caliente hasta temperatura ambiente. Verter en cloruro de amonio saturado, separar las fases, y extraer la fase acuosa con diclorometano. Combinar el extracto orgánico y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar la solución y concentrar con presión reducida para dar el compuesto del título (45,24 g, 108%). ES/MS *m/e* (^{79}Br/^{81}Br) 707/709 [M+H].

Preparación 21

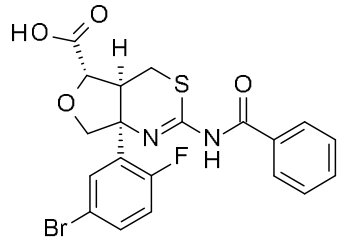
N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-5-(hidroximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Esquema 1, etapa I: Disolver N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-5-(tritiloximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (45,24, 63,93 mmol) en ácido fórmico (160 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 1 hora. Añadir agua (29 ml) durante un período de 5 minutos. Agitar durante 50 minutos. Concentrar la mezcla con presión reducida hasta un residuo. Disolver el residuo en metanol (639 ml), añadir trietilamina (26,7 ml, 191,8 mmol), y agitar durante toda la noche a temperatura ambiente. Verter en salmuera, separar las fases, y extraer la fase acuosa con cloroformo. Combinar el extracto orgánico y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetona: hexanos (25-38% de gradiente), para dar el compuesto del título (16,04 g, 54%). ES/MS *m/e* (^{79}Br/^{81}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]tiazina-5-carboxílico

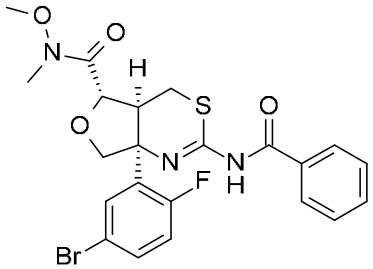


Esquema 1, etapa J: Añadir N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-5-(hidroximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (16,04 g, 34,47 mmol) a DMSO (172 ml). Añadir ácido 2-iodoxibenzoico (35,56 g, 120,70 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante 3 horas. Diluir la mezcla de reacción con cloroformo (300 ml) y verter en cloruro de amonio saturado (400 ml). Separar la fase orgánica y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar la solución y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Disolver el residuo en acetato de etilo (400 ml) y lavar con cloruro de amonio saturado (2×250 ml). Separar la fase orgánica, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar con presión reducida para dar un

residuo. Disolver el residuo en una mezcla de diclorometano: metanol y añadir éter dietílico hasta que precipite un sólido. Recolectar el sólido por filtración y secar con presión reducida para dar el compuesto del título (5,78 g, 35%). ES/MS *m/e* ($^{79}Br/^{81}Br$) 479/481 [M+H].

Preparación 23

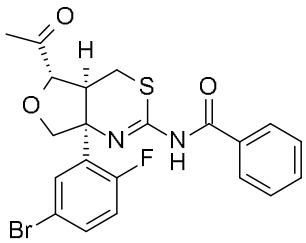
(4aS,5S,7aS)-2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-N-metoxi-N-metil-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazina-5-carboxamida



Esquema 1, etapa K: Disolver ácido (4aS,5S,7aS)-2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazina-5-carboxílico (5,78 g, 12,1 mmol) en diclorometano (201 ml) y hidrocloruro de N,O-dimetilhidroxilamina (1,76 g, 18,1 mmol). Añadir trietilamina (5,29 ml, 36,2 mmol) seguido por HATU (7,02 g, 18,1 mmol). Agitar a temperatura ambiente durante 3 días. Verter en cloruro de amonio saturado, separar las fases, y extraer la fase acuosa con acetato de etilo. Combinar los extractos orgánicos y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo:diclorometano (0-50% de gradiente) para dar el compuesto del título (4,15 g, 66%). ES/MS *m/e* ($^{79}Br/^{81}Br$) 522/524 [M+H].

Preparación 24

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

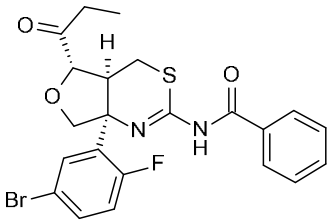


Esquema 1, etapa L: Añadir en gotas a una solución -78 °C de (4aS,5S,7aS)-2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-N-metoxi-N-metil-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazina-5-carboxamida (1,51 g, 2,89 mmol) en THF (57,8 ml) bromuro de

metilmagnesio (3,0 mol/L en éter dietílico, 4,8 ml, 14,5 mmol). Agitar la reacción a -78 °C durante 5 minutos y permitir calentar gradualmente hasta temperatura ambiente. Agitar durante 30 minutos. Desactivar la reacción con metanol (4 ml), diluir con cloruro de amonio saturado, y extraer con acetato de etilo. Combinar el extracto orgánico y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo: hexanos (0-100% de gradiente) para dar el compuesto del título (1,28 g, 93%). ES/MS *m/e* ($^{79}Br/^{81}Br$) 477/479 [M+Na].

Preparación 24b

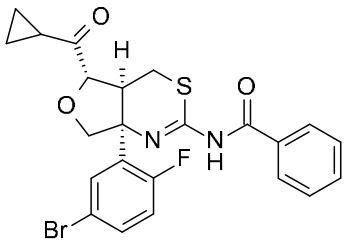
N-[(5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-5-propanoil-4a,5,7,7A-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Esquema 1, etapa L: Añadir (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]tiazina-5-carboxamida (3,00 g, 5,74 mmol) a THF (115 ml) bajo nitrógeno y enfriar hasta -78 °C. Añadir una solución de bromuro de etilmagnesio (1,0 mol/L) en THF (28,7 ml, 28,7 mmol) a la reacción en gotas, manteniendo la temperatura a -78 °C. Después de 1 hora, añadir metanol (10 ml) en una porción y después verter en solución saturada de cloruro de amonio. Extraer la mezcla con acetato de etilo, secar los extractos orgánicos sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar al vacío para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con hexanos/acetato de etilo (100-40% de gradiente) para dar el compuesto del título (2,844 g, 5,788 mmol, 100%). ES/MS m/z ($^{79}Br/^{81}Br$) 491/493/513/515 (M+H/Na).

Preparación 24c

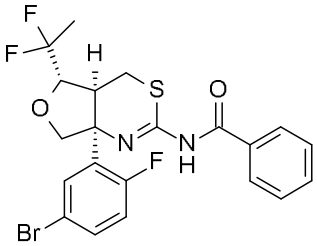
N-[(5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-5-(ciclopropilcarbonil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Esquema 1, etapa L: Añadir en gotas a una solución -78 °C de (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]tiazina-5-carboxamida (1,51 g, 2,89 mmol) en THF (51,2 ml) bromuro de ciclopropilmagnesio (1,0 mol/L in 2-metiltetrahidrofurano, 14 ml, 14,4 mmol). Agitar la reacción a -78 °C durante 5 minutos y permitir calentar gradualmente hasta temperatura ambiente. Agitar durante 30 minutos. Desactivar la reacción con metanol (4 ml), diluir con cloruro de amonio saturado, y extraer con acetato de etilo. Combinar el extracto orgánico y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo: hexanos (0-100% de gradiente) para dar el compuesto del título (1,299 g, 89%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 503/505 [M+H].

Preparación 25

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

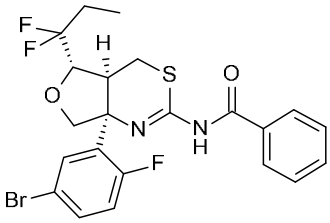


Esquema 1, etapa M: Añadir juntos diclorometano (34 ml), Deoxo-Fluor® (1,52 ml, 6,88 mmol), y dietílicolato de éter trifluoruro de boro (0,89 ml, 6,88 mmol). Agitar a temperatura ambiente durante 2 horas. Añadir N-[(4aS,5S,7aS)-5-acetil-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0,821 g, 1,72 mmol) en una porción, seguido por trietilamina trihidrofluoruro (1,13 ml, 6,88 mmol). Agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Verter en cloruro de amonio saturado, separar las fases, y extraer la fase acuosa con acetato de etilo. Combinar el extracto orgánico y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice,

eluyendo con diclorometano: hexanos (80-100 % de gradiente), para dar el compuesto del título (0,552 g, 64%). ES/MS *m/e* ($^{79}Br/^{81}Br$) 499/501 [M+H].

Preparación 25b

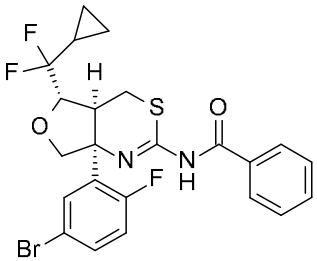
N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-5-(1,1-difluoropropil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Esquema 1, etapa M: Añadir N-[(5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-5-propanoil-4a,5,7,7A-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0,486 g, 0,989 mmol) a diclorometano (19,8 ml) bajo nitrógeno a -78 °C, seguido por Deoxo-Fluor® (1,75 g, 1,75 ml, 3,96 mmol). Agitar durante 30 minutos a -78 °C y después calentar hasta temperatura ambiente durante toda la noche. Verter la reacción en solución saturada de bicarbonato de sodio y extraer con diclorometano. Separar las fases orgánicas utilizando una frita hidrofóbica y concentrar in vacuo para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con hexanos/acetato de etilo (100-50% de gradiente) para dar el compuesto del título crudo con una impureza (0,230 g, 0,448 mmol, 45%) que se utiliza sin purificación adicional. ES/MS m/z 513/515 (M+H).

Preparación 25c

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

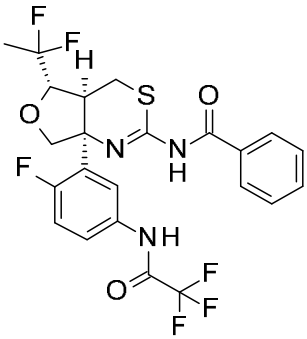


Esquema 1, etapa M: Añadir Deoxo-Fluor® (1,9 ml, 6,68 mmol) a una solución ambiente de N-[(5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-5-(ciclopropilcarbonil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0,812 g, 1,61 mmol) en diclorometano (24 ml). Agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Verter en

bicarbonato de sodio saturado y extraer la fase acuosa con acetato de etilo (3×). Combinar los extractos orgánicos y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo: hexanos (5-100 % de gradiente), para dar el compuesto del título (41 mg, 5%). ES/MS m/z ($^{79}Br/^{81}Br$) 525/527 [M+H].

Preparación 26

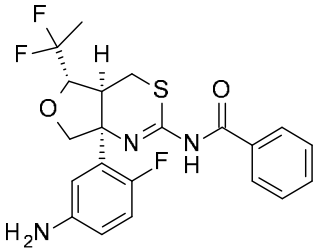
N-[(5S,7aS)-5-(1,1-Difluoroetil)-7a-{2-fluoro-5-[(trifluoroacetil)amino]fenil}-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Esquema 4, etapa A: Disolver 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 añadir tamices moleculares 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 potasio (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) en un flujo de nitrógeno. Purgar el recipiente con 3 cambios de nitrógeno al vacío y calentar hasta 123 °C durante 18 horas. Enfriar hasta temperatura ambiente y filtrar la solución a través de tierra de diatomeas, y lavar con acetato de etilo. Añadir cloruro de amonio acuoso saturado (2 l) y agitar enérgicamente durante 45 minutos. Separar las capas y lavar la capa orgánica con cloruro de amonio acuoso saturado (3 × 1 l), salmuera (300 ml), secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y evaporar para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 0-100% acetato de etilo en iso-hexano para dar 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



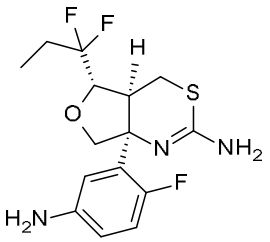
Esquema 1, etapa N: Combinar N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0,372 g, 0,74 mmol) y (1R,2R)-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexanodiamina (0,037 ml, 0,22 mmol) en etanol (30 ml). Añadir acida sódica (0,194 g, 2,98 mmol), seguido por L-ascorbato de sodio (solución 0,66 M, 0,50 ml, 0,33 mmol). Purgar la parte superior del matraz con nitrógeno y añadir sulfato cúprico (solución 0,33 M, 0,68 ml, 0,22 mmol). Calentar la mezcla de reacción hasta 80 °C y agitar durante 5 horas. Enfriar la reacción y añadir agua fría. Extraer la mezcla con acetato de etilo. Combinar el extracto orgánico y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Combinar el residuo con paladio (10 % en masa sobre carbón, 0,35 g, 0,16 mmol) en etanol (50 ml) y THF (10 ml). Purgar la mezcla con nitrógeno y con hidrógeno. Agitar a temperatura ambiente bajo 50 psi de hidrógeno durante 1 hora. Filtrar el catalizador y lavar con acetato de etilo. Concentrar la solución con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo: diclorometano (0-20% de gradiente), para dar el compuesto del título (0,2184 g, 67%). ES/MS m/z 436 (M+H).

Preparación alternativa 27

Esquema 4, etapa B: Añadir amoníaco 7 N en metanol (600 ml, 4,2 mol) a una suspensión agitada de 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 agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Evaporar hasta sequedad para dar 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 27b

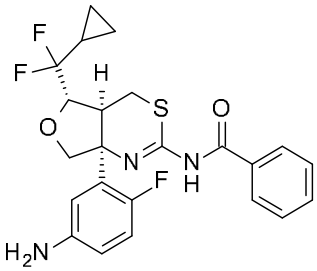
(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(1,1-difluoropropil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina



Esquema 1, etapa N: Añadir juntos N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-5-(1,1-difluoropropil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (0,567 g, 1,104 mmol), 1,4-dioxano (4,802 ml) y etanol (11,04 ml), seguido por azida sódica (0,2154 g, 3,313 mmol), trans-N,N'-dimetilciclohexano-1,2-diamina (0,04760 g, 0,0528 ml, 0,3313 mmol), L-ascorbato de sodio 0,66 M (0,74 g, 0,74 ml, 0,4859 mmol) y agua (0,1699 ml). Finalmente añadir sulfato cúprico 0,33 M (0,74 g, 0,74 ml, 0,2430 mmol) y calentar hasta 100 °C. Agitar durante toda la noche a 90 °C. Añadir sulfato cúprico 0,33 M (0,74 g, 0,74 ml, 0,2430 mmol), L-ascorbato de sodio 0,66 M (0,74 g, 0,74 ml, 0,4859 mmol), azida sódica (0,2154 g, 3,313 mmol) y trans-N,N'-dimetilciclohexano-1,2-diamina (0,04760 g, 0,0528 ml, 0,3313 mmol). Calentar la reacción a 100 °C durante 1 hora, y después enfriar hasta temperatura ambiente. Verter la reacción en salmuera y extraer el producto con cloroformo. Filtrar la mezcla a través de tierra de diatomeas y separar las fases orgánicas, secar sobre sulfato de magnesio, filtrar, y concentrar al vacío. Transferir el material a un matraz Parr con paladio (5 % en masa) en catalizador de Lindlar (0,113 g, 0,0533 mmol), y añadir metanol (55,22 ml) bajo nitrógeno. Hidrogenar bajo presión de hidrógeno de 276 kPa con agitación enérgica durante 3 horas. Añadir paladio adicional (5 % en masa) en catalizador de Lindlar (0,113 g, 0,0533 mmol) e hidrogenar bajo presión de hidrógeno de 345 kPa durante 4 horas adicionales. Filtrar la reacción a través de tierra de diatomeas, y lavar con cloroformo. Concentrar el filtrado al vacío y después añadir metanol (55,22 ml) seguido por hidróxido de litio hidratado (0,4634 g, 0,182 ml, 11,04 mmol). Calentar la mezcla de reacción hasta 70 °C durante 3 horas y después enfriar hasta temperatura ambiente. Verter la reacción en salmuera y extraer con cloroformo. Diluir las fases orgánicas con metanol, y verter en un cartucho SCX-2. Enjuagar el cartucho con un volumen de columna de metanol y descartar. Después enjuagar el cartucho SCX-2 con un volumen de columna de amoníaco metanólico 7 M y concentrar al vacío para dar el compuesto del título (0,290 g, 0,840 mmol, 76%). ES/MS m/z 346 (M+H).

Preparación 27c

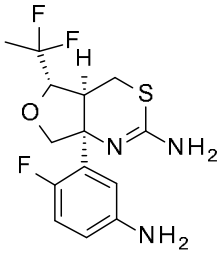
N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-5-[ciclopropil(difluoro)metil]-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Esquema 1, etapa N: Combinar N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-5-[ciclopropil(difluoro)metil]-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (31 mg, 0,059 mmol) y (1R,2R)-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexanodiamina (0,0049 ml, 0,030 mmol) en etanol (3 ml). Añadir azida sódica (31 mg, 0,47 mmol), seguido por L-ascorbato de sodio (solución 0,66 M, 0,089ml, 0,059 mmol). Purgar la parte superior del matraz con nitrógeno y añadir sulfato cúprico (solución 0,33 M, 0,18 ml, 0,059 mmol). Calentar la mezcla de reacción hasta 80 °C y agitar durante 3 horas. Enfriar la reacción y añadir agua fría. Extraer la mezcla con acetato de etilo. Combinar el extracto orgánico y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Combinar el residuo con paladio (10 % en masa sobre carbono, 30 mg, 0,014 mmol) en etanol (20 ml) y THF (5 ml). Purgar la mezcla con nitrógeno y con hidrógeno. Agitar a temperatura ambiente bajo hidrógeno a 40 psi durante 4 horas. Filtrar el catalizador y lavar con acetato de etilo. Concentrar la solución con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo: hexanos (0-100% de gradiente), para dar el compuesto del título (21 mg, 77%). ES/MS m/z 462 (M+H).

Preparación 28

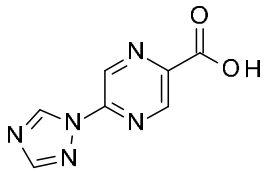
(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina



Esquema 4, etapa B: Disolver 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). Añadir O-metilhidrocloruro de hidroxilamina (190 g, 2275,0 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Diluir con 2-metiltetrahidrofurano (1 l) y lavar con agua (2 × 300 ml). Aislar la capa orgánica y añadir hidróxido de amonio acuoso al 35% (100 ml) a la fase acuosa. Extraer con 2-metiltetrahidrofurano (300 ml) después saturar con cloruro de sodio y extraer con 2-metiltetrahidrofurano (2 × 300 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con salmuera (300 ml) y evaporar hasta un residuo. Disolver en metanol (200 ml), añadir amoníaco 7 N en metanol (100 ml, 700 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Puede añadirse amoníaco adicional si permanece cualquier impureza de trifluoracetamida. Eliminar el disolvente con presión reducida y disolver el residuo en ácido clorhídrico acuoso 2N (1,5 l). Extraer con diclorometano (6 × 500 ml), combinar las capas orgánicas y eliminar el disolvente con presión reducida hasta un volumen total de aproximadamente 1 L. Lavar con ácido clorhídrico acuoso 2N (300 ml) y combinar todos los lavados acuosos. Añadir 2-metiltetrahidrofurano (1 l) y agitar enérgicamente mientras se ajusta el pH a básico con bicarbonato de sodio hasta que no se observa ningún desprendimiento de gas. Separar las capas y extraer la fase acuosa con 2-metiltetrahidrofurano (2 × 500 ml). Secar los extractos orgánicos combinados con sulfato de magnesio, filtrar, y evaporar para dar un sólido marrón. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 0-100% diclorometano en THF. Evaporar el producto que contiene fracciones con acetato de etilo/heptano para dar el compuesto del título como un polvo fino de color beige (106 g, 70%, 95% de pureza). ES/MS: m/z 332,0 [M+H], $[\square]_D^{20}$ = +42,11 ° (C= 0,532, cloroformo).

Preparación 29

Ácido 5-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxílico

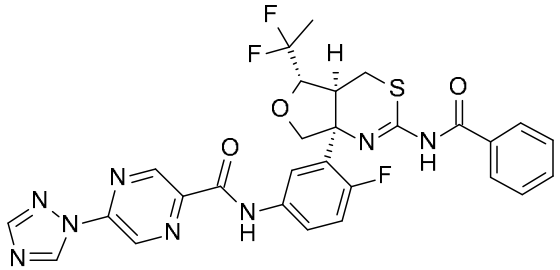


Agitar una mezcla de 5-cloropirazina-2-carboxilato de metilo (124 g, 718,55 mmol), 1H-1,2,4-triazol (198,5 g, 2874,2 mmol) y carbonato de potasio (297,92 g, 2155,6 mmol) en N,N-dimetilformamida (1 l) a 100 °C durante 15 horas. Enfriar hasta temperatura ambiente y verter en agua (2 l). Ajustar el pH de la solución hasta 2-3

utilizando ácido clorhídrico acuosos concentrado (aproximadamente 500 ml) y agitar durante 30 minutos. Recolectar el sólido resultante por filtración y lavar con agua. Añadir agua (500 ml) y etanol (500 ml), calentar hasta 50-60 °C durante 4 horas, y enfriar hasta temperatura ambiente. Recolectar los sólidos por filtración y secar al vacío at 40 °C para dar el compuesto del título como un sólido blanco. ES/MS: m/z 190,0 (M-H).

Preparación 30

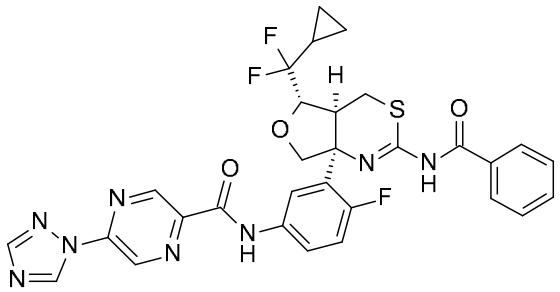
N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-benzamido-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida



Esquema 3, etapa A: Añadir juntos 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 (0,139 g, 0,32 mmol), ácido 5-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxílico (0,0852 g, 0,45 mmol), y HOAt (0,0575 g, 0,41 mmol) en diclorometano (4 ml): dimetilformamida (1 ml). Añadir N,N-diisopropiletilamina (0,11 ml, 0,63 mmol) a la solución seguido por EDCI (0,079 g, 0,41 mmol) en una porción. Agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. Diluir la solución con acetato de etilo, lavar con agua y salmuera, y separar las fases. Extraer con acetato de etilo. Combinar el extracto orgánico y secar sobre sulfato de magnesio. Filtrar la solución y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo: diclorometano (0-30% de gradiente), para dar el compuesto del título (0,1140 g, 59%). ES/MS m/z 609 (M+H).

Preparación 30a

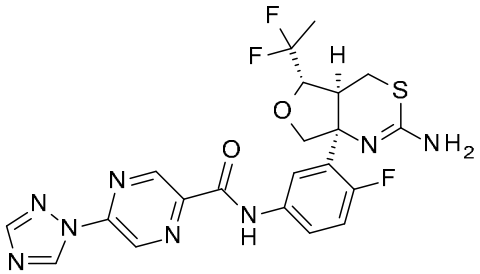
N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-benzamido-5-[ciclopropil(difluoro)metil]-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida



Esquema 3, etapa A: Añadir juntos N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-5-[ciclopropil(difluoro)metil]-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (21 mg, 0,045 mmol), ácido 5-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxílico (10 mg, 0,054 mmol), y HOBT (10 mg, 0,059 mmol) en diclorometano (2,5 ml): dimetilformamida (0,5 ml). Añadir N,N-diisopropiletilamina (0,016 ml, 0,091 mmol) a la solución seguido por EDCI (11 mg, 0,059 mmol) en una porción. Agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. Diluir la solución con acetato de etilo, agua, y 1 N NaOH (0,5 ml) y extraer con acetato de etilo (3×). Combinar los extractos orgánicos y secar sobre sulfato de sodio. Filtrar la solución y concentrar con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo: diclorometano (0-100% de gradiente), para dar el compuesto del título (20 mg, 69%). ES/MS m/z 635 (M+H).

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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida



Esquema 3, etapa B: Calentar 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida (0,1148 g, 0,189 mmol), hidrocloruro de O-metilhidroxilamina (0,1575 g, 1,886 mmol), y piridina (0,15 ml, 1,886 mmol) en THF (2 ml) y etanol (2 ml) a 45 °C durante 5 horas. Enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y agitar durante 2 días. Concentrar la solución con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice,

eluyendo con 7 N NH_3 in metanol: diclorometano (0-3% de gradiente), para dar el compuesto del título (0,086 g, 90%). ES/MS m/z 505 (M+H).

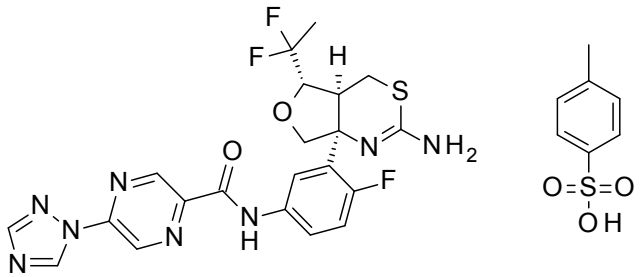
Ejemplo de Preparación Alternativa 1

Esquema 4 Etapa D: Agitar (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 (96,5 g, 291 mmol) en acetato de etilo (1 l) bajo una atmósfera de nitrógeno a 50 °C y añadir ácido 5-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxílico (84 g, 439,45 mmol) lentamente a la solución caliente. Agitar durante 10 minutos y añadir T3P® (1,67 M en acetato de etilo, 350 ml, 585 mmol) y agitar a 50 °C durante 17 horas. Enfriar hasta temperatura ambiente, diluir con diclorometano (1 l) y agitar mientras se desactiva con una solución de carbonato de sodio en agua (128 g, 1,21 mol en 1 l). Diluir con diclorometano (1 l) y agua (2 l) y agitar enérgicamente durante 1 hora. Filtrar a través de tierra de diatomeas y lavar con diclorometano (3 × 500 ml), metanol (500 ml), agua (500 ml), bicarbonato de sodio saturado acuoso (500 ml), y 1:1 metanol:diclorometano (6 × 500 ml). Separar las capas y extraer la fase acuosa con diclorometano (3 × 1 l). Combinar todas las fases orgánicas y evaporar para dar un residuo. Someter a sonicación el residuo en diclorometano (1 l) durante 15 minutos y recolectar los sólidos por filtración lavando con diclorometano (5 × 200 ml). Añadir carbonato hidrógeno de sodio acuoso saturado hasta que se obtenga pH 8 y agitar enérgicamente con diclorometano (1 l) y metanol (500 ml). Eliminar los sólidos por filtración y extraer el filtrado con diclorometano (2 × 500 ml). Disolver los sólidos con diclorometano:metanol (1:1, 500 ml) y combinar esta solución con las otras fases orgánicas. Eliminar el disolvente con presión reducida añadiendo diclorometano para mantener una solución y después una vez que se obtiene un volumen final de aproximadamente 300 ml, purificar la solución por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con 5% de amoníaco/metanol 0,3 M en diclorometano para dar un sólido marrón claro. Disolver el sólido en etanol caliente (2,5 l), filtrar mientras está caliente, y enfriar hasta temperatura ambiente durante 1 hora. Recolectar los sólidos por filtración y lavar con etanol (2 × 250 ml) y secar al vacío. Evaporar el filtrado hasta sequedad y además purificar por cromatografía en gel de sílice eluyendo primero con 65% acetato de etilo en 50:1 iso-hexano/ amoníaco 7 N en metanol después 50:1 acetato de etilo/ amoníaco 7 N en metanol. Si se requiere, puede completarse purificación adicional por SFC, columna: Chiralpak AD-H (5 μ), 50 × 250 mm; eluente: 35% isopropanol (0,2% dietilmetilamina) en CO_2; tasa de flujo: 300 g/minuto at UV 220 nm. Después de la evaporación y secado al vacío, suspender el material en etanol (1,5 l) y agitar con calentamiento suave entre (36 y 45 °C) durante

20 minutos. Recolectar el sólido por filtración lavando con etanol (100 ml). Puede recuperarse material adicional a partir del filtrado; evaporar hasta sequedad, someter a reflujo en etanol, eliminar los sólidos por filtración caliente y después enfriar el filtrado hasta temperatura ambiente. Recolectar los sólidos por filtración, lavando con etanol y combinar con el material obtenido a partir de la filtración anterior. Secar los sólidos combinados al vacío a 40 °C para dar el compuesto del título como un sólido blanco (103,3 g, 68%, que contiene 2,5 % en peso de etanol). ES/MS m/z 505,0 (M+H), $[\square]_D^{20}$ = +149,4 ° (C= 1, cloroformo).

Ejemplo 1A

4-metilbencenosulfonato 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida



Disolver 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida (600 mg, 1,189 mmol) en acetona (9 ml) y agua (1 ml). Calentar la suspensión resultante hasta 60 °C. Añadir ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (420 mg, 2,208 mmol) disuelto en acetona (1 ml). Agitar la mezcla durante toda la noche a 60 °C. Enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente, filtrar los sólidos por vacío y lavar con acetona (1 ml) y secar con aire durante toda la noche para dar el compuesto del título (743 mg, 73%).

Difracción de rayos X en polvo (XRD)

Los patrones de difracción de rayos X de los sólidos cristalinos se obtuvieron en un difractómetro de rayos X en polvo Endeavor Bruker D4, equipado con una fuente de CuK λ = 1,54060 Å y un detector de Vantec, operando a 35 kV y 50 mA. La muestra se escaneó entre 4 y 40 ° en 2θ, con un tamaño de etapa de 0,009 ° en 2θ, una velocidad de barrido de 0,5 segundos / etapa, con 0,6 mm de divergencia, anti-dispersión fija de 5,28, y ranuras de detector de 9,5 mm. El polvo seco es empaquetado en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa utilizando un portaobjetos de vidrio. Los patrones de difracción de forma cristalina se

recogen a temperatura ambiente y humedad relativa. Es bien conocido en la técnica de cristalográfica que, para cualquier forma cristalina dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida resultante de factores tal como hábito y morfología cristalina. Cuando los efectos de orientación preferida están presentes, las intensidades de pico se alteran, pero las posiciones pico características del polimorfo se mantienen sin cambios. Véase por ejemplo, The United States Pharmacopeia #23, Formulario Nacional #18, páginas 1843-1844, 1995. Además, también es bien conocida en la técnica de cristalográfica que para cualquier forma cristalina dada las posiciones pico angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones pico pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o humedad a la que se analiza una muestra, desplazamiento de muestra, o presencia o ausencia de un patrón interno. En el presente caso, una variabilidad de la posición del pico de ± 0,2 en 2θ tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin impedir la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina puede hacerse en base a cualquier combinación única de picos distinguibles (en unidades de ° 2θ), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de forma cristalina, recogidos a humedad relativa, y temperatura ambiente, se ajustaron en base a Picos estándar NIST 675 en 8,853 y 26,774 grados 2-theta.

Una muestra preparada de 4-metilbencenosulfonato 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida cristalina se caracteriza por un patrón de XRD utilizando radiación de CuKa como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla a continuación. Específicamente, el patrón contiene un pico a 17,3° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 14,8, 12,7, y 4,9; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

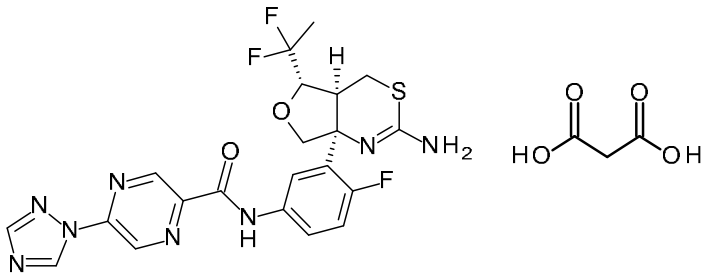
Tabla 1: Picos de difracción de rayos X en polvo del Ejemplo 1A.

Pico	Ángulo (°2-Theta +/- 0,2°)	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	4,9	48
2	9,4	14
3	12,7	52
4	14,8	60
5	17,3	100
6	19,8	44

7	24,9	35
8	25,3	37
9	26,8	19
10	28,2	14

Ejemplo 1B

Malonato 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida



Añadir juntos 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida (201 mg, 0,398 mmol) y ácido malónico (104 mg, 0,999 mmol) en 95% etanol-agua (15 ml). Agitar la mezcla 65 °C hasta que se obtenga una solución transparente. Un sólido blanco espeso precipita después de unos pocos minutos. Agitar la suspensión durante 1 hora a 55 °C y después enfriar hasta temperatura ambiente con agitación. Filtrar los sólidos al vacío y secar con aire durante 2 días para dar el compuesto del título (477 mg, 80%).

Una muestra preparada de malonato 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida cristalina se caracteriza por un patrón de XRD utilizando radiación de CuKa como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla a continuación. Específicamente, el patrón contiene un pico a 22,7 en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 16,8, 17,2, y 24,0; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

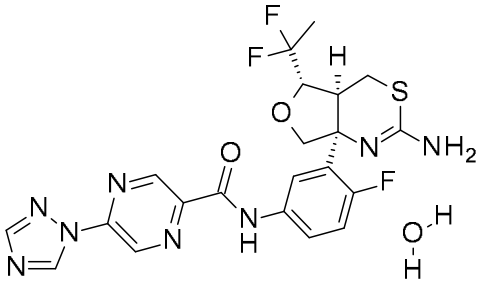
Tabla 2: Picos de difracción de rayos X en polvo del Ejemplo 1B.

Pico	Ángulo (°2-Theta +/- 0,2°)	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	5,5	39
2	10,3	44

3	11,8	55
4	15,3	39
5	16,8	62
6	17,2	57
7	18,3	41
8	22,4	60
9	22,7	100
10	24,0	53

Ejemplo 1C

Hidrato 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida



Suspender 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida (116 mg, 0,23mmol) en 1:1 THF:agua (2 ml) a 70 °C. Agitar la solución durante al menos 2 días, filtrar el sólido, y secar en un flujo de nitrógeno para dar el compuesto del título.

Una muestra preparada 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida hidratada se caracteriza por un patrón XRD utilizando radiación de CuKa como que tiene picos de difracción (valores 2-theta como se describe en la Tabla 3 a continuación. Específicamente, el patrón contiene un pico en 13,0 en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 7,8, 10,5, 11,0, 14,9, 19,7, 21,3, y 26,9 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

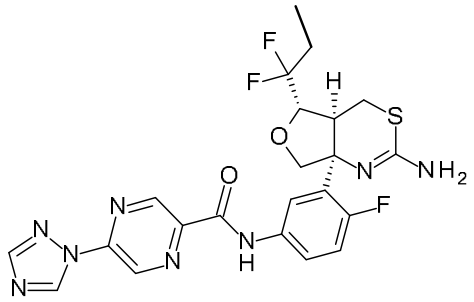
Tabla 3. Picos de difracción de rayos X en polvo del Ejemplo 1C.

Pico	Ángulo (°2-Theta +/- 0,2°)	Intensidad relativa (% del pico más intenso)

1	7,8	82
2	10,5	68
3	11,0	38
4	13,0	100
5	13,2	48
6	14,9	44
7	16,6	30
8	19,1	32
9	19,7	93
10	21,1	29
11	21,3	73
12	22,0	26
13	22,3	52
14	26,9	65

Ejemplo 2

N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoropropil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida

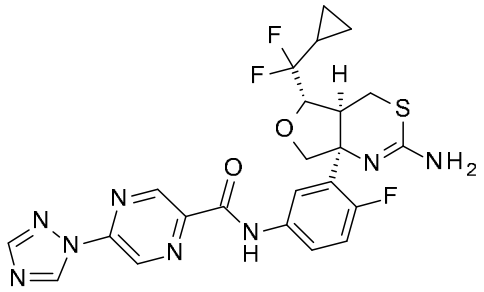


Esquema 3, etapas A y B: Añadir juntos ácido 5-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxílico (0,116 g, 0,608 mmol), acetonitrilo (4,05 ml), dimetilformamida (0,00314 ml), y después cloruro de oxalilo (0,154 g, 0,105 ml, 1,22 mmol) en gotas bajo nitrógeno. Agitar la reacción durante 30 minutos y después concentrar al vacío. Disolver el residuo en acetonitrilo (4,05 ml,) y añadir en gotas a una mezcla de (4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(1,1-difluoropropil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (0,140 g, 0,405 mmol) en etanol (4,05 ml) y agua (1,35 ml) con agitación. Al completar la adición, diluir la reacción con cloroformo y lavar con solución saturada de bicarbonato de sodio. Diluir las fases orgánicas con metanol y añadir a un cartucho SCX-2. Enjuagar el cartucho SCX-2 e con un volumen de

columna de metanol y descartar, y después enjuagar el cartucho SCX-2 con un volumen de columna de amoníaco metanólico 7 M. Concentrar el amoníaco metanólico, enjuagar al vacío y purificar por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con diclorometano/metanol (100-85% de gradiente) para dar un residuo. Purificar además por SFC quiral (Cromatografía de fluido supercrítica) (Columna: bencenosulfonamida (BzS) (5 µ), Cromatografía de Princeton, 21,2 × 250 mm; eluente: 22% metanol (1% de amoníaco 2 M en metanol) en CO_2; tasa de flujo: 70 ml/minuto a UV 250 nm; retropresión: 100 bares; temperatura: 40 °C). Solubilizar el residuo en cloroformo y lavar con salmuera. Pasar las fases orgánicas a través de una frita hidrofóbica y concentrar al vacío para dar el compuesto del título (0,0658 g, 0,127 mmol, 31%). ES/MS m/z 519 (M+H).

Ejemplo 3

N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-[ciclopropil(difluoro)metil]-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida



Esquema 3, etapa B: Calentar una mezcla de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-benzamido-5-[ciclopropil(difluoro)metil]-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida (20 mg, 0,0315 mmol), O-metilhidrocloruro de hidroxilamina (26 mg, 0,315 mmol), y piridina (0,026 ml, 0,315 mmol) en etanol (3 ml) a 55 °C durante 18 horas. Enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y concentrar la solución con presión reducida para dar un residuo. Purificar el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con 7 N NH_3 en metanol: diclorometano (0,5-10% de gradiente), para dar el compuesto del título (15 mg, 90%). ES/MS m/z 531 (M+H).

Procedimientos de ensayo in vitro:

Para evaluar la selectividad de BACE1 respecto de BACE2, se evalúa el compuesto de prueba en ensayos enzimáticos basados en FRET utilizando sustratos específicos para BACE1 y BACE2 como se describe a continuación. Para los ensayos celulares y enzimáticos in vitro, el compuesto de ensayo se prepara en DMSO para

formar una solución madre 10 mM. La solución madre se diluye en serie en DMSO para obtener una curva de dilución de diez puntos con concentraciones de compuesto finales que van desde 10 mM a 0,05 nM en una placa de 96 pocillos de fondo redondo antes de realizar los ensayos de células completas y enzimáticos in vitro.

Ensayos de inhibición de proteasa In vitro:

Expresión de *hu*BACE1:Fc y *hu*BACE2:Fc.

BACE1 humana (número de acceso: AF190725) y BACE2 humana (número de acceso: AF 204944) se clonaron a partir de ADNc de cerebro total por RT-PCR. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos # 1 a 460 se insertan en el ADNc que codifica el polipéptido (Fc) IgG1 humano (Vassar et al., *Science*, **286**, 735-742 (1999)). Esta proteína de fusión de BACE1 (1-460) o BACE2 (1-460) y Fc humano, llamada *hu*BACE1:Fc y *hu*BACE2:Fc respectivamente, se construyen en el vector pJB02. BACE1(1-460):Fc (*hu*BACE1:Fc) humana y BACE2(1-460):Fc (*hu*BACE2:Fc) humana se expresan de forma transitoria en células HEK293. 250 gμ de ANDc de cada construcción se mezclan con Fugene 6 y se añaden a 1 litro células HEK293. Cuatro días después de la transfección, el medio acondicionado se cosecha para la purificación. *hu*BACE1:Fc y *hu*BACE2:Fc a se purificaron mediante cromatografía de Proteína A como se describe a continuación. Las enzimas se almacenan a - 80 ° C en pequeñas alícuotas. (Véase Yang, *et. al.*, *J. Neurochemistry*, **91**(6) 1249-59 (2004).

Purificación de *hu*BACE1:Fc y *hu*BACE2:Fc.

Se recoge el medio acondicionado de células HEK293 transfectadas transitoriamente con ADNc de *hu*BACE1:Fc o *hu*BACE2:Fc. Los restos celulares se eliminan por filtración de los medios acondicionados a través de 0,22 μm de filtro estéril. 5 ml de Proteína A-agarosa (volumen de lecho) se añade a 4 litros de medio acondicionado. Esta mezcla se agita suavemente durante toda la noche a 4 ° C. La resina de Proteína A-agarosa se recoge y empaqueta en una columna de cromatografía de baja presión. La columna se lava con 20 × volúmenes de lecho de PBS a una tasa de flujo de 20 ml por hora. Al proteína *hu*BACE1:Fc o *hu*BACE2:Fc unida se eluye con ácido acético 50 mM, pH 3,6, a tasa de flujo de 20 ml por hora. Fracciones de 1 ml de eluyente se neutralizaron inmediatamente con 0,5 ml de acetato de amonio 200 mM, pH 6,5. La pureza del producto final se evalúa mediante electroforesis en 4-20% de Tris-glicina SDS-PAGE. La enzima se almacena a -80 ° C en pequeñas alícuotas.

Ensayo FRET de BACE1

Las diluciones en serie del compuesto de ensayo se preparan como se describe más arriba. El compuesto se diluye adicionalmente 20 × en tampón KH2PO4. Diez µl de cada dilución se añade a cada pocillo en la fila A a H de una placa negra de unión de proteína baja correspondiente que contiene la mezcla de reacción (25 µl de 50 mM de KH_2PO_4, pH 4,6, 1 mM TRITON® X-100, 1 mg/ml de BSA, y 15 µM de sustrato de FRET en base de la secuencia de APP) (véase Yang, *et. al.*, *J. Neurochemistry*, **91**(6) 1249-59 (2004)). El contenido se mezcla bien en un agitador de placas durante 10 minutes. Quince µl de BACE1(1-460):Fc humana doscientos pM (Véase Vasser, et al, Science, 286, 735-741 (1999)) en el tampón de KH_2PO_4 se añade a la placa que contiene sustrato y el compuesto de ensayo para iniciar la reacción. La RFU de la mezcla en el tiempo 0 se registra a 355 nm de longitud de onda de excitación y longitud de onda de emisión de 460 nm, después de un breve mezclado en un agitador de placas. La placa de reacción se cubre con papel de aluminio y se mantiene en un horno humidificado oscuro a temperatura ambiente durante 16 a 24 horas. El RFU al final de la incubación se registra con la misma configuración de emisión y excitación utilizada en el tiempo 0. La diferencia del RFU en el tiempo 0 y el final de incubación es representativa de la actividad de BACE1 bajo tratamiento con el compuesto. Las diferencias de RFU se representan gráficamente frente a la concentración de inhibidor y se ajusta una curva con una ecuación lógica de cuatro parámetros para obtener el valor de IC_{50}. (May, *et al*., *Journal of Neuroscience*, 31, 16507-16516 (2011)).

El compuesto del Ejemplo 1 este documento se prueba esencialmente como se ha descrito anteriormente y exhibe un IC_{50} para BACE1 de 1,19 nM + 0,48, n = 4 (media + SEM; SEM = error estándar de la media). Estos datos demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la actividad in vitro de la enzima BACE1 recombinante purificada.

Ensayo FRET de BACE2 TMEM27

La proteína transmembrana 27 (TMEM27) (Número de Acceso NM_020665), también conocida como collectrina) es un sustrato recientemente descrito para BACE2, pero no BACE1 (Esterhazy*, et al, Cell Metabolism*, **14**, 365-377 (2011)). Para evaluar el compuesto de ensayo en cuanto a la inhibición de la actividad enzimática BACE2, un péptido FRET (DABCYL-QTL FLIPS-LucY) en base a la secuencia de aminoácidos de TMEM27 humana se utiliza como un sustrato (Esterhazy*, et al, Cell Metabolism*, **14**, 365-377 (2011)). Las diluciones en serie del compuesto de ensayo se preparan como se describe más arriba. El compuesto se diluye adicionalmente 20 × en

tampón de KH_2PO_4. Diez µl de cada dilución se añade a cada pocillo en la fila A a H de una placa negra de unión de proteína baja correspondiente que contiene la mezcla de reacción (25 µl de KH_2PO_4 50 mM, pH 4,6, 1 mM de TRITON X-100, 1 mg / ml de BSA, y 5 µM de sustrato TMEM FRET). Quince µl de BACE2 humana veinte µM (1 a 460): Fc (Véase Vasser, *et al*., *Science*, **286**, 735-741 (1999)) en tampón KH_2PO_4 después se añade a la placa que contiene sustrato y el compuesto de ensayo para iniciar la reacción. El contenido se mezcla bien en un agitador de placas durante 10 minutos. RFU de la mezcla en el tiempo 0 se registra en longitud de onda de excitación de 430 nm y longitud de de onda de emisión de 535 nm. La placa de reacción se cubre con papel de aluminio y se mantiene en un horno humidificado oscuro a temperatura ambiente durante 16 a 24 horas. RFU al final de la incubación se registra con la misma configuración de emisión y de excitación utilizadas en el tiempo 0. La diferencia de RFU en el tiempo 0 y el final de incubación es representativa de la actividad de BACE2 en el tratamiento con el compuesto. Las diferencias de RFU se representan gráficamente frente a la concentración de inhibidor y se ajusta una curva con una ecuación lógica de cuatro parámetros para obtener el valor de IC_{50}. (May, *et al*., *Journal of Neuroscience*, 31, 16507-16516 (2011)).

El compuesto del Ejemplo 1 en este documento se prueba esencialmente como se ha descrito anteriormente y exhibe un IC50 de BACE2 de 479 nM + 202, n = 4 (media + SEM; SEM = error estándar de la media). La relación de BACE1 (ensayo enzimático FRET IC50) y BACE2 (ensayo FRET IC50 TMEM27) es aproximadamente 400 veces, lo que indica selectividad funcional para inhibir la enzima BACE1. Los datos expuestos anteriormente demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 es selectivo para BACE1 respecto de BACE2.

Ensayo de células completas SH-SY5YAPP695Wt

El ensayo de célula entera de rutina para la medición de la inhibición de la actividad de BACE1 utiliza la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Nº de acceso ATCC CRL2266) que expresa de forma estable un ADNc APP695Wt humano. Las células se utilizan rutinariamente hasta el paso número 6 y después se descartan.

Las células SH-SY5Y APP695 Wt se siembran en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a $5{,}0\times10^4$ células / pocillo en medio de cultivo de 200 µl (50% MEM / EBSS y F12 de Ham, 1 × cada piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y bicarbonato de Na que contiene 10% de FBS). El siguiente día, el medio se elimina de las células, se añade medio fresco después se incuba a 37 ° C durante 24 horas en

presencia / ausencia de compuesto de ensayo en el intervalo de concentración deseado.

Al final de la incubación, los medios acondicionados se analizan en cuanto a la evidencia de actividad de beta-secretasa mediante el análisis de péptidos Abeta 1-40 Y 1-42 por ELISA sándwich específico. Para medir estas isoformas específicas de Abeta, se utiliza monoclonal 2G3 como un anticuerpo de captura para Abeta 1-40 y monoclonal 21F12 como anticuerpo de captura para Abeta 1-42. Ambos ELISA de Abeta 1-40 y 1-42 Abeta utilizan 3D6 biotinilado como anticuerpo de reporte (para la descripción de anticuerpos, véase Johnson-Wood, *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **94**, 1550-1555 (1997)). La concentración de Abeta liberado en el medio acondicionado después del tratamiento con el compuesto corresponde a la actividad de BACE1 en tales condiciones. La curva de inhibición de 10 puntos se traza y se fija con la ecuación lógica de cuatro parámetros para obtener los valores de IC50 para el efecto de disminución de Abeta. El compuesto del Ejemplo 1 se probó esencialmente como se describe más arriba y exhibe la siguiente actividad para reducción de Abeta-, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

Ejemplo #	SH-SY5YAPP695Wt A-beta (1-40) ELISA IC_{50} (nM)	SH-SY5YAPP695Wt A-beta (1-42) ELISA IC_{50} (nM)
1	0,385 ± 0,163, n=4	0,381 ± 0,266, n=4

(media ± SEM; SEM = error estándar de la media)

Inhibición *In vivo* de Beta-Secretase

Varios modelos animales, incluyendo ratón, cobaya, perro, y mono, se pueden utilizar para la detección de la inhibición de la actividad de beta-secretasa in vivo después del tratamiento con el compuesto. Los animales utilizados en la presente invención pueden ser animales de tipo salvaje, transgénicos, o knockout génicos. 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 knockout génicos son útiles para analizar la inhibición in vivo de la producción de Abeta y sAPPbeta en presencia de compuestos inhibidores. En general, a los ratones PDAPP de 2 meses, ratones knockout génicos o animales no transgénicos se les administra el compuesto formulado en vehículos, tal como aceite de maíz , beta-ciclodextrina, tampones de

fosfato, PHARMASOLVE®, o otros vehículos adecuados vía oral, subcutánea, intravenosa , alimentación, u otra vía de administración. Una a veinte y cuatro horas después de la administración del compuesto, los animales son sacrificados, y los cerebros se extraen para el análisis de Abeta 1-x. "Abeta 1-x" como se utiliza en el presente documento se refiere a la suma de las especies de Abeta que comienzan con el resto 1 y finalizan con un C-terminal más grande que el residuo 28. Este detecta la mayoría de las especies de Abeta y es a menudo llamado "Abeta total». Los niveles totales de péptidos Abeta (Abeta 1-x) se miden por ELISA sándwich, utilizando monoclonal 266 como anticuerpo de captura y 3D6 biotinilado como anticuerpo de reporte. (Véase May, *et al*., *Journal of Neuroscience*, **31**, 16507-16516 (2011)).

Para estudios de toxicidad aguda, se administró el compuesto o vehículo apropiado y los animales se sacrifican aproximadamente 3 horas después de la dosificación. El tejido cerebral, se obtiene de los animales seleccionados y se analizan en cuanto a la presencia de Abeta 1-x. Después de la dosificación crónica los tejidos cerebrales de animales transgénicos APP de edad avanzada pueden también ser analizados en cuanto a la cantidad de placas de beta-amiloide después del tratamiento con el compuesto.

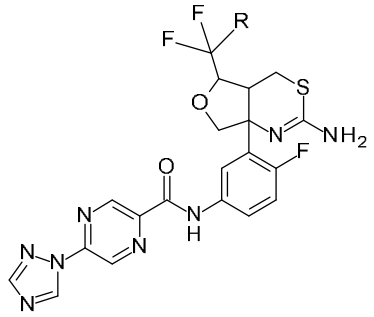
Los Animales (PDAPP u otros ratones APP transgénico o no transgénicos) a los que se les administró un compuesto inhibidor pueden demostrar la reducción de Abeta en los tejidos del cerebro, en comparación con los controles tratados con vehículo o controles de tiempo cero. Por ejemplo, una dosis oral de 3, 10, y 30 mg / kg del Ejemplo 1, a ratones PDAPP hembra jóvenes redujeron los niveles de péptidos Abeta 1-x en el hipocampo del cerebro en un 23% (no significativo), 43% (p <0, 05), y 58% (p <0,01), respectivamente. En el tejido cortical del cerebro, las dosis de 3, 10, y 30 mg / kg del Ejemplo 1 redujeron los niveles de Abeta 1-x en 43%, 59%, y 73% (todos los valores p <0,01) en comparación con los ratones tratados con vehículo tres horas después de la dosificación.

Teniendo en cuenta la actividad del Ejemplo 1, frente a la enzima BACE1 in vitro, estos efectos reductores de Abeta son coherentes con la inhibición de BACE in vivo, y demuestran además la penetración en el SNC del ejemplo 1.

Estos estudios muestran que el compuesto de la presente invención inhibe BACE1 y es, por lo tanto, útil en la reducción de los niveles de Abeta.

REIVINDICACIONES:

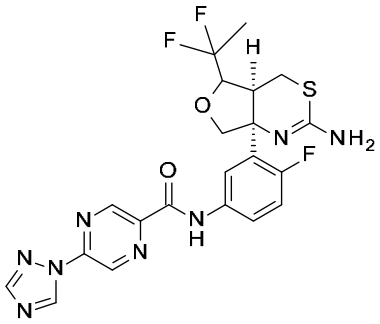
1. Un compuesto de la fórmula:



en donde R es metilo, etilo, o ciclopropilo;
o una sal aceptable para uso farmacéutico.

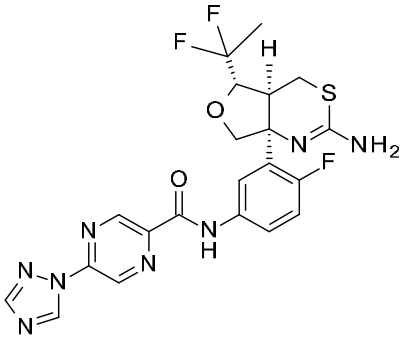
2. El compuesto o sal del mismo de acuerdo a la reivindicación 1 en donde R es metilo.

3. El compuesto o sal del mismo de acuerdo a la reivindicación 1 o reivindicación 2 en donde el compuesto es:



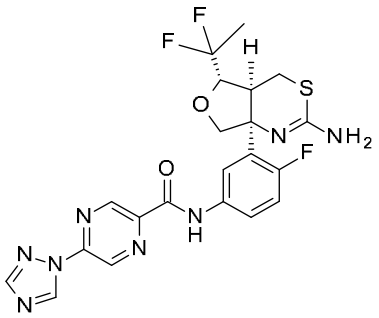
.

4. El compuesto o sal del mismo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde el compuesto es:



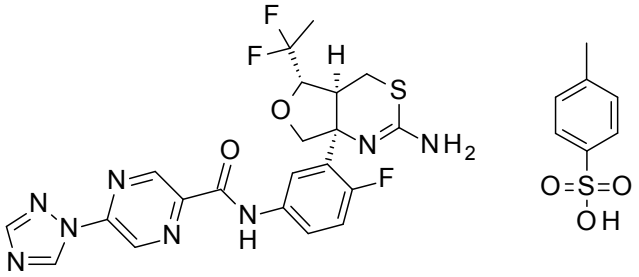
.

5. El compuesto de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es:



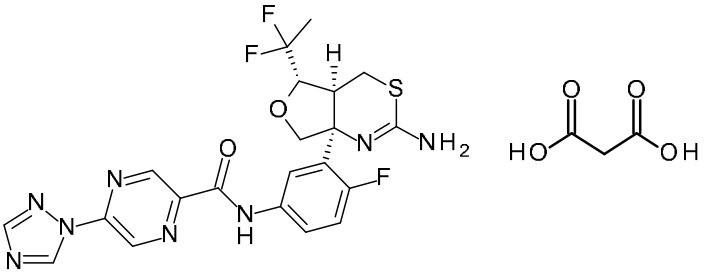
.

6. La sal de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es:



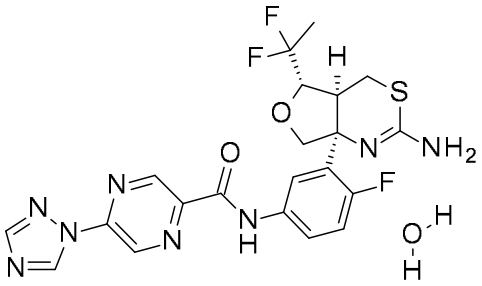
.

7. La sal de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es:



.

8. El compuesto de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es:



.

9. El compuesto o sal del mismo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde el compuesto es 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida.

10. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 5 que es 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida.

11. El compuesto de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es hidrato 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida.

12. La sal de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es 4-metilbencenosulfonato 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida.

13. La sal de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es malonato 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-(1,2,4-triazol-1-il)pirazina-2-carboxamida.

14. Un método para tratar enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una sal aceptable para uso farmacéutico.

15. Un método para tratar el avance de deterioro cognitivo leve de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una sal aceptable para uso farmacéutico.

16. Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico del mismo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en terapia.

17. Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico del mismo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.

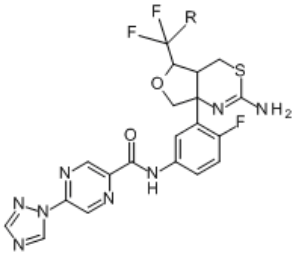
18. Un compuesto o sal aceptable para uso farmacéutico del mismo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en el tratamiento del avance de deterioro cognitivo leve de la enfermedad de Alzheimer.

19. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 con uno o más vehículos aceptables para uso farmacéutico, diluyentes, o excipientes.

20. Un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar un compuesto o una sal aceptable para uso farmacéutico de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 con uno o más vehículos aceptables para uso farmacéutico, diluyentes, o excipientes.

Resumen

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula II:



Fórmula II

o una sal aceptable para uso farmacéutico.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
1 September 2016 (01.09.2016)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2016/137788 A1

(51) International Patent Classification:
C07D 513/04 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61K 31/542 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2016/018160

(22) International Filing Date:
17 February 2016 (17.02.2016)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
62/119,391 23 February 2015 (23.02.2015) US

(71) Applicant: **ELI LILLY AND COMPANY** [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US).

(72) Inventors: **HEMBRE, Erik James**; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). **LOPEZ, Jose Eduardo**; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). **MCMAHON, Jennifer Anne**; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). **RICHARDS, Simon James**; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). **WINNEROSKI, Leonard Larry, Jr.**; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). **WOODS, Timothy Andrew**; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

(74) Agents: **LENTZ, Nelsen L.** et al.; Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

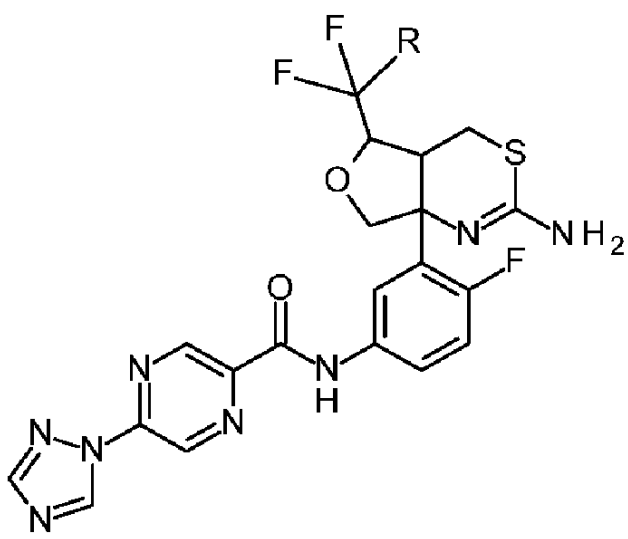
— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

(54) Title: SELECTIVE BACE1 INHIBITORS



II

(57) Abstract: The present invention provides a compound of Formula II: or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

WO 2016/137788 A1