SAL DE TOSILATO DE N-[3-[4AR,7AS)-2-AMINO-6-(5-FLUOROPIRIMIDIN-2-IL)-4,4A,5,7-TETRAHIDROPIRROLO[3,4-D][1,3]TIAZIN-7A-IL-4-FLUORO-FENIL]-5-METOXI-PIRAZINA-2-CARBOXAMIDA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención presente se refiere a una sal de ácido toluensulfónico (tosilato) de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida, a composiciones farmacéuticas que comprenden la sal de tosilato, a métodos de uso de la sal de tosilato para tratar trastornos fisiológicos, y a productos intermedios y procedimientos útiles en la síntesis de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVECNCIÓN

La invención presente está en el campo del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades y trastornos que implican péptido β (Abeta) amiloide, un segmento de péptido neurotóxico y altamente agregante 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 sólo transitorios, sintomáticos para el paciente, hay una necesidad no satisfecha en el tratamiento de la enfermedad de

Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la generación, agregación y deposición de Abeta en el cerebro. La inhibición completa o parcial de β-secretasa (enzima de escisión de la proteína precursora amiloide en el sitio β; BACE) se ha demostrado que tienen un efecto significativo en patologías relacionadas con la placa y la placa dependiente en modelos de ratón que sugieren que incluso pequeñas reducciones en los niveles de péptido Abeta podría resultar en una reducción significativa a largo plazo en la carga de placas y los déficits sinápticos, proporcionando así beneficios terapéuticos significativos, particularmente en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La Patente de Estados Unidos No. 8,841,293 describe ciertos inhibidores BACE para el tratamiento de trastornos mediados por péptido Abeta, tales como la enfermedad de Alzheimer, y, en particular, divulga por ejemplo el inhibidor de BACE N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida y la sal de clorhidrato correspondiente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Se desean formas novedosas de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenila]-

5-metoxi-pirazina-2-carboxamida que proporcionen una mejor estabilidad en estado sólido y la estabilidad química para mejorar la utilización en la preparación y fabricación de formulaciones farmacéuticas. Por consiguiente, la invención presente proporciona una sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida. Además, la invención presente proporciona la sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida la cual se caracteriza por un pico substancial en el espectro de difracción de rayos X, un ángulo 2-theta de 5.0° de difracción en combinación con uno o más de los picos seleccionados a partir del grupo que consiste de 19.6°, 13.8° y 18.5°; con una tolerancia para los ángulo de difracción de 0.2 grados.

La invención presente además proporciona un método para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer en un paciente, que comprende su administración al paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de una sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropyrimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida. La invención presente además proporciona un método que trata la progresión

del deterioro cognitivo leve a la enfermedad del Alzheimer en un paciente, que comprende la administración a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de una sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida. La invención presente además proporciona un método de inhibición BACE en un paciente, que comprende la administración a un paciente en necesidad de tal tratamiento, de una cantidad efectiva de una sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida. La invención presente además proporciona un método para que inhiba la escisión mediada por BACE de la proteína precursora amiloide, que comprende la administración a un paciente en necesidad de tal tratamiento de una cantidad efectiva de sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida. La invención además proporciona un método para que inhiba la producción de péptido Abeta, que comprende la administración a un paciente en necesidad de tal tratamiento de una cantidad efectiva de una sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-

5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

Además, esta invención proporciona una sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida para su uso en terapia, en particular para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer o para el tratamiento de la progresión de enfermedades cognitivas leves a la enfermedad del Alzheimer. Inclusive además, esta invención proporciona el uso de una sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer o para el tratamiento de la progresión de enfermedades cognitivas leves a la enfermedad del Alzheimer.

Además, la invención proporciona un métodos para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer en un paciente, que comprende la administración a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de una sal de tosilato N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida el cual es caracterizado por un pico substancial en el espectro de difracción de rayos X, un ángulo 2-teta de 5.0° de difracción en combinación con uno o más de los picos seleccionados a partir del grupo que consiste

de 19.6°, 13.8°, y 18.5°; con una tolerancia para los ángulos de 0.2° grados de difracción. La invención también proporciona una sal tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida que se caracteriza por un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, al ángulo 2-theta de 5.0° de difracción en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste de 19.6°, 13.8°, y 18.5°; con una tolerancia para los ángulos de 0.2 grados de difracción para uso en terapia, en particular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o para el tratamiento de la progresión del deterioro cognitivo leve a la enfermedad de Alzheimer. Además, la invención proporciona una sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida el cual se caracteriza por un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, al ángulo 2-theta de 5.0° de difracción en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste de 19.6°, 13.8°, y 18.5°; con una tolerancia para los ángulos de 0.2 grados de difracción, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o para el tratamiento de la progresión del deterioro cognitivo leve a la enfermedad de Alzheimer.

La invención proporciona además una composición farmacéutica, que comprende la sal tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes o excipientes. Esta invención también abarca nuevos intermedios y procesos para la síntesis de la sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

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

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento" o "tratar" incluyen restringir, ralentizar, detener o revertir la progresión o la gravedad de

un síntoma o trastorno existente.

Tal como se utiliza aquí, el término "paciente" se refiere a un ser humano.

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

Tal como se utiliza aquí, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad o dosis de compuesto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la misma que, tras la administración dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.

Una cantidad eficaz puede ser determinada fácilmente por el médico tratante, como un experto en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad eficaz para un paciente, una serie de factores son considerados por el médico encargado, incluyendo, pero no limitado a: la especie del paciente; su tamaño, edad, y salud general; la enfermedad específica o trastorno que se trate; 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 invención presente son generalmente eficaces en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente entran dentro del intervalo 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 que adecuados, mientras que en otros casos dosis aún mayores se pueden emplear con efectos secundarios aceptables, y por consiguiente el intervalo de dosificación anterior no se pretende que limiten el alcance de la invención de cualquier manera.

Los compuestos de la invención presente se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas administradas por cualquier vía que hace que el compuesto biodisponible, incluyendo la vía oral, transdérmica, y las rutas parenterales. Lo más preferiblemente, tales composiciones son para administración oral o transdérmica, con la administración oral se prefiere especialmente. Tales composiciones y procedimientos farmacéuticos para preparar la misma son bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (DB Troy, Editor, 21a Edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

La sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-

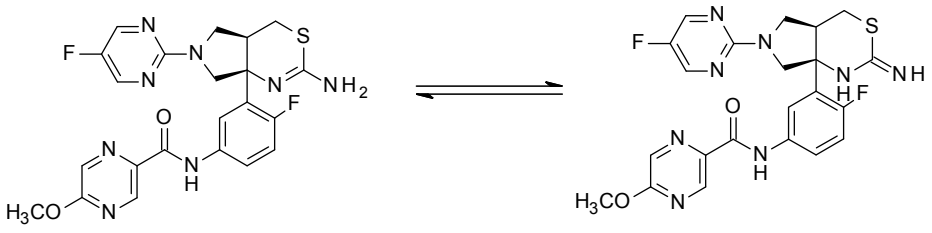
d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida es particularmente útil en los métodos de tratamiento de la invención, pero se prefieren ciertas formas. Los siguientes párrafos describen tales formas. Se entenderá que estas preferencias son aplicables a las composiciones farmacéuticas, los métodos de tratamiento, y para los nuevos compuestos de la invención.

Sal de tosilato cristalina de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida el cual se caracteriza por un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, al ángulo 2-theta de 5.0° de difracción en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste de 19.6°, 13.8°, y 18.5°; con una tolerancia para los ángulos 2-theta de 5.0° de difracción x es particularmente preferido.

Uno de experiencia ordinaria en la técnica apreciarán que N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4, 4a,5, 7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida pueden existir en formas tautómeras, tal como se representa en el Esquema A. Cuando cualquier referencia en esta solicitud a uno de los tautómeros específicos de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)- 4, 4a,5, 7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-

carboxamida se da, se entiende para abarcar ambas formas tautoméricas y todas las mezclas de los mismos.

Esquema A



Adicionalmente, ciertos intermedios descritos en los esquemas siguientes pueden contener uno o más grupos protectores de nitrógeno. El grupo protector variable puede ser el mismo o diferente en cada caso dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las transformaciones particulares a realizar. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidos por el experto en la materia y se describen en la literatura (véase, por ejemplo, "Greene´s Protective Groups in Organic Synthesis", Cuarta Edición, by Peter G.M. Wuts y Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

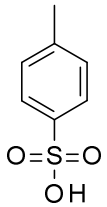
Ciertos centros estereoquímicos se han dejado sin especificar y ciertos sustituyentes han sido eliminados en los esquemas siguientes para mayor claridad y no están destinados a limitar la enseñanza de los esquemas en modo alguno. Además, isómeros individuales, enantiómeros y diastereómeros se pueden separar o resolver por un experto normal en la técnica en

cualquier punto conveniente en la síntesis de compuestos de la invención, por métodos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (Véase, por ejemplo, J. Jacques, et al., "Enantiómeros, Racematos, y Resoluciones", John Wiley and Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel y S.H. Wilen," Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Las denominaciones "isómero 1" e "isómero 2" se refieren a los compuestos que eluyen a partir de la cromatografía quiral primero y segundo, respectivamente, y si la cromatografía quiral se inicia tempranamente en la síntesis, la misma designación se aplica a los intermediarios subsecuentes y ejemplos.

Ciertas abreviaturas están definidas de la siguiente manera: "acetonitrilo" se refiere a ACN; "APP" se refiere a la proteína precursora de amiloide; "CSF" se refiere al líquido cefalorraquídeo; "DCM" se refiere a diclorometano; "DIPEA" se refiere a diisopropiletilamina, N-etil-N-isopropil-propan-2-amina, o N,N-diisopropiletilamina; "DMEM" se refiere al medio de Eagle modificado por Dulbecco; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "DMSO" se refiere a sulfóxido de dimetilo; "EDCI" se refiere a 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; "ee" se refiere al exceso enantiomérico; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "Ex" se refiere al ejemplo; "F12" se refiere al medio F12 de Ham; "FBS" se refiere a Suero Bovino Fetal; "FRET" se refiere a la transferencia de

energía por resonancia de fluorescencia; “HEK” se refiere a riñón embrionario humano; “HOAc” se refiere a ácido acético; “HOBt” se refiere a hidrato de 1-hydroxilbenzotriazol; “HPLC” se refiere a cromatografía líquida de alta resolución; “IC_{50}” se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibidora máxima posible para ese agente; “min” se refiere a minuto o minuto; “MTBE” se refiere a metil terc-butil éter; “PDAPP” se refiere a plaquetas derivadas de proteína precursora amiloide; “Prep” se refiere a la preparación; “RFU” se refiere a la unidad de fluorescencia relativa; “SCX” se refiere a intercambio catiónico fuerte; “R_t” se refiere a tiempo de retención; y “THF” se refiere a tetrahidrofurano.

Se entiende por un experto normal en la técnica que los términos “tosilato”, “ácido toluensulfónico”, “ácido p-toluensulfónico”, y “ácido sulfónico 4-metilbenceno” se refieren al compuesto de la siguiente estructura:



Como tal, se entiende por un experto normal en la técnica que una referencia en este documento a cualquier de los siguientes nombres:

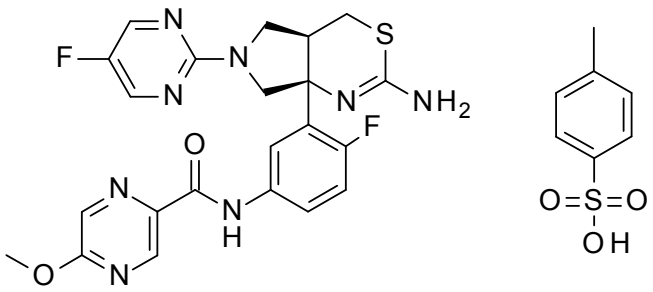
“La sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-

fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida”;

“N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida; “ácido toluensulfónico”;

“N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida”; y “ácido p-toluensulfónico”; y

“N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida; ácido 4-metilbenceno sulfónico”; se refiere a la sal de la siguiente estructura:

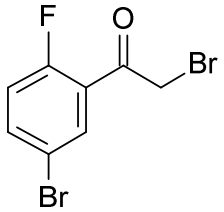


La sal tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida se pueden preparar por una variedad de

procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en las Preparaciones y Ejemplos a continuación. Además, N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidina-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida base libre y la sal de HCl correspondiente se pueden preparar por un experto ordinario en la técnica como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 8,841,293. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las rutas descritas se pueden combinar de diferentes maneras, o junto con pasos de diferentes preparaciones para preparar compuestos de la invención. Los productos de cada etapa pueden ser recuperados por métodos convencionales bien conocidos en la técnica, incluyendo extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración, o cristalización. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles para un experto normal en la técnica.

Preparación 1

2-Bromo-1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)etanona



N-bromosuccinimida (984 g, 5.53 mol) se añadió en porciones a una solución de 1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)etanona

(1000 g, 4.6 mol) y ácido p-toluensulfónico (1315 g, 7.64 mol) en DCM (7 L) a 35°C. La mezcla se agita y se calienta a 40°C durante 4 horas. La mezcla se enfría a 24°C, y 7% de $NaHCO_3$ (5 L) se agrega. Las capas se separaron y la capa orgánica se lava con 10% Na_2SO_3 (5 L) y agua (5 L). La capa orgánica se concentra a 2-3 volúmenes para dar el compuesto del título que se usó sin purificación adicional.

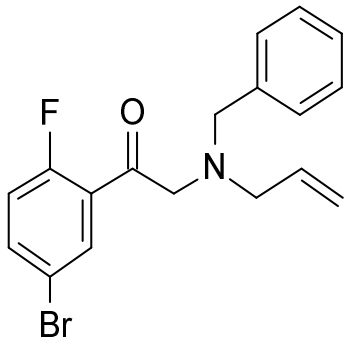
Preparación Alternativa 1

1-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)etanona (80 g, 0.37 mol) se disuelve en DCM (800 mL) y se enfrió a 10°C. El bromo (63 g, 0.39 mol) se añade lentamente durante 5 horas. Después de 30 minutos, se añade bromo adicional (3.5g, 0.06 mol). Después de 30 minutos, la mezcla se calentó a temperatura ambiente y la capa orgánica se lava con una mezcla de NaCl acuoso (500 mL) y $NaHCO_3$ acuoso (400 mL). La capa orgánica se lavó sucesivamente con $NaHCO_3$ acuoso (400 mL), $NaHSO_3$ acuoso (2 × 400 mL), y NaCl acuoso. La capa orgánica se seca (Na_2SO_4) y se concentró hasta un residuo. El residuo se disuelve en una mezcla de DCM (100 mL) y éter de petróleo (500 mL). La solución se enfría a -50°C durante 0.5 horas y el sólido se recogió por filtración para dar el compuesto titulado (84 g, 77%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 4.46 (d, 2H), 7.07 (dd, 1H), 7.66 (m, 1H), 8.02 (dd, 1H).

Preparación 2

2-[alil(bencil)amino]-1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)

etanona

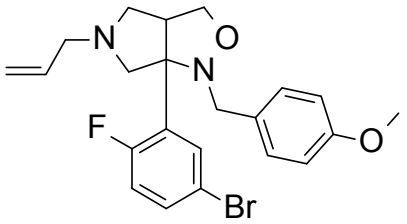


2-Bromo-1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)etanona (25.1 g, 84.8 mmol) se añadió a una solución de N-bencilprop-2-en-1-amina (15.0g, 102 mmol) en tolueno (200 mL) y DIPEA (59 mL, 338 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla es desoxigenada de agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos mientras que el nitrógeno subsuperficial burbujea a través de la mezcla. La reacción se calienta a 40°C, se agitó durante 2.5 horas, y luego se añade N-bencilpro-2-en-1-amina adicional (2.0g, 13.6 mmol). La reacción se agitó a 40°C durante 4.5 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. El material se usó sin purificación adicional. La solución se analizó por HPLC para el compuesto del título utilizando los siguientes parámetros: columna LC: Waters Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC®) C82.1 × 100 mm 1.7 micras; fase móvil A: 0.1% (vol/vol) de TFA en agua + 0.2% ACN (vol/vol), preparado mediante la adición de TFA (4 mL) y ACN (10 mL) a agua (4L), fase móvil B: 0.1% de TFA en ACN, preparado por adición de TFA (4 mL) a ACN (4 L). Gradiente: %A = 95% a 53.1% en 10 minutos,

velocidad de flujo de 0.85 mL/minuto, temperatura de la columna: 45°C. R_t = 6.43 minutos (UV)

Preparación 3

5-Alil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-1-[(4-metoxifenil)metil-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol

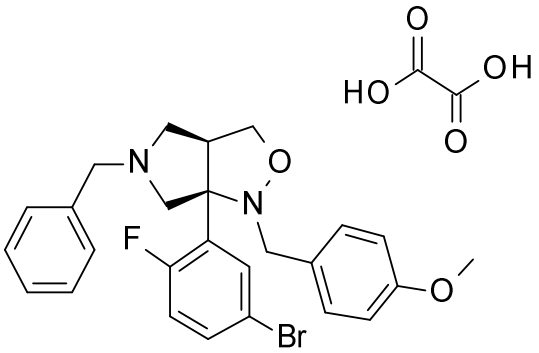


A una solución de 2-bromo-1-dialilamina(2-fluoro-fenil-5-bromo)etanona (1363 g, 4.61 mol) en tolueno (10 L) se añade (537 g, 5.53 mol) y DIPEA (2381 g, 18.42 mol). La mezcla se agita durante 4 horas a 40°C para dar 1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-(dialilamino)etanona, el cual no se aísla. N-(4-metoxibencil)hidroxilamina (847 g, 5.53 mol) y titanio (IV) isopropóxido (1965 g, 6.91 mol) se añaden a la mezcla que contiene 1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-(dialilamino)etanona. La mezcla se agita a 90°C durante 2 horas. La mezcla se enfría a 20°C, y se añaden ácido cítrico monohidrato 50% (4 L) y Na_2CO_3 saturado (4 L). Las capas se separaron y la acuosa se extrae con MTBE (5 L). El extracto orgánico se lavó con agua (5 L), y se filtró a través de tierra de diatomeas y se concentró a sequedad. EtOAc (10 L) y ácido oxálico (580 g) se añaden al residuo y un sólido se filtra y se añaden a 1 N NaOH (13 L). Se añade MTBE (5 L) y la mezcla se filtró a través de tierra

de diatomeas. Las capas se separaron y la capa orgánica se concentra a 2 volúmenes. Se añade heptano (3 L) y la solución se enfría a 10°C. El sólido resultante se filtró para dar el compuesto del título (1330 g, 64%). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.51-2.49 (m, 3H), 3.9-3.4 (m, 3H), 3,78-3,41 (m, 6H), 4.01 (m, 1H), 5.24 – 5.01(m, 2H), 5.89-5.85 (m, 1H), 6.82-6.80 (m, 2H), 7.51-7.13 (m, 3H), 7.63-7.62 (m, 1H), 7.65-7.64 (m, 1H).

Preparación 4

Relativo-(3aR,B6aS)-5-Bencil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol, ácido oxálico

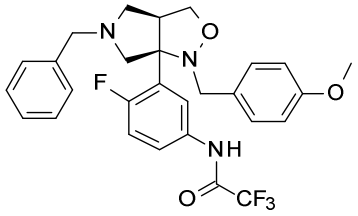


N-[(4-metoxifenil) metil] hidroxilamina (15.5 g, 101 mmol) se añade a la solución de 2-[alil(bencil)amino]-1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)etanona en 40°C, seguido por titanio (IV) isopropóxido (50.3 mL, 169 mmol). La mezcla se desoxigenó mediante burbujeo de nitrógeno a través del sistema durante 5 minutos. La mezcla se calienta a 90°C con agitación durante 2 horas. La mezcla de reacción se lava con una solución de ácido cítrico (36 g, 186 mmol) en agua (36 g) y se agitó durante 30

minutos a temperatura ambiente. El carbonato de sodio (100 g, 939 mmol) se añade como una solución saturada en agua y el pH se ajusta aproximadamente a 9. La mezcla se diluye con agua y tolueno según sea necesario para separar las capas. La capa de tolueno se lava con una solución de HCl en agua (5.1 mL de HCl a 5N) diluido con agua (200 mL) seguido de agua (200 mL). La capa de tolueno se concentró hasta un aceite espeso. El aceite se disolvió en EtOAc (375 mL) y una solución de ácido oxálico (15.4 g, 169 mmol) disuelto en EtOAc (375 mL) se añade gota a gota con agitación a temperatura ambiente. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 días, se filtró, y la torta de producto se lava con EtOAc (250 mL). El sólido se seca durante la noche *en vacío* a 40°C para dar el compuesto del título como una mezcla racémica cis (41.7 g, 84%). ES/MS (m/z): 498 (M+H).

Preparación 5

Relativo N-[3-[(3aR,6aS)-5-Bencil-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-6a-il]-4-fluoro-fenil]-2,2,2-trifluoro-acetamida

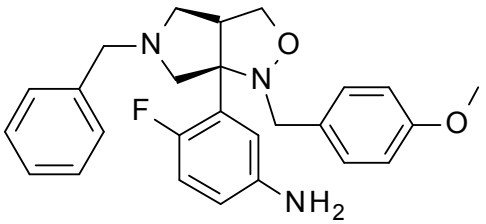


Relativo-(3aR,6aS)-5-bencil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-

tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol, ácido oxálico (23.6 g, 40.2 mmol) se añadió a una mezcla de DCM (400 mL) y solución acuosa 5 N de NaOH (200 mL). La mezcla se agitó durante 10 minutos y luego se separan las capas. La capa orgánica se concentró para dar relativo-(3aR, 6aS)-5-bencil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol (20.0g, 40.2 mmol). Este material se añade a sulfóxido de dimetilo (360 mL), 2, 2, 2-trifluoroacetamida (7.8 g, 68 mmol), yoduro de sodio (10.3 g, 68.6 mmol), carbonato de potasio (9.54g, 68.3 mmol), (1R,2R)-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexanodiamina (4.7g, 32 mmol), y cobre (I) yoduro (1.53 g, 8.03 mmol). La mezcla se desoxigenó mediante burbujeo de nitrógeno a través del sistema durante 10 minutos. La mezcla se calienta a 115°C, se agitó durante 5.5 horas, y se enfrió a temperatura ambiente. EtOAc (250 mL) y agua (200mL) se añadieron y la mezcla resultante se agita durante 10-15 minutos. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (200 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavan con solución de cloruro amónico 20% en peso acuoso (100 mL) seguido de una solución de cloruro de litio 20% en peso acuoso (100 mL) y agua (100 mL). La capa orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra, y se concentró a sequedad para dar el compuesto del título crudo en forma de una mezcla cis racémico (23.6 g, 111%). ES/MS (m/z): 530(M+H).

Preparación 6

Relativo-3-[(3aR,6aS)-5-Bencil-1-(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-6a-il]-4-fluoro-anilina

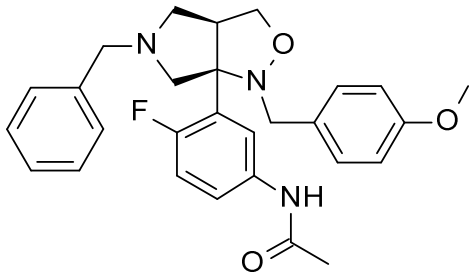


Relativo-N-[3-[(3aR,6aS)-5-bencil-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-6a-il]-4-fluoro-fenil]-2,2,2-trifluoro-acetamida (21.0g, 39.7 mmol) se añade a metanol (250 mL), NaOH acuoso a 5N (105 mL) y etanol (105 mL y la mezcla resultante se calienta a 50°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentra bajo presión reducida a 35-40°C para eliminar el metanol y el etanol. El material se disuelve en una mezcla de MTBE (320 mL) y agua (300 mL). Las capas se separaron y la capa orgánica se lava con agua (100 mL) seguido de una mezcla de agua (400 mL) y HCl acuoso a 12 N (3.5 mL). La capa acuosa se añade a una mezcla de MTBE (400 mL), agua (100 mL), y NaOH acuoso a 5 N (25mL) y las capas se separan. La capa acuosa se lava con MTBE (100 mL). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron *en vacío* para dar el compuesto del título como una mezcla racémica cis (9.8g, 57%). ES/MS

(m/z): 435(M+H).

Preparación 7

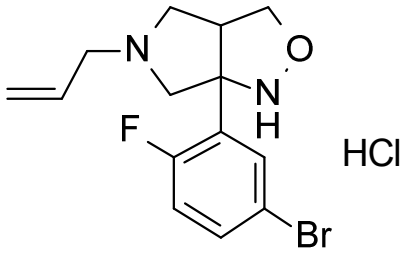
Relativo-N-3-[(3aR,6aS)-5-Bencil-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-6a-il]-4-fluoro-fenil]acetamida



Relativo-3-[(3aR,6aS)-5-bencil-1-(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-6a-il]-4-fluoro-anilina (9.4 g, 22 mmol) se añade a DCM (110 mL), 4-dimetilaminopiridina (0.08 g, 0.65 mmol) y trietilamina (6.1 mL, 43 mmol) y la reacción se enfría a 0°C. El anhídrido acético (3.4g, 33 mmol) se añadió gota por gota a la solución. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Agua (140 mL) se añade a la reacción y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa acuosa se lava con DCM (100 mL). Las capas orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró para dar el compuesto del título como una mezcla racémica cis (10.1g, 100%). ES/MS (m/z): 477(M+H).

Preparación 8

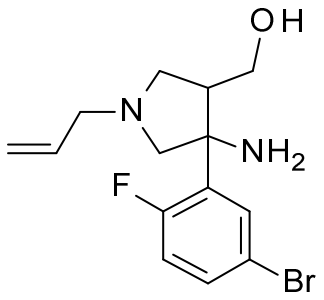
5-alil-6A (5-bromo-2-fluoro-fenil)3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol hidroclorhídrico



TFA (4L, 52.9 mol) se añade gota a gota a una solución de 5-alil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-1-[(4-metoxifenil)metil-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol (1990g, 4.45 mol) en DCM (12L) a una velocidad para mantener la temperatura por debajo de 35°C. Después de la adición completa, la mezcla se calienta a 33-43°C y se agita durante 6 horas. El NaOH (20%, 10L) se añade a una velocidad para mantener la temperatura por debajo de 35°C. Las capas se separaron y la capa orgánica se lava con agua (6L). La solución se concentra, se añade etanol (16L), y la mezcla se filtró a través de tierra de diatomeas. El filtrado se concentra y se agrega EtOAc (10L). 4M de HCl en EtOAc (8 L) se añade y el sólido resultante se filtra y se seca para dar el compuesto del título (1385g, 85.6%). ES/MS (m/z): 327.1(M+H)

Preparación 9

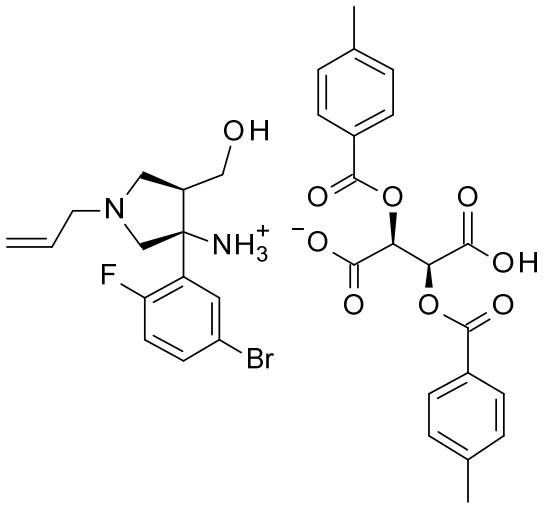
[1-alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluoro-fenil) pirrolidin-il-3]metanol



Una solución acuosa saturada de carbonato de sodio se añade a una solución de clorhidrato de 5-alil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol (1400g, 3.85 mol) en DCM (7 L) para alcanzar un pH > 9. Las capas son separadas y el extracto orgánico se concentraron hasta 1.5 volúmenes. El HOAc (1.38L) se añade y la solución se concentró hasta 2L. El HOAc (7L) y polvo de zinc (2.5 kg, 38.5 mol) y la mezcla se calienta a 40-50 ° C y se agitó durante 3 horas. El EtOAc (9.8L) se añade y la mezcla se filtró a través de tierra de diatomeas. La torta del filtro se lavó con EtOAc (4L). El filtrado se separa y el agua (7L) se añade a las fases orgánicas combinadas. El hidróxido de amonio se añade hasta llegar a un pH ≥ 9. Las capas se separaron y la capa orgánica se concentra a 2L. El etanol (2.8 L) se añade y la solución se concentra a 2L. El etanol (19L) se añade y la mezcla se filtra a través de tierra de diatomeas para dar una solución de etanol del compuesto del título, que se usó sin purificación adicional.

Preparación 10

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

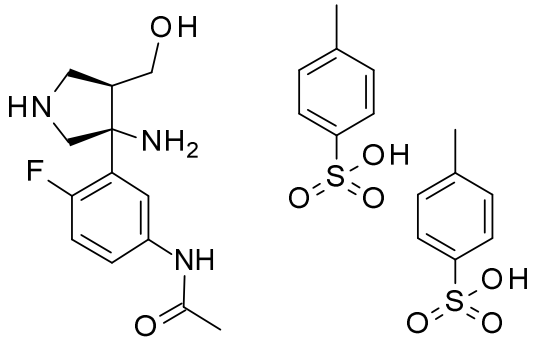


Se añade monohidrato del ácido di-p-toluoil-L-tartárico (1.04kg, 2.69 mol) a una solución de [1-alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluoro-fenil)pirrolidina-3-il]metanol (1264g. 3.85 mmol) en etanol (21L). La mezcla se calienta a 65-75°C y se agitó durante 3 horas. La mezcla se enfría a 5-10°C, se añade una semilla de cristal de [(3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidina-3-il]amonio; (2S,3S)-4-hidroxi-2,3-bis[(4-metilbenzoilo)oxi]-4-oxo-butanoato (1.0g), y la mezcla se agitó durante 3 horas. El sólido se filtró y la torta del filtro se lava con etanol frío (1.4L). La torta del filtro se secó para dar el compuesto del título como un sólido blanco. Análisis quirales del segundo

isómero de elución: Columna: Quiralpak IC, 4.6 mm * 250 mm * 5 micras; eluyente: 90% de hexano (0.3% de dietilamina): etanol 10% (0.3% de dietilamina); velocidad de flujo de 1.0 mL/min a 270 nm de UV confirma el enantiómero enriquecido (99% ee) enantioméricamente con R_t = 7.4 minutos, (1050g, 38%). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 2.40(s, 6H), 3.5-3.4(m, 1H), 3.57-3.31(m, 3H), 3.66-3.58(m, 4H), 3.75-3.74(m, 2H), 5.38-5.36(m, 1H), 5.50-5.46(m, 1H), 5.88(s, 2H), 5.97-5.91(m, 1H), 07.10-7.05(m, 1H), 7.29 (d, J= 8,0 Hz, 4H), 7,53-7,51 (m, 1H), 7,80-7,78 (m, 1H), 8,01 (d, J= 8.0 Hz, 4H).

Preparación 11

Relativa-1-[3-[(3S,4R)-3-Amino-4-(hidroximetil) pirrolidin-3-il]-4-fluoro-fenil], ácido di-toluensulfónico propan-2-ona

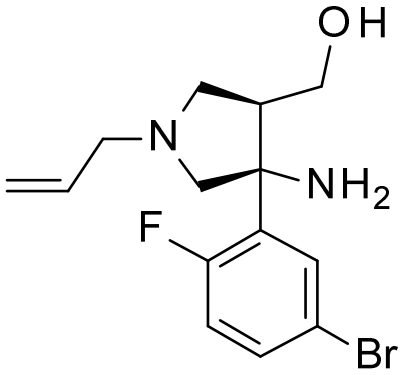


Relativo-N-3-[(3aR,6aS)-5-bencil-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-6a-il]-4-fluoro-fenil]acetamida (5.0g, 11.0mmol) se añade a agua (75 mL), 10% de paladio sobre carbono (2.5 g, 23mmol), ácido p-toluensulfónico (5.0g, 26mmol), y etanol (75 mL) y la

mezcla se hidrogena en una atmósfera de hidrógeno a 50 psi a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla se filtra a través de tierra de diatomeas y la almohadilla se lavó con etanol (100 mL) seguido de DCM (100 mL). El filtrado se concentró para dar el compuesto del título como una mezcla racémica cis en rendimiento bruto quantitativo (8.1g,> 100%). El material se usó directamente sin purificación adicional. ES/MS (m/z): 268(M+H).

Preparación 12

((3R,4S)-1-alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluoro-fenil) pirrolidina-3-il)metanol

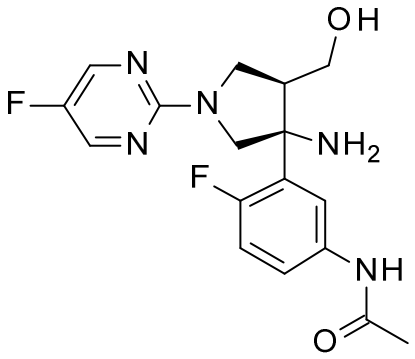


1 N HCl (500 mL, 500 mmol) se añade a una solución a 0°C de [(3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidina-3-il]amonio; (2S,3S)-4-hidroxi-2,3-bis[(4-metilbenzoilo)oxi]-4-oxo-butanoato (100g, 139.4 mmol) en EtOAc (500 mL). La mezcla se agitó durante 1 hora. La capa acuosa se separa y se ajusta el pH a 8 con NaOH a 1 N. La capa acuosa se extrae con EtOAc (350 mL x 2). Las capas orgánicas

se combinaron, se lavaron con agua (500 mL) y se concentró para dar el compuesto del título (40g, 87%). Los análisis quirales del segundo isómero de elución: Columna: Quiralpak IC, 4.6 mm * 250 mm * 5 micras; eluyente: 90% de hexano (0.3% de dietilamina): etanol 10% (0.3% de dietilamina); velocidad de flujo de 1.0 mL/min a 270 nm de UV confirma el enantiómero enriquecido (99,7% ee) enantioméricamente con R_t = 7.4 minutos. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.78-2.70(m, 5H), 3.16-3.00(m, 3H), 3.87-3.75(m, 1H), 3.90-3.84(m, 1H), 5.24-5.11(m , 2H), 5.91-5.87(m, 1H), 6.95-6.91(m, 1H), 7.35-7.32(m, 1H), 7.67-7.65(m, 1H).

Preparación 13

Relativo-N-[3-[(3S,4R)-3-Amino-1-(5-fluoropirimidin-2-il)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il]-4-fluoro-fenil]acetamida

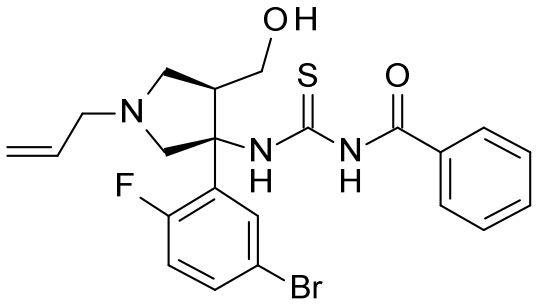


Relativo-1-[3-[(3S,4R)-3-Amino-4-(hidroximetil) pirrolidina-3-il]-4-fluoro-fenil]propan-2-ona, el ácido di-toluensulfónico (7.5 gramos, 12.3mmol) se añade a ACN (75 ml).

Se añade 2-cloro-5-fluoropirimidina (2.44g, 18.4 mmol) y DIPEA (7.5 ml, 43 mmol) y la mezcla se calienta a 70 ° C durante 20 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. Se añade agua (50 ml) la mezcla se agitó durante 1 hora como se forma una suspensión espesa. La mezcla se filtró y se secó a temperatura ambiente bajo vacío para dar el compuesto del título como una mezcla racémica cis (3.0g). La solución acuosa restante se extrae con cloroformo (3 x 20 ml), se secó sobre sulfato de sodio, se concentró a sequedad y se secó a vacío para dar el compuesto del título adicional (1.8g), para un rendimiento total crudo (4.8g, 110%). ES/MS (m/z): 364 (M+H).

Preparación 14

N-(((3S,4R)-1-Alil-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il)carbamatiol)benzamida

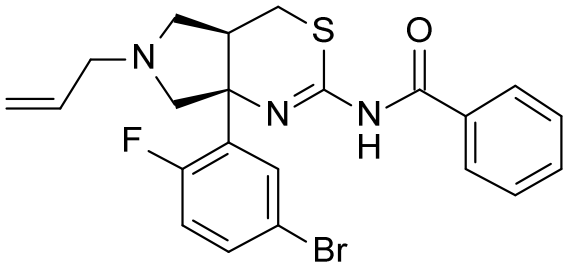


Isotiocianato de benzoilo (15.0 g, 91.9 mmol) se añade a una solución a 0°C de ((3R,4S)-1-alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluoro-fenil)pirrolidin-3-il)metanol (30g, 91.1 mmol) en THF (400 ml). La solución se calentó a 25°C y se agitó durante 1 hora para dar una solución THF del compuesto del

título, que se usó sin purificación adicional.

Preparación 15

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

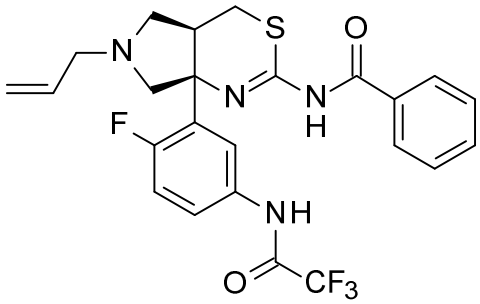


Trifenilfosfina (36.8 g, 140.3 mmol) se añade a una solución en THF (400 ml) de N-(((3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il)carbamatiol)benzamida (91.1 mmol). Se añade azodicarboxilato de Di-t-butilo (31.6g, 137.2 mmol) en THF (100 ml). La mezcla se agita a 20-30°C durante 2 horas. La mezcla se concentra y se añade MTBE (400 ml). La solución se filtra a través de tierra de diatomeas y la torta se lava con MTBE (130 ml). Los filtrados se combinan y HCl a 1N en EtOAc (200 ml) se añade. La mezcla se agitó durante 2 horas y después se concentró a 500 ml. Se añade MTBE (320 ml) y la solución se filtró y se lavó con heptano (130 ml). El sólido se suspendió en EtOAc (650 ml) y se agitó a 50-60°C durante 2 horas La suspensión caliente se filtró y el sólido se lava con EtOAc (130 ml) y heptano (130

ml). El sólido se resuspende en EtOAc (650 ml) y se agitó durante 2 horas a 50-60 ° C. La suspensión caliente se filtró y se lavó con EtOAc (130 ml) y heptano (130 ml). El sólido se secó para dar el compuesto del título como la sal de di-HCl (40g, 80%, 99.5% ee). Análisis quirales del primer isómero de elución: Columna: Quiralpak IC, 4.6 mm * 250 mm * 5 micras; eluyente: 85% de hexano (0.1% de dietilamina): 15% de alcohol isopropílico (0.1% de dietilamina); velocidad de flujo de 1.0 ml/min a 282 nm de UV confirma el enantiómero enriquecido (99,5% ee) enantioméricamente con R_t = 12.5 minutos.

Preparación 16

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

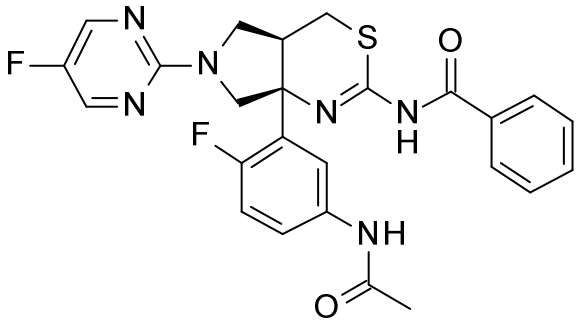


15% de carbonato de sodio (440 ml) se añade a una solución de diclorhidrato de N-((4aR,7aS)-6-Alil-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (495 g, 717.88 mmol) en EtOAc (3L) y agua (784mL). La mezcla se agita durante 1-2 horas. Las capas se

separaron y la capa orgánica se filtra a través de gel de sílice (40 g) y se lavaron con EtOAc (600 ml). El filtrado se concentra en secado para dar N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida. Trifluoroacetamida (136.7g, 1.21 mol), NaI (182.5g, 1.22 mol), tamices moleculares de 4A (342 g), y K_2CO_3 (170.9g, 1.24 mol) se añaden a una solución de N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (341g, 494.54 mmol) en DMSO (525 ml) y 1,4-dioxano (1.025 L). Trans-N,N'-dimetilciclohexano (81.6 g, 573.66 mmol) y yoduro de cobre (27.3 g, 143.34 mmol) en DMSO (500 ml) se añaden a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó durante 5 minutos. La mezcla se calienta a 100°C y se agitó durante 8 horas y se enfrió a 24°C. Se añaden agua (5.9 L) y DCM (5.9L), la mezcla se filtra, y se separan las capas. La capa orgánica se lavó con agua (5.9L) para obtener el compuesto del título en una solución de DCM, que se usa sin purificación adicional.

Preparación 17

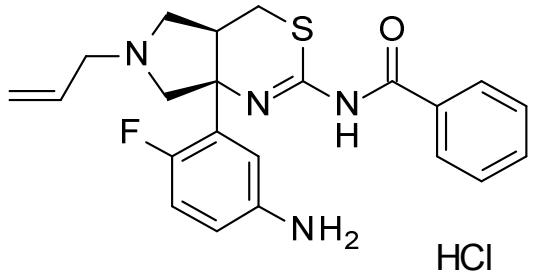
Relativo-N-[(4aR,7aS)-7a-5-(Acetamido)-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



THF (30 ml) se añade a Relativo-N-[3-[(3S,4R)-3-amino-1-(5-fluoropirimidin-2-il)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il]-4-fluoro-fenil]acetamida (4.1g, 11.0 mmol). La mezcla se enfrió en un baño de hielo a 0°C e isotiocianato de benzoilo (1.50 ml, 11.0 mmol). A continuación se deja calentar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. 1,1'-carbonildiimidazol se añade (1.9 g, 11.0 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se calienta luego a 55°C y se agitó un adicional de 18 horas. Se añade agua (50 ml) y la mezcla se extrae con EtOAc (50 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc adicional (25 ml) y se concentró en seco. El residuo bruto se purifica por cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice eluyendo con 50% EtOAc en DCM, seguido de 100% EtOAc. Las fracciones apropiadas se concentraron y se secaron a vacío para dar el compuesto del título como una mezcla racémica cis (1.33 g, 26%). ES/MS (m/z): 509(M+H).

Preparación 18

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

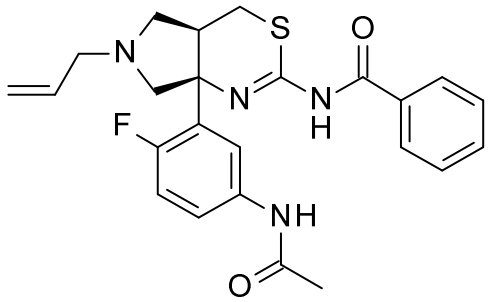


NaOH (28.7 g) y agua (2.7 L) se añadió a una solución de DCM de N-[(4aR,7aS)-6-alil-7a-[2-fluoro-5-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]fenil]-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (250 g, 494.4 mmol) y la mezcla se agita a 24 ° C durante 68 horas. El HCl a 1N (3.5 L) se añade para obtener un pH de 1-3. Las capas se separaron y la capa acuosa se lava con DCM (680 ml). DCM (4L) se añade a la fase acuosa seguida de hidróxido de amonio 21% para obtener un pH de 8-10. Las capas se separaron y los extractos orgánicos se combinan, se filtró a través de gel de sílice (170 g) y se lavó con DCM (1.4 L). El disolvente se concentra a sequedad y se diluyó con EtOAc (4L). El HCl a 1N en EtOAc (700 ml) se añade a una temperatura por debajo de 25°C y la mezcla se agitó durante 1 hora. La mezcla se concentra a unos 7-8 volúmenes y EtOAc (2.8 L) se agrega. El precipitado resultante se filtró y

lavó con EtOAc (400 ml). El sólido se secó para dar el compuesto del título (246 g, 52%).

Preparación 19

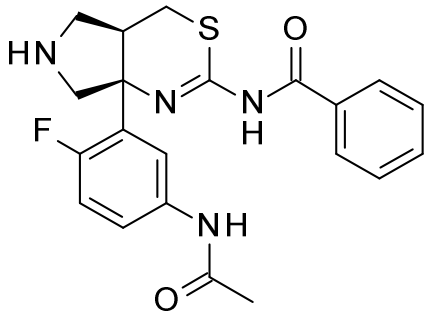
N-((4aR,7aS)-7a-(5-Acetamido-2-fluoro-fenil)-6-alil-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida



El anhídrido acético (23.5 g, 0.23 mol) se añade a una solución de N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida, hidroclururo (100g, 0.153 mol) y trietilamina (54.3 g, 0.535 mol) en DCM (800 ml). Después de agitar durante 1 hora a 20 - 25°C, se añaden $NaHCO_3$ saturado (700 ml) y agua (600 ml). Las capas se separan para dar el compuesto del título, que se usó sin purificación adicional como una solución en DCM.

Preparación 20

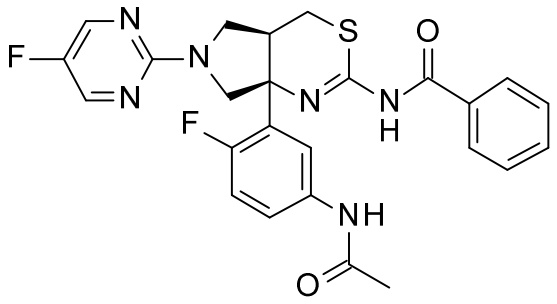
N-((4aR,7aS)-7a-(5-Acetamido-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida



Trifenilfosfina (4.0 g, 0.015 mol) y 1,3-dimetilbarbitúrico ácido (15.2 g, 0.097 mol) se añadió a una solución de DCM N-((4aR,7aS)-7a-(5-acetamido-2-fluoro-fenil)-6-alil-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (0.153 mol). Se añade acetato de paladio (1.7 g, 7.7 mmol) y la mezcla se agita de 20 a 30 ° C durante 1 hora. Se añade 25% de hidróxido de amonio y las capas se separan. La capa orgánica se lava con HOAc (3.0 equiv en 500 ml de agua) y se ajusta el pH a 8-9 con 25% de hidróxido de amonio. La capa acuosa se extrajo con DCM (2 x 500 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se concentraron a 3-4 volúmenes. Se añade MTBE (1 L) y la mezcla se filtra. La mezcla se concentra y se añade heptano (1 L). El sólido resultante se filtra, se recogió y se secó para dar el compuesto del título (48g, 76%). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.15(s, 3H), 2.87-2.83(m, 1H), 3.43-3.23(m, 5H), 3.70-3.67(m, 1H), 7.12-7.7(m, 1H), 7.28-7.27(m, 1H), 7.52-7.41(m, 4H), 7.79(m, 1H), 8.18-8.16(m, 2H), ES/MS (m/z): 413.1 (M+H).

Preparación 21

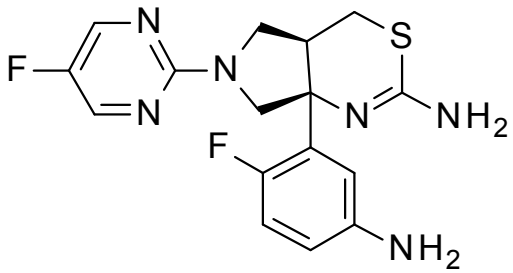
N-((4aR,7aS)-7a-(5-Acetamido-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida



2-cloro-5-fluoropirimidina (28.9 g, 218 mmol) y carbonato de potasio (33.46 g, 242.1 mmol) se añadió a una solución de N-((4aR,7aS)-7a-(5-acetamido-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (50g, 121.22 mmol) en DMF (100 ml). La mezcla se calentó a 80-85°C durante 8 horas. La mezcla se enfría a 24°C, se filtró, y se lavó con DMF (100 ml). Los sólidos se suspendieron en agua (2 L) y se filtró para obtener el compuesto del título (68.5g, 98%). LC-MS: m/z= 509.2 $(M+H)^+$, ^1H NMR (400 MHz, d_6-DMSO) δ ppm 1.22 (t, *J*= 7.28Hz, 2 H) 1.92-2.07(m, 6 H) 2.89-3.20(m, 2 H) 3.36-3.44(m, 1 H) 3.67(t, *J*= 9.54Hz, 1 H) 3.84 (br. s., 1 H) 4.16(br s., 2H) 7.23(br. s., 2 H) 7.35-7.61(m, 8H) 7.77(br. s., 2H) 7.85-8.18(m, 4H) 8.48 (s, 4H) 10.15(br. s., 1H) 10.46-10.59(m, 1H).

Preparación 22

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



Hidróxido de litio (8.6 g, 204.9 mmol) se añadió a una solución de N-((4aR,7aS)-7a-(5-acetamido-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (80g, 157.3 mmol) en metanol (400 ml). La mezcla se calienta a 60-70°C durante 4 horas. El HCl concentrado (132 g) se añade y la mezcla se agita a 55°C durante 18 horas. La mezcla se enfría a 30°C y se concentra para eliminar el metanol. Se añade agua y la capa acuosa se extrae con DCM (3×) para obtener el compuesto del título como una solución acuosa de 920g de los cuales 5.6% de la masa total es el compuesto del título que se usó sin purificación adicional.

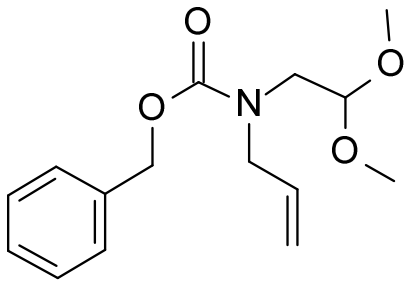
Preparación alternativa 22

El ácido sulfúrico (33.4 ml, 626.6 mmol) se añadió a una solución de (4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-

d][1,3]tiazin-2-amina (45.8 g, 125.3 mmol) en TFA (626 ml). La mezcla se enfrió a 0°C y se agitó durante 20 minutos. El ácido nítrico fumante (6.2ml, 144.1 mmol) se añade y la mezcla de reacción se calienta a 22°C y se agitó a durante 3 horas. La mezcla de reacción se evapora y se añade MTBE (250 ml) y se evapora dos veces. El residuo se seca bajo vacío hasta un peso constante y luego se disuelve en agua (147 ml) y etanol (885 ml) y se desgasifica con burbujeo de nitrógeno durante 15 minutos. La solución se transfiere a un reactor de presión y se añade 10% Pd/C tipo de pasta de 87L (6.6 g, 6.27 mmol). La mezcla se diluyó con etanol adicional (700 ml) y se presuriza con hidrógeno a 80 psi durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtra y luego una segunda carga de catalizador se añade de 10% Pd/C tipo de pasta de 87L (6.6 g, 6.27 mmol) y la mezcla se presuriza a 80 psi y se agitó durante 3 días en el reactor a presión. La mezcla de reacción se purga con nitrógeno y se filtró sobre tierra de diatomeas. El filtrado se evapora y el residuo se repartió entre agua (200 ml) y EtOAc (200 ml). La capa acuosa se separa, se enfrió a 5°C, y se neutralizó con hidróxido de amonio 15% p/p. La capa acuosa se extrae con EtOAc (3 × 150 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a presión reducida para dar el compuesto del título como sólido marrón claro (47.7 g, 99% que contenía EtOAc residual). ES/MS (m/z): 363(M+H).

Preparación 23

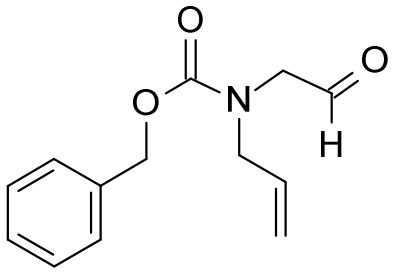
N-alil-N-(2,2-dimetoxietil)carbamato de bencilo



Una solución de bencil N-(2,2-dimetoxietil)carbamato (50g, 208.9 mmol) en tolueno (180 ml) se trata con hidróxido de potasio sólido (51.6g, 919.69 mmol) bajo nitrógeno. Después de 10 minutos, se añadió cloruro de benciltrietilamonio (0.8g, 3.1 mmol). Después de otros 10 minutos se añade una solución de bromuro de alilo (33g, 272.8 mmol) en tolueno (50 ml) gota por gota durante 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 48 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó con agua. La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró en seco para dar el compuesto del título (44g, 75%). ES/MS (m/z): 280(M+H).

Preparación 24

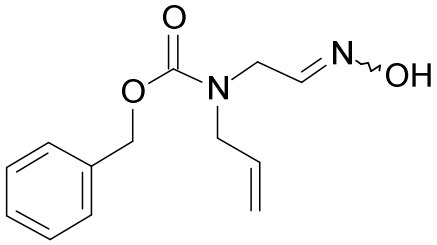
N-alil-N-(2-oxoetil)carbamato de bencilo



Una solución de bencilo N-alil-N-(2,2-dimetoxietil)carbamato (30g, 107 mmol) en ácido fórmico (36.8 ml, 860 mmol) y agua (4.84 ml) se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró y se diluyó con hexanos/EtOAc (1:2) y agua. La capa orgánica se separó, se lavó con solución de salmuera hasta pH= 6, y se secó sobre sulfato de sodio. El disolvente se evaporó para dar el compuesto del título (25g, 99%). ES/MS (m/z): 234(M+H).

Preparación 25

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

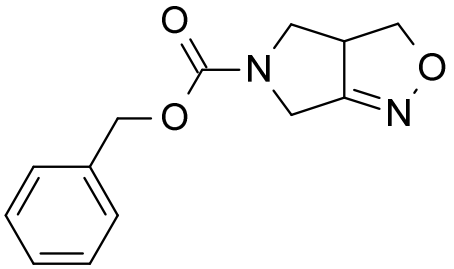


Una solución de bencilo N-alil-N-(2-oxoetil)carbamato de metilo (25g, 107 mmol) en ACN (150 ml) se trata con clorhidrato de hidroxilamina (9.68g, 139 mmol) y una solución de trihidrato de acetato de sodio (16g, 117.9 mmol) en agua (75 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente

durante la noche. El ACN se evapora y la solución acuosa se extrae con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de magnesio, y se concentró a vacío para dar el compuesto del título (24g, 90%). ES/MS (m/e): 249(M + H).

Preparación 26

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

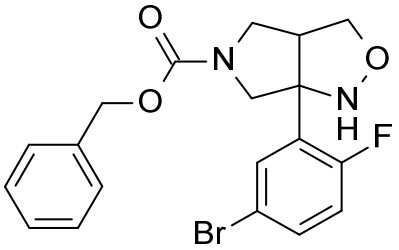


Una solución de bencilo N-alil-N-[2-hidroxiiminoetil]carbamato de metilo (24g, 96.6 mmol) en DCM (338 ml) se trata gota a gota durante 10 minutos con un 5% p/p solución acuosa de hipoclorito de sodio (106.08 mmol, 143.06 ml). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se inactivó con una solución acuosa al 40% de bisulfito de sodio (7g). La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de magnesio, y se concentró a vacío. El producto bruto se purificó sobre gel de sílice eluyendo con 5% EtOAc en hexanos para dar el compuesto del título (18g, 75%). ES/MS (m/z): 247(M+H).

Preparación 27

(5-bromo-2-fluoro-fenil)bencil 6A-3,3a,4,6-

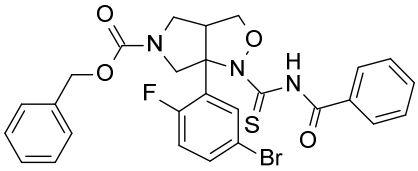
tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de metilo



Se añade una solución de hexanos a 1.6M de n-butil litio (25.4 ml, 40.6 mmol) gota a gota a una solución de -78°C de 4-bromo-1-fluoro-2-yodobenceno (12.22g, 40.6 mmol) en THF (60 ml) para dar una solución amarilla que se agitó a -78 ° C durante 15 minutos. El boro eterato de trifluoruro (5.14 ml, 40.6 mmol) se añade a una separada solución a -78°C de 3,3a bencilo, 4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de etilo (5g, 20.3 mmol) en THF (60 ml) y la mezcla se agita a -78°C durante 5 minutos. Esta solución se añade a la mezcla de organolitio a -78°C previamente preparada mediante una cánula. La mezcla combinada se agitó durante 30 minutos a -78 ° C. La mezcla se inactivó con cloruro de amonio acuoso saturado y se calentó a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 ×) y los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El producto bruto se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 35 minutos de 5% a 100% de EtOAc de hexanos para dar el compuesto del título (2.27g, 27%). ES/MS (m/z): (^{79}Br/^{81}Br) 421/423(M+H).

Preparación 28

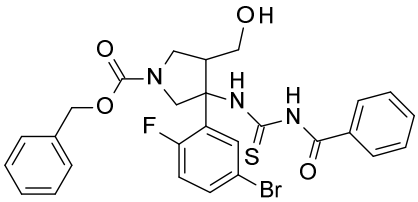
1-(benzoilcarbamatiol)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo



Se añade isotiocianato de benzoilo (2.87 ml, 21.28 mmol) gota a gota a una solución de 6A-bencil (5-bromo-2-fluoro-fenil) 3,3a, 4,6-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de metilo (5.977g, 14.2 mmol) en THF (95 ml) y se agitó durante la noche bajo nitrógeno. El disolvente se eliminó a vacío. El producto bruto se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 30 minutos de 5% a 100% de EtOAc de hexanos para dar el compuesto del título (6.05g, 73%). ES/ MS (m/z): (^{79}Br/^{81}Br) 584/586 (M+H).

Preparación 29

Bencil 3-(benzoilcarbamatiolamino)-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de metilo

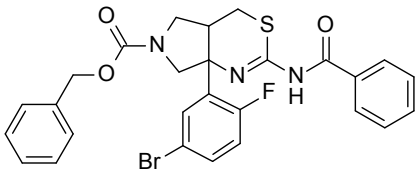


Una mezcla de bencilo 1-(benzoilcarbamatiol)-6a-(5-

bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato (6.05g 10.4 mmol) y zinc (polvo, <10 micras) (6.77g, 103.5 mmol) se agita en HOAc (52 ml) a temperatura ambiente durante la noche bajo nitrógeno. La reacción se diluye con EtOAc y se filtró a través de tierra de diatomeas. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se diluye con EtOAc, agua y bicarbonato de sodio acuoso saturado. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 ×), las capas orgánicas combinadas se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El producto bruto se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 30 minutos de 5% a 100% de EtOAc de hexanos para dar el compuesto del título (5.222 g, 86%). ES/MS (m/z): (^{79}Br/^{81}Br) 586/588(M+H).

Preparación 30

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

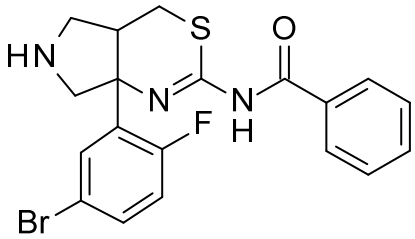


1,1'-carbonildiimidazol (2.87g, 17.7 mmol) se añadió a una solución de bencilo 3-(benzoilcarbamatiolamina)-3-(2-fluoro-fenil-5-bromo)-4-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de metilo (5.198g, 8.86 mmol) en THF (52 ml). La mezcla se agitó durante 1.5 horas a temperatura ambiente y después la reacción se calienta a reflujo durante la noche bajo

nitrógeno. La reacción se enfrió, se diluyó con agua, y se extrajo con EtOAc (3 ×). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El producto bruto se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 30 minutos de 5% a 100% de EtOAc de hexanos para dar el compuesto del título (2.93g, 58%). ES/MS (m/z): (^{79}Br/^{81}Br). 568/570(M+H)

Preparación 31

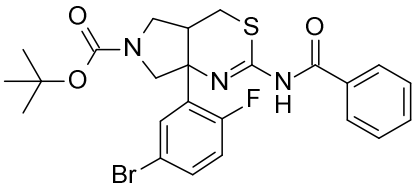
N-[7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Yodotrimetilsilano (2.21 mL, 15.46 mmol) se añadió gota a gota a una solución a temperatura ambiente de 2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-6-carboxilato de bencilo (2.93g, 5.15 mmol) en ACN (44 mL. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante dos horas y el disolvente se eliminó a vacío. El producto bruto se purifica con una columna SCX usando DCM 3:1: metanol y luego DCM 2:1: a 7N de amoníaco en metanol para dar el compuesto del título (2.098g, 94%). ES/MS (m/z): (^{79}Br/^{81}Br) 434/436(M+H).

Preparación 32

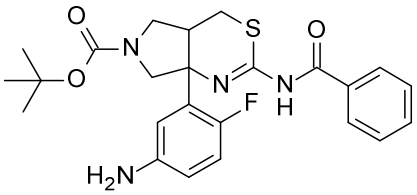
o 2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-6-carboxilato de terc-butil



Di-t-butilo (1.16g, 5.31 mmol) y trietilamina (1.01 ml, 7.25 mmol) se añaden a una solución de N-[7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (2.098g, 4.83 mmol) en DCM (48 ml). La reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. El disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 30 minutos de 5% a 100% de EtOAc de hexanos para dar el compuesto del título (2.556g, 99%). ES/MS (m/z): (79Br/81Br) 534/536(M+H).

Preparación 33

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

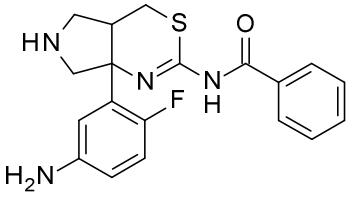


Una solución 2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de terc-butilo (2.556g, 4.8 mmol) y trans-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexanodiamina (150 mg, 1.1 mmol) en etanol (50 ml) se trata con azida de sodio (933mg, 14.3 mmol). Se añaden una solución acuosa de sal sódica del ácido L-ascórbico (0.66 M, 3.2 ml, 2.1 mmol) y agua (1 ml) y la parte superior del matraz se purga con nitrógeno. La mezcla se trata con una solución acuosa de cobre (II) pentahidrato de sulfato (0.33M, 3.2 ml, 1.1 mmol) y la mezcla se calienta inmediatamente sobre una placa caliente precalentado a 80°C durante 1.5 horas bajo nitrógeno. Una mezcla homogénea se obtiene después del calentamiento. La reacción se enfrió, se diluyó con agua con hielo, y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 ×). Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y el disolvente se eliminó a vacío para dar el producto azida bruta. El producto azida bruta se combina con 10% de paladio sobre carbono (1 g) en etanol frío (150 ml) y la mezcla se purga usando vacío/nitrógeno y, a continuación de vacío/hidrógeno. La mezcla se agita a temperatura ambiente bajo 30 psi de hidrógeno durante 5 horas. La reacción se ventila,

se filtró a través de tierra de diatomeas, y la torta del filtro se enjuagó con DCM. El disolvente se eliminó del filtrado a vacío y el producto bruto se purifica sobre gel de sílice con 50% de EtOAc en DCM para dar el compuesto del título (2.014g, 89%). ES/MS (m/z): 471(M+H).

Preparación 34

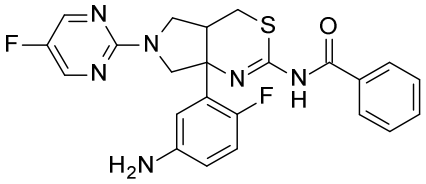
N-[7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



TFA (10 ml) se añade a una solución de 7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de terc-butilo (2.013 g, 4.28 mmol) en DCM (30 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 4 horas. El disolvente se eliminó a vacío y el producto bruto se purifica con una columna SCX usando DCM a 3:1: metanol y luego DCM a 2:1: a 7N de amoníaco en metanol para dar el compuesto del título (1.555g, 98%). ES/MS (m/z): 371(M+H).

Preparación 35

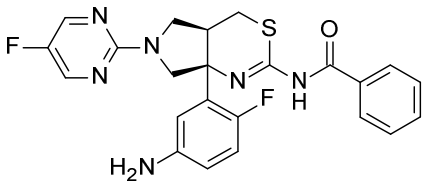
Racémica N-[7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



Una solución de N-[7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (705mg, 1.90 mmol), 5-fluoro-2-cloropirimidina (1.01g, 7.61 mmol), y DIPEA (1.66 ml, 9.52 mmol) se calientan en 1,4-dioxano (20 ml) a reflujo durante 4 horas bajo nitrógeno. La reacción se enfrió, se diluyó con agua, y se extrajo con EtOAc (3 ×). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y el disolvente se eliminó a vacío para dar el producto bruto. El producto bruto se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 25 minutos de 5% a 100% de EtOAc de hexanos para dar el compuesto del título (590mg, 66%). ES/MS (m/z): 467(M+H).

Preparación 36

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

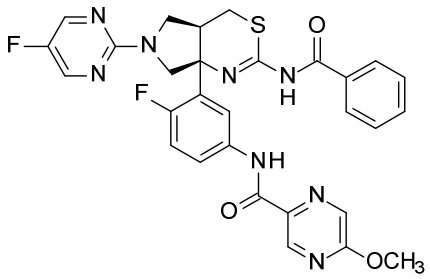


Racémica N-[7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-

d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (1.694g, 3.63 mmol) se purifica por HPLC quiral (Columna: Quiralcel OJ, 8 x 35 cm; eluyente: 90% de metanol (0.2% dimetiletilamina) y 10% de ACN; flujo de 400 ml/min a 280 nm de UV). Análisis del primer isómero de elución (Columna: Quiralcel OJ-H 0,46 x 15 cm; eluyente: 10:90 ACN: metanol (con 0.2% dimetiletilamina); flujo: 0.6 ml/min a 280 nm de UV) confirma el enantiómero enriquecido (99 % ee) enantioméricamente con R_t = 6.70 minutos, (723 mg, 43%). ES/MS (m/z): 467(M+H).

Preparación 37

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

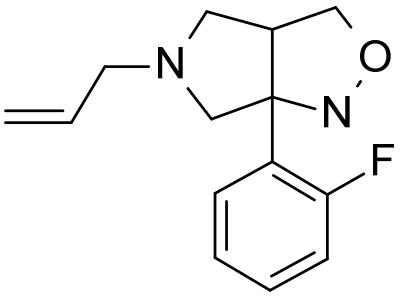


N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida, isómero 1 (0.361g, 0.77 mmol) se disuelve en una mezcla de DCM (4ml) y DMF (0.5 ml). El ácido 5-metoxipirazina-2-carboxílico (240mg, 1.55 mmol), HOBT (210mg, 1.55 mmol) y EDCI (300mg, 1.55 mmol) se añaden a la mezcla y la mezcla se agitó durante la noche a

temperatura ambiente. La solución de reacción se añade directamente en una columna de carga de gel de sílice de 12g y se purificó usando una columna de gel de sílice de 40g y eluyendo con un gradiente de 0-100% de EtOAc/hexanos. El producto se disolvió en EtOAc (200 ml), se lavó con NaOH a 1N (2 x 50 ml), y con salmuera (1 x 50 ml). La purificación de gel de sílice se repite como se describió anteriormente para dar el compuesto del título (350 mg, 74%). ES/MS (m/z):603(M+H).

Preparación 38

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

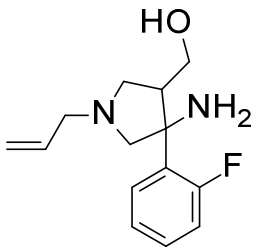


Etapa de reacción química de flujo: Un reactor sin fisuras 343 ml de acero inoxidable tubular (OD= 1/8 pulgada) se coloca dentro de un horno de GC y se lava abundantemente con tolueno a 20 mL/min durante 20 minutos. Aplica la contrapresión de nitrógeno (720 psig) y ajuste la temperatura del GC a 210°C. Después de que la temperatura haya alcanzado 210°C, una solución de 2-(dialilamino)-1-(2-

fluorofenil)etanona oxima (480.51 g, 1.74 mol) en tolueno (5.81 L) se bombea a través del reactor a 22.866 mL/min utilizando un par de bombas de jeringa de alta presión que trabaja en modo continuo para dar un tiempo de residencia de 15 minutos. Después de que se consumió toda la solución madre del reactor se lava con tolueno a 22.866 mL/min durante 30 minutos. La temperatura del horno GC se establece en 25°C y la solución completa se recoge y se concentró a vacío. El disolvente se evapora y el residuo de disolvió en DCM (2.5L) y agua (5L). El pH se ajustó a 1 con HCl y la capa acuosa se separa y se neutraliza con NaOH para ajustar el pH a 10. La capa acuosa se extrae con MTBE (3 x 2.5L). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se evaporaron en seco para dar el compuesto bruto del título (248g, 47%) que se usó sin purificación adicional. ES/MS (m/z): 249(M+H).

Preparación 39

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

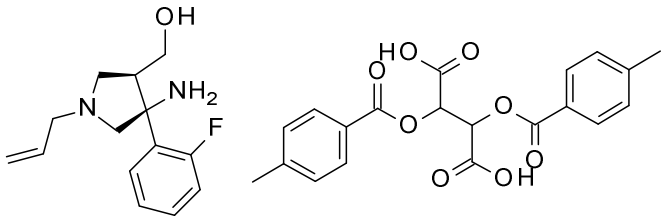


Polvo de zinc (590g, 9 mol) se añade a una solución

de 5-alil-6A (2-fluorofenil) 3,3a, 4,6-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol (3559g, 1.29 mol) en una mezcla de metanol (2.85 L) y cloruro de amonio solución acuosa saturada (3.56 L) y mezcla se calienta durante 16 horas a 70°C. La reacción se enfrió a 60°C, se diluyó con THF (2.85 L), y se filtró mientras estaba caliente sobre tierra de diatomeas. El filtrado se evapora para eliminar el disolvente orgánico, y la mezcla acuosa se diluye con ácido cítrico al 10% p/p solución acuosa (4L) y EtOAc (3.5L). La capa orgánica se separa y la capa acuosa se lava con EtOAc (2 × 2 L). La capa acuosa se neutraliza con NaOH 50% p/p para ajustar el pH a 10, y luego se extrae con EtOAc (2 × 1.5L). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se evaporaron a sequedad para dar el compuesto del título bruto (299g, 92%). ES/MS (m/z): 251 (M+H).

Preparación 40

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

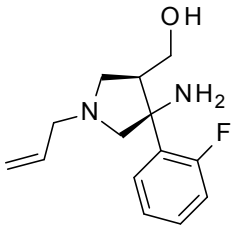


Una solución de di-p-toluoil-L-tartárico (348.6 g, 884 mmol) en 1-metoxi-2-propanol (1.13 L) se añade a una

solución de [(3R,4S)-1-alil-4amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol (225.9 g, 902 mmol), en 1-metoxi-2-propanol (1.13L) previamente calentada a 40°C. La reacción se enfría a 22°C y se agitó durante 18 horas. Un sólido blanco se recoge por filtración y se lava con 1-metoxi-2-propanol (600 ml). El sólido recogido se secó para dar el compuesto del título (183.01 g, 31.8%). ES/MS (m/z): 251(M+H).

Preparación 41

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

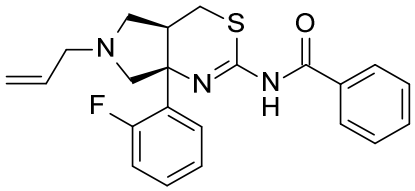


[(3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol; ácido 2,3-bis[(4-metilbenzoilo)oxi]butandioico (211g, 331 mmol) se disuelve en agua (2.1 L) y EtOAc (2.3 L). HCl 35% p/p se añade para ajustar el pH a 1. La capa acuosa se separa y se ajustó el pH a 10 con NaOH 50% p/p y se extrajo con EtOAc (2 ×). El pH de la capa acuosa se ajusta a 10 con NaOH acuoso, y se extrajo con MTBE (3 x), mientras que también se mantiene el pH de la solución acuosa a pH= 10. Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró en

seco para dar el compuesto del título bruto, (73g, 88%, 94.8% ee). El producto se analiza por cromatografía quiral: Columna AS-H, eluyente 10% de alcohol isopropílico, 2% de amina isopropilo; velocidad de flujo de 3 ml/min a 220 de UV; presión de 100 bar a 35°C para dar el compuesto del título como el segundo isómero eluyente, R_f= 2.26 minutos. ES/MS (m/z): 251(M+H).

Preparación 42

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

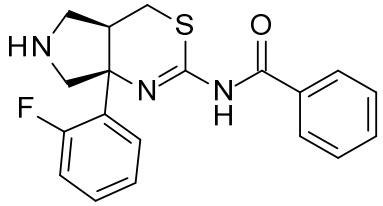


Una solución de [(3R,4S)-1-alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol (129.7g, 414 mmol) en THF (2.3L) se enfría a 0°C bajo una atmósfera de nitrógeno. El isotiocianato de benzoilo (61.5 ml, 456 mmol) se añade manteniendo la temperatura por debajo de 5°C. La reacción se calentó a temperatura ambiente durante 3 horas y se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (87.4 g, 538.9 mmol) y la reacción se agitó a 22°C durante 1 hora seguido de calentamiento a 70°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfría a 22°C y el disolvente se evapora. El residuo se reparte en EtOAc (1L) y agua (1L). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se

extrae con EtOAc (2 × 400 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se evaporaron en seco para dar el compuesto del título en bruto. El producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de EtOAc/DCM 0-40% DCM para dar el compuesto del título como sólido amarillo pálido (170g, 99%) que contiene disolvente residual. ES/MS (m/z): 396(M+H).

Preparación 43

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

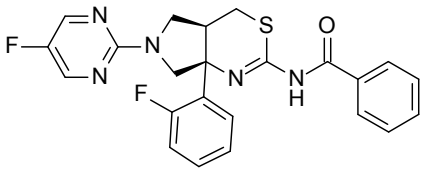


Ácido benzoico, 2-mercapto (122g, 793 mmol), bis (dibencilidenacetona) paladio (4.15g, 7.21 mmol), y 1,4-bis (difenilfosfino) butano (3.14g, 7.21 mmol) se añaden a una solución de N-[(4aR,7aS)-6-alil-7a-(2-fluorofenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (178.21g, 360 mmol) en anhidro 2-metiltetrahidrofurano (1.96 L) bajo una atmósfera de nitrógeno. La solución se desgasifica mediante vacío/ciclos de nitrógeno tres veces, y luego se burbujea nitrógeno a través de la reacción durante 15 minutos. La mezcla de reacción se calienta a 40°C mientras se burbujeaba nitrógeno a través de la reacción. Cuando reacción alcanza 40°C se

elimina el burbujeo y la mezcla de reacción se agita a 40°C durante 3 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción se enfría a 22°C y se diluyó con agua (2L). Se añade una solución de HCl (a 5M) para ajustar el pH a 1. La capa acuosa se separó y se lavó con EtOAc adicional (2 x 800 ml). El pH de la capa acuosa se ajusta a 10 con NaOH 50% p/p y luego se extrae con EtOAc (10L). La capa acuosa se lavó con EtOAc adicional (2 x 750ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se evaporaron a sequedad para dar el compuesto del título bruto en forma de sólido amarillo pálido (124.7g, 97%). ES/MS (m/z): 356(M+H).

Preparación 44

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

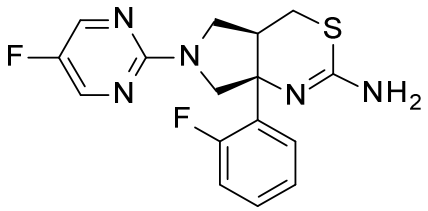


Una solución de N - [(4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il benzamida (124,7 g, 256 mmol), DIPEA (67 ml), 5-fluoro-2-cloropirimidina (29.3 ml, 307 mmol) en N-metilpirrolidona (997ml) se calienta a 100°C durante 16 horas. La reacción se

enfría a 22°C y se vierte en agua enfriada a 10°C (10L) manteniendo la temperatura por debajo de 15°C. Un sólido crema pálido se recoge por filtración y se lavó con agua adicional. El sólido húmedo se disuelve en EtOAc (2L) y se transfiere a un embudo separador. Solución acuosa de cloruro de sodio al 5% p/p (1L) se añade y la capa orgánica se separa, se seca sobre sulfato de sodio, se filtra, y el filtrado se evapora bajo presión reducida. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de 0-40% de EtOAc/isohexano para dar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (116g, 70%). ES/MS (m/z): 452(M+H).

Preparación 45

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

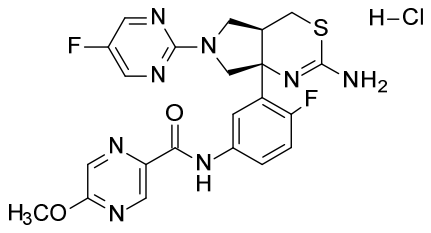


Hidróxido de litio (9.26g, 386 mmol) se añade a una mezcla de N-[(4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (158.6 g, 351.6 mmol), en metanol (1.6 L). La mezcla se calentó a 70°C durante 4 horas y después se enfrió a 22°C. La mezcla de reacción se evaporó a vacío hasta un residuo amarillo. El residuo se reparte en agua (1L)

y EtOAc (750 ml). Se añade HCl (5M solución acuosa) para ajustar el pH a 1. La capa acuosa se separó y la capa orgánica se lavó con EtOAc (2 x 200 ml). El pH de la capa acuosa se ajusta con NaOH 50% p/p solución acuosa a pH= 10 y se extrajo con EtOAc (3 × 1 L). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a presión reducida para dar el compuesto del título bruto como un sólido amarillo pálido (133.3g, 99%, que contiene 12% de EtOAc residual). ES/MS (m/z): 348(M+H).

Preparación 46

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



N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida, isómero 1 se disuelve (0.350g, 0.58 mmol) en THF (2ml) y se añaden a continuación metanol (4ml) y etanol (4ml). Clorhidrato de O-metilhidroxilamina (495 mg, 5.81 mmol) y piridina (470L, 5.81

mmol) se añaden a la mezcla y la reacción se calienta a 50°C y se agitó durante la noche. El gel de sílice (~10g) se añade a la reacción y la mezcla se concentra. La muestra, secada sobre gel de sílice, se cargó en un cartucho vacío y eluyente purificado con un 0-10% del gradiente de metanol de amoniaco a 7N en DCM. El producto se purifica por segunda vez en una columna SCX usando DCM 3:1: metanol y luego DCM 2:1: a 7 N de amoníaco en metanol. El producto se purifica por última vez sobre gel de sílice con un gradiente de 0% a 10% de metanol de amoniaco a 7N en DCM para dar la base libre del compuesto del título. Este material se disuelve en DCM (5ml) y el HCl a 1M en éter dietílico (0.20ml, 660mmol) se añade. El disolvente se eliminó a vacío para dar el compuesto del título (71mg, 23%). ES/MS (m/z): 498(M+H).

Difracción de Polvo de Rayos X (DRX)

Los patrones de XRD de los sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro de polvo de rayos X Bruker Endeavor D4, equipado con una fuente CuKa λ = 1.54060 Å) y un detector de Vantec, operando a 35 kV y 50 mA. La muestra se explora entre los 4 y 40° en 2θ, con un tamaño de paso de 0.009° en 2θ y una velocidad de barrido de 0.5 segundos/etapa, y con 0.6 mm de divergencia, 5.28 antidispersora fijo, y 9.5 mm ranuras del detector. El polvo seco se envasa en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. Los patrones de difracción de la

forma cristalina se recogen a temperatura ambiente y humedad relativa. Es bien conocido en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma cristalina dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida resultante de factores tales como la morfología cristalina y el hábito. Donde los efectos de orientación preferida están presentes, las intensidades de pico se alteran, pero las posiciones de los picos característicos del polimorfo se mantienen sin cambios. Véase, por ejemplo, La Farmacopedia de los Estados Unidos #23, Formulario Nacional #18, las páginas 1843-1844, 1995. Además, también es bien conocido en la técnica cristalográfica que para cualquier forma cristalina dada las posiciones de los picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, posiciones de los picos pueden desplazarse debido a una variación en la temperatura o humedad en la cual una muestra es analizada, el desplazamiento de la muestra, o la 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 obstaculizar la identificación inequívoca de la forma de cristal indicado. La confirmación de una forma cristalina puede hacerse en base a cualquier combinación única de distinguir picos (en unidades de °2θ), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de la forma cristalina, recogidos a temperatura ambiente y la humedad relativa, se

ajustan sobre la base en NIST 675 de picos estándar a 8.853 y 26.774 grados de 2-theta.

Preparación 47

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

Cloruro de oxalilo (888 µl, 10.2 mmol) se añadió a una solución de ácido 5-metoxipirazina-2-carboxílico (1.6g, 10.2 mmol) en ACN (53 ml) y DMF (848 µl). Después de 15 minutos, se añade la solución recién preparada a una solución de (4aR,7aS)-7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (2.65g, 7.3 mmol) en una mezcla de agua (53 mL) y etanol (53 mL) previamente calentado a 50°C. La mezcla de reacción se agita a 50°C durante una hora, se enfrió a 22°C, y después se agitó durante la noche a esta temperatura. El disolvente orgánico se evaporó a vacío y la mezcla acuosa se trata con NaOH 50% p/p en solución acuosa para ajustar el pH= 10. Una crema pálido sólido se aisló y se lavó con agua adicional. El sólido se diluye con alcohol isopropílico (2 ×) y el disolvente se evapora. El material en bruto se purifica por cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de metanol amoniado (a 2N)/DCM. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinan y el disolvente se evapora para dar el compuesto del

título como un sólido blanquecino (1.9g, 52%). ES/MS (m/z): 499(M+H).

Preparación Alternativa de la Forma Cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (hidratado)

El ACN (500 ml) se añade a DMF (19.2 ml, 248.9 mmol). El Cloruro de oxalilo (39.3 g, 309.63 mmol) seguido de 5-metoxipirazina-2-carboxílico (46.0g, 298.4 mmol) se añade a la solución de DMF/ACN. En un matraz separado, la solución acuosa de (4aR,7aS)-7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (56.8g, 156.75 mmol) se añade a ACN (500 mL) y el pH se ajusta a 9 con hidróxido de amonio (95 mL). Esta mezcla se calienta luego a 50-55 ° C. Se añade gota a gota la solución de cloruro de oxalilo y la mezcla se agitó durante 3 horas. El pH se ajusta a 8-9 con hidróxido de amonio. El precipitado resultante se filtra, se lava con agua y se secó para obtener el compuesto del título (123 g). El sólido se suspendió en acetona (250 mL) durante 1.5 horas y se filtró. La torta húmeda se lava con acetona para obtener el compuesto del título (110g con 90.5% de pureza por HPLC.). El THF (1L) y carbón activado (9g) se añaden al sólido y la mezcla se calienta a reflujo durante la noche. La mezcla se filtra a través de tierra de diatomeas y se lava con THF (150 mL). La solución

orgánica se concentra a 10 volúmenes y se calienta a 60°C. Se añade agua (430 mL) y la mezcla se agita a 60°C durante 8 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se agitó durante 10 horas. El sólido resultante se filtra, se lava con THF/agua (7:6) y se seca para dar el compuesto del título (69g, 88%) LC-MS: (m/z) 499 (M+H), pureza: 98,3%. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 2.99-3.07(m, 2H) 3.07-3.14(m, 1H) 3.58-3.67(m, 1H) 3.68-3.76(m, 1H) 3.76-3.84(m, 1H) 4.02(s, 3H) 4.07(d, *J*= 10.92 Hz, 1H) 6.08 (s, 2H) 7.19 (dd, *J*= 11.98, 8.72Hz, 1H) 7.78-7.89(m, 2H) 8,41(s, 1H) 8.44(s, 2H) 8.88 (s, 1H) 10.60(s, 1H).

Procedimiento general para la Preparación de la Forma 2 Cristalina N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (hidratado)

La suspensión N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida en THF aproximadamente a 23°C a una concentración de aproximadamente 71 mg/mL de disolvente. Se calienta la suspensión con agitación a la disolución que se produce en alrededor de 60°C a aproximadamente 63°C. Se añade agua a la solución caliente para proporcionar una THF: relación de disolvente de agua de aproximadamente 95: 5. Cristales de semilla de la Forma 2N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-

fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida se añaden (alrededor del 3% peso de la carga). La suspensión fina resultante se mantuvo aproximadamente a 60°C y aproximadamente a 63°C durante unos 20 minutos, seguido de la adición de aproximadamente 5.3 a aproximadamente 5.5 volúmenes de agua por encima de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 horas dando como resultado una THF: relación de disolvente de agua de aproximadamente 69:31. La suspensión se mantiene entonces a aproximadamente 60°C a aproximadamente 63°C durante unos 30 minutos y después se enfrió a aproximadamente 23°C durante aproximadamente 1 hora, y después se agitó durante aproximadamente 8-12 horas. La suspensión se filtra a continuación, se enjuaga con un poco de THF: agua (35:65), y se secó durante aproximadamente 8-12 horas a vacío reducido a aproximadamente 40°C para proporcionar la forma cristalina deseada de 2N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida del cual es hidratado.

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

(valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 a continuación. Específicamente, el patrón contiene un pico a 11.8° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste de 18.6°, 19.3°, y 26.7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0.2 grados.

Tabla 1: Picos de difracción del polvo de Rayos X de la Forma 2 cristalina.

Pico	Angulo (2-Theta °) +/- 0.2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	11.8	100.0
2	18.6	71.4
3	19.3	45.5
4	26.7	41.9
5	20.6	27.3
6	9.0	19.0
7	24.8	18.5
8	22.4	15.5
9	31.9	14.3
10	10.6	11.2

La forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida es la forma cristalina estable a temperatura ambiente y a humedad relativa mayor que aproximadamente 15%.

Preparación 48

Forma 3 cristalina N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-

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

Una bandeja de análisis termo gravimétrico se carga con N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida y se calienta a aproximadamente 170°C y se mantiene a 170°C durante aproximadamente 5 minutos. La mezcla se enfría a temperatura ambiente para proporcionar el compuesto del título.

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

N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (121 mg) se combina con ACN (5 mL) en un frasco, y se calienta en una placa de agitación a 90°C. Después de unos 30 minutos, la mayor parte del sólido se disuelve, proporcionando una solución turbia. Se añaden semillas 3 de Forma y la muestra se agita durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 90°C. El calentamiento se retira y la mezcla se agita para proporcionar un sólido de color blanco brillante. El sólido es aislado por filtración al vacío, se seca bajo una corriente de aire durante aproximadamente 10 minutos, y luego bajo vacío reducido a

aproximadamente 80°C durante aproximadamente 8 a 12 horas para proporcionar el compuesto del título.

Una muestra preparada de la forma 3 cristalina N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida se caracteriza por un patrón de XRD usando radiación CuKa como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 2 a continuación. Específicamente, el patrón contiene un pico a 15.7° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste de 18.1°, 27.0°, y 19.7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0.2 grados.

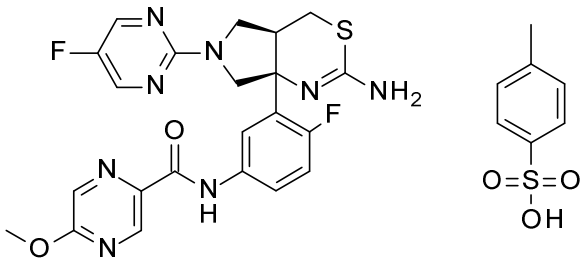
Tabla 2: Picos de difracción de polvo de Rayos X de la Forma 3 cristalina.

Pico	Angulo (2-Theta °) +/- 0.2°	Intensidad relativa ((% del pico más intenso)
1	15.7	100.0
2	18.1	98.5
3	27.0	80.2
4	19.7	75.4
5	25.3	75.2
6	18.7	50.0
7	17.3	49.7
8	5.2	44.0
9	10.4	41.7
10	11.9	37.7

Ejemplo 1

N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-

4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida; ácido toluensulfónico



La forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida hidratado (149.15 mg) se añadió a acetato de etilo (2mL). La muestra se agita a 1000 rpm a una temperatura de 80°C. Se añade ácido p-toluensulfónico (70 mg disueltos en acetato de etilo (1 mL)) a la solución en agitación, y se agitó durante la noche a 80°C para producir una suspensión de un sólido blanco que se aísla por filtración al vacío para proporcionar el compuesto del título.

Preparación A alternativa de N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida; ácido toluensulfónico

El N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (9.5 g, 19 mmol)

y se añaden ácido p-toluensulfónico (3.80 g, 19.8 mmol) a tetrahidrofurano (31 mL), agua (7.9 mL) y 2-propanol (8.6 mL). La solución se calienta a 40°C. A la solución caliente se añadió 2-propanol (200.0 mL) durante 3 horas aproximadamente. La mezcla es sembrada poco después del inicio de la adición de 2-propanol con una porción del compuesto del título (500 mg, 0.75 mmol). Después de que la adición de disolvente es completa, la mezcla se enfría a aproximadamente 20°C durante 1-3 horas. La mezcla se calienta a partir de aproximadamente 20°C a aproximadamente 55°C durante un tiempo objetivo de 2 horas. La temperatura se mantiene a 55°C durante 1 hora y después se enfría a aproximadamente 20°C durante aproximadamente 4 horas. La suspensión se agitó durante al menos 10 horas a aproximadamente 20°C. La suspensión se filtró y la torta húmeda se lavó con agua (57 mL). El producto se secó a vacío a 45°C durante al menos 10 horas para dar el compuesto del título (10.4g, 81%). ES/MS (m/z): 500(M+H).

Alternativa B de Preparación de N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida; ácido toluensulfónico

El N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida hidratado (20.7 g) se suspende en 170 rpm en 60:40 THF: H_2O (85 mL) en un matraz

de bola de 500 mL de cuello equipado con un burbujeador de nitrógeno, motor mecánico IKA®/agitador unido al eje del vidrio con un hoja de plátano de teflón, y un termopar conectado a un controlador J-KEM programable de temperatura. El ácido P-toluensulfónico monohidrato (7.6 g, 1.03 eq) se disuelve en una mezcla de 60:40 THF: H_2O (20mL) y la solución se añadió todo de una vez a la agitación N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida suspendida a 23°C, lo que lleva casi inmediatamente a una solución de tono rojizo claro. La velocidad de agitación se aumenta luego a 200 rpm como a más de 15 minutos, agua (22 mL) se añade a la solución, el cual es luego sembrado con N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida ácido toluensulfónico (750 mg, 3% en peso de carga de semillas) y se agita a 23°C durante otros 15 minutos. Alrededor de 6 horas, agua (226 mL, del disolvente total de 353 mL, o 13.6 vol., relación del disolvente final de 17.5:82.5 THF:H_2O) se añade a la suspensión, que luego se agitó durante la noche (22 horas) a 23°C . La suspensión se filtra a través de vacío, se enjuagó con THF 15:85: H_2O (2 × 20 mL), después a la izquierda en vacío durante 20 minutos, mientras que las grietas que se forman en la torta húmeda producto son cerradas presionando manualmente.

Los sólidos húmedos se secan a 40°C bajo vacío durante aproximadamente 72 horas para dar el compuesto del título como un sólido cristalino blanco (24.07 g, 90.0% en peso).

El N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida cristalino; ácido toluensulfónico se caracteriza por un patrón de XRD usando radiación CuKa como el que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 3 a continuación, y, en particular, que tiene picos en ángulo de difracción 2-theta de 5.0° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste de 19.6°, 13.8°, y 18.5°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0.2 grados.

Tabla 3: Picos de difracción de polvos de Rayos X del Ejemplo 1 cristalino

Pico	Angulo (2-Theta°) +/- 0.2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	5.0	100.0
2	13.4	22.9
3	13.8	37.3
4	14.4	20.2
5	15.3	28.8
6	17.5	25.9
7	18.5	30.7
8	19.6	45.8
9	20.4	17.7
10	25.6	30.1

Se ha encontrado que la humedad relativa por debajo del 15%, la forma 1 cristalina de la base libre de N-{3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil}-5-metoxipirazina-2-carboxamida está presente, mientras que por encima de aproximadamente 15% de humedad relativa, la forma 2 cristalina de N-{3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil}-5-metoxipirazina-2-carboxamida predomina. Tal inestabilidad física es indeseable, en particular para una sustancia farmacéutica o medicamento producto farmacéutico, ambos de los cuales están sujetos a controles reglamentarios con respecto a las formas en estado sólido. En contraste con las formas cristalinas de la base libre, la sal de tosilato posee mejorado la estabilidad física en una amplia gama de humedades relativas (5-95%). Como tal, la sal tosilato de N-{3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil}-5-metoxipirazina-2-carboxamida esencialmente evita las transformaciones de fase dependientes de humedad asociados con las formas cristalinas de base libre correspondiente. Además, la sal tosilato de N-{3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil}-5-metoxipirazina-2-carboxamida se encontró que tenía

una cantidad sustancialmente inferior de disolvente retenido en el cristal de alrededor de 1.3% en comparación con aproximadamente 7.7% de disolvente retenido para la sal de HCl de N-{3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(4H)-il]-4-fluoro-fenil}-5-metoxipirazina-2-carboxamida. El aumento de la probabilidad de la base libre al someterse a las transiciones de fase durante el almacenamiento a largo plazo puede dar lugar a la variabilidad en las propiedades, tales como la solubilidad o velocidad de disolución, lo que puede comprometer el rendimiento del producto farmacológico. También plantea el riesgo adicional de colapso de la(s) estructura(s) de cristal para una forma amorfa o acumulación de defectos y el trastorno, lo que podría conducir a la inestabilidad química y la reducción de la vida útil del producto farmacéutico.

En los procedimientos de ensayo in vitro:

Para la enzimática in vitro y ensayos celulares, los compuestos de ensayo se preparan en DMSO para formar una solución madre a 10 mM. La solución madre se diluye en serie en DMSO para obtener una curva de dilución de diez puntos con concentraciones de compuesto final que van a partir de 10 mM hasta 0.05 nM en una placa de fondo redondo de 96 pocillos antes de realizar la enzimática in vitro y ensayos de células enteras.

En los ensayos de inhibición de la proteasa *in vitro*:

Expresión de BACE1 humana

La BACE1 humana (número de acceso: AF190725) se clonó a partir del ADNc de cerebro total por RT-PCR. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a secuencias de aminoácidos #1 a 460 son insertados en el polipéptido IgG_1(Fc) humano que codifica el ADNc (Vasser, et al., Science, **286**, 735-741 (1999)). Esta proteína de fusión de BACE1 (desde 1 hasta 460) y Fc humana, llamada *hu*BACE1:Fc, se construye en el vector pJB02. La BACE1 humana (1-460): Fc (*hu*BACE1: Fc) se expresa de forma transitoria en células HEK293. Los 250 μg de ADNc de cada constructo se mezclan con Fugene 6 y se añade a 1 litro de células HEK293. Cuatro días después de la transfección, los medios acondicionados se cosechan para la purificación.

Purificación de *hu*BACE1: Fc.

huBACE1: Fc se purifica mediante cromatografía de proteína A. La enzima se almacenó a -80°C en pequeñas alícuotas.

Ensayo FRET BACE1

Las diluciones en serie de compuestos de ensayo se preparan como se ha descrito anteriormente. Los compuestos se diluyen 20 × en la memoria intermedia KH_2PO_4. Diez μL de cada dilución se añaden a cada pocillo en la fila A a H de una proteína baja correspondiente unida a la placa de color negro que contiene la mezcla de reacción (25μL de 50 mM KH_2PO_4, de pH 4.6, 1 mM Triton® X-100, 1 mg/mL Albúmina de Suero Bovino, y

15μM de sustrato de FRET) (véase Yang, et. al., J. Neuroquímica, 91 (6) 1249 a 1259 (2004)). El contenido se mezcla bien en un agitador de placas durante 10 minutos. Quince μL de doscientos pM BACE1 humana (1-460): Fc (Ver Vasser, et al., Science, 286, 735-741 (1999)) en el tampón KH_2PO_4 se añade a la placa que contiene compuestos de sustrato y de prueba para iniciar la reacción. La RFU de la mezcla en el tiempo 0 se registra en excitación de 355 nm de longitud de onda y la longitud de onda de emisión de 460 nm, después de un breve mezclado en un agitador de placas. La placa de reacción se cubrió con papel de aluminio y se mantuvo en un horno humidificado en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 a 24 h. La RFU al final de la incubación se registra con los mismos ajustes de excitación y emisión usados 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 el tratamiento con el compuesto. Las Diferencias RFU se representan gráficamente frente a la concentración del inhibidor y una curva está equipado con una ecuación logística de cuatro parámetros para obtener el EC_{50} y los valores de IC_{50}. (Ver Sinha, et al., Nature, **402**, 537-540 (2000)).

El compuesto de la Preparación 46 se ensaya esencialmente como se describe arriba y exhibió una BACE1 IC_{50} de 0.615 nM (± 0.101, n= 5) [medio ± SEM; SEM= error estándar del medio]. Estos datos demuestran que el compuesto de la

Preparación 46 inhibe la actividad de la enzima recombinante purificada BACE1 *in vitro*.

Ensayo neuronal primario PDAPP

Un ensayo de células enteras de confirmación también se ejecuta en cultivos primarios de neuronas generadas a partir de embriones de ratones transgénicos PDAPP. Las neuronas corticales primarias se preparan a partir de 16 Días Embrionarios PDAPP embriones y cultivados en placas de 96 pocillos (15 x 10^4 células/pocillo en DMEM/F12 (1:1) más 10% de FBS). Después de 2 días in vitro, los medios de cultivo se reemplaza con suero DMEM/F12 libre (1:1) suplemento que contiene B27 y 2 µM (finales) del Ara-C (Sigma, C1768). Al día 5 in vitro, las neuronas se incuban a 37°C durante 24 horas en presencia/ausencia de inhibidores (diluido en DMSO) a la concentración deseada. Al final de la incubación, se analizaron los medios condicionados para la evidencia de la actividad de beta-secretasa, por ejemplo, mediante el análisis de péptidos Abeta. Total de péptidos Abeta (Abeta 1-x) se miden por un intercalador ELISA, utilizando el monoclonal 266 como anticuerpo de captura y 3D6 biotinilado como anticuerpo de informes. Alternativamente, Abeta 1-40 y 1-42 péptidos Abeta se miden por un intercalador ELISA, utilizando un monoclonal 2G3 como anticuerpo de captura para Abeta 1-40, y monoclonal 21F12 como anticuerpo de captura para Abeta 1-42. Ambos de ELISA Abeta 1-40 y Abeta 1-42 utilizan biotinilado 3D6 como el

anticuerpo de informes. La concentración de Abeta liberado en el medio acondicionado después del tratamiento compuesto corresponde a la actividad de BACE1 bajo tales condiciones. La curva de inhibición de 10 puntos se traza y equipado con la ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores de la CE_{50} y de IC_{50} para el efecto reductor de Abeta. El compuesto de la Preparación 46 se ensaya esencialmente como se describe anteriormente y exhibe la siguiente actividad para efecto reductor Abeta:

Tabla 4

Preparación	PDAPP Neuron A-beta (1-40) ELISA IC_{50} (nM)	PDAPP Neuron A-beta (1-42) ELISA IC_{50} (nM)
46	0.275 ($\pm$ 0.176, n=4)	0.228 ($\pm$ 0.244, n=3)

medio $\pm$ SEM; SEM= error estándar del medio

Esos datos demuestran que el compuesto de Preparación 46 inhibe la producción Abeta en las células en enteras.

Inhibición *in vivo* de beta-secretasa

Varios modelos de animales, incluyendo ratón, cobaya, perro, y mono, se pueden usar para la detección de la inhibición de la actividad de beta-secretasa in vivo después de tratamiento con compuesto. Los animales utilizados en esta invención pueden ser de tipo salvaje, transgénicos, o de los animales de genes agénicos. Por ejemplo, el modelo de ratón

PDAPP, preparado como se describe en Games et al., Nature **373**, 523-527 (1995), y otros animales agénicos no transgénico o del gen son útiles para analizar la inhibición in vivo de producción Abeta y sAPPbeta en presencia de compuestos inhibidores. En general, de 2 a 12 meses de edad ratones PDAPP, los ratones agénicos de genes o animales no transgénicos se administran compuesto formulado en vehículos, tales como aceite de maíz, ciclodextrano, tampones de fosfato, PHARMASOLVE®, u otros vehículos adecuados. Una de las veinticuatro horas siguientes a la administración del compuesto, los animales son sacrificados, y el cerebro, así como el líquido cefalorraquídeo y el plasma se eliminan para el análisis de fragmentos Abetas, C99, con PF. (Véase May, et al., Journal of Neuroscience, 31, desde 16507-16516 (2011)).

Para los estudios estándares de farmacología in vivo, los animales se dosifican con varias concentraciones de compuesto y se compararon con un grupo control tratado con vehículo dosificado al mismo tiempo. Para algunos estudios del curso de tiempo, el tejido cerebral, plasma, líquido cefalorraquídeo o se obtiene de los animales seleccionados, comenzando en el tiempo 0 para establecer una línea de base. Compuesto o vehículo apropiado se administra a otros grupos y se sacrificaron en diversos momentos después de la dosificación. El tejido cerebral, plasma, líquido cefalorraquídeo o se obtiene de los animales seleccionados y

se analizaron para la presencia de productos de escisión de APP, incluyendo péptidos Abeta, sAPPbeta, y otros fragmentos de APP, por ejemplo, mediante ensayos ELISA específicos de intercalación. Al final del período de ensayo, los animales son sacrificados y los tejidos del cerebro, plasma o líquido cefalorraquídeo se analizan para la presencia de péptidos Abeta, C99, y sAPPbeta, según corresponda. Los tejidos cerebrales de APP animales transgénicos también pueden ser analizados por la cantidad de placas de beta-amiloide siguientes tratamiento con compuesto. “Abeta 1-x péptido” como se usa aquí, se refiere a la suma de las especies de Abeta que empiezan con el resto 1 y que termina con un extremo C-terminal mayor que 28. Este residuo detecta la mayoría de las especies de Abeta y, a menudo se llama “Abeta Total”.

Animales (PDAPP o de otro ratones transgénicos o no transgénicos APP) administrados un compuesto inhibidor puede demostrar la reducción de Abeta o sAPPbeta en los tejidos cerebrales, plasma o líquido cefalorraquídeo y la disminución de las placas de beta amiloide en el tejido cerebral, en comparación con los controles tratados con vehículo o tiempo de controles cero. Para la Preparación 46, tres horas después de la administración de 0.3, 1, o 3 mg/kg de dosis oral del compuesto, los niveles de péptido Abeta 1-x se reducen aproximadamente el 31%, 39% y 61% en el hipocampo del cerebro, y aproximadamente el 28%, 42% y 64% en la corteza cerebral,

respectivamente en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Dada la actividad de la Preparación 46 en contra de la enzima BACE *in vitro*, estos efectos reductores de Abeta son consistentes con la inhibición de BACE *in vivo*, y demuestran además la penetración en el CNS de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

1. Un compuesto caracterizado porque es una sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

2. La sal tosilato de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque es cristalina.

3. La sal tosilato de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque tiene un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, al ángulo 2-theta de 5.0° de difracción en combinación con uno o más de los picos seleccionado del grupo que consta de 19.6°, 13.8°, y 18.5°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0.2 grados.

4. Un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, caracterizado porque comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Un método de tratamiento de la progresión del deterioro cognitivo leve a la enfermedad de Alzheimer en un paciente, caracterizado porque comprende administrar a un

paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

6. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en terapia.

7. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

8. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de la progresión del deterioro cognitivo leve a la enfermedad de Alzheimer.

9. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes o excipientes.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención presente invención se refiere a una sal de tosilato de N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X20432	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US2016/014423	International filing date *(day/month/year)* 22 January 2016 (22-01-2016)	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 30 January 2015 (30-01-2015)
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 3 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,**
   [ ] the text is approved as submitted by the applicant
   [X] the text has been established by this Authority to read as follows:

   TOSYLATE SALT OF
   N-[3-[(4AR,7AS)-2-AMINO-6-(5-FLUOROPYRIMIDIN-2-YL)-4,4A,5,7-TETRAHYDROPYRROLO[3,4-D][1,3]THIAZIN-7A-YL]-4-F
   LUORO-PHENYL]-5-METHOXY-PYRAZINE-2-CARBOXAMIDE.

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/US2016/014423

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

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 A61P

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, WPI Data, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/143579 A1 (LILLY & CO ELI) 18 September 2014 (2014-09-18) page 39; example 4 page 50; claim 2 page 51; claim 4 -----	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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
15 March 2016	22/03/2016

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	Jeanjean, Fabien

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2016/014423

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014143579 A1	18-09-2014	AU 2014228351 A1	17-09-2015
		CA 2898500 A1	18-09-2014
		CN 105026404 A	04-11-2015
		CR 20150418 A	16-09-2015
		EA 201591491 A1	29-01-2016
		EP 2970336 A1	20-01-2016
		KR 20150119070 A	23-10-2015
		PE 15422015 A1	28-10-2015
		PH 12015502031 A1	18-01-2016
		SG 11201507499X A	29-10-2015
		TW 201520217 A	01-06-2015
		US 2014275044 A1	18-09-2014
		US 2014350245 A1	27-11-2014
		US 2015157641 A1	11-06-2015
		WO 2014143579 A1	18-09-2014

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/US2016/014423	22.01.2016	30.01.2015

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07D513/04 A61K31/542 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 D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Jeanjean, Fabien Telephone No. +49 89 2399-0

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	1-9
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-9
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-9
	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

Claims 4 and 5 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 be 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 use in a first or further medical treatment.Nevertheless claims 4 and 5 have been completely searched.

Reference is made to the following document:

D1 WO 2014/143579 A1 (LILLY & CO ELI) 18 September 2014 (2014-09-18)

1 Novelty

1.1 The subject-matter of claims 1 to 9 is new in the sense of Article 33(2) PCT.

1.2 D1 discloses the N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrrolo[3,4- d] [1,3]thiazin-7a-yl]-4-fluoro- henyl]-5-methoxy-pyrazine-2-carboxamide hydrochloride (p. 39, ex. 4). The compound of claim 1 differs in that it is the tosylate salt.

The subject-matter of claims 1 to 9 is new vis-à-vis D1.

2 Inventive step

2.1 The subject-matter of claims 1 to 9 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

2.2 D1 is considered as the closest prior art and discloses the N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrrolo[3,4- d] [1,3]thiazin-7a-yl]-4-fluoro- henyl]-5-methoxy-pyrazine-2-carboxamide hydrochloride (p. 39, ex. 4). The compound of claim 1 differs in that it is the tosylate salt. The compound or salt (p. 50, cl. 2) of D1 is useful for treating Alzheimer's disease (p. 51, cl. 4). The claimed compound is a salt of compound of claim 2 of D1 and is expected to treat Alzheimer's disease.

The problem may therefore be regarded as the provision of a further salt having unexpected properties over the prior art.

The description mentions that the tosylate salt has a substantially lower amount of solvent retained in the crystal of 1.3% compared to 7.7% solvent retained for the HCl salt. It seems that the solvent content is measured just after the preparation. The solvent content can be reduced with further steps of purification or drying. The effect is linked to the method of preparation but is not inherent to the compound itself. An inventive step can be acknowledged for the method of preparation but not for the compound and its use.

An inventive step cannot therefore be acknowledged for the subject-matter of claims 1 to 9.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
4 August 2016 (04.08.2016)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2016/122968 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/US2016/014423

(22) International Filing Date:
22 January 2016 (22.01.2016)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
62/109,733 30 January 2015 (30.01.2015) US

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

(72) Inventors: **COATES, David Andrew**; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). **WOLFANGEL, Craig Daniel**; 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))*

WO 2016/122968 A1

(54) Title: TOSYLATE SALT OF N-[3-[(4AR,7AS)-2-AMINO-6-(5-FLUOROPYRIMIDIN-2-YL)-4,4A,5,7-TETRAHYDROPYRROLO[3,4-D][1,3]THIAZIN-7A-YL]-4-FLUORO-PHENYL]-5-METHOXY-PYRAZINE-2-CARBOXAMIDE

(57) Abstract: The present invention provides a tosylate salt of N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5- fluoropyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrrolo[3,4-d][1,3]thiazin-7a-yl]-4-fluoro- phenyl]-5-methoxy-pyrazine-2-carboxamide.