

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 914**

51 Int. Cl.:

**C07D 513/04** (2006.01)

**A61K 31/542** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2012 E 12708716 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2665732**

54 Título: **Derivados condensados de aminodihidrotiazina como inhibidores de BACE**

30 Prioridad:

**21.01.2011 GB 201101140**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.07.2016**

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)  
6-10, Koishikawa 4-chome Bunkyo-ku  
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**HALL, ADRIAN;  
FARTHING, CHRISTOPHER NEIL y  
CASTRO PINEIRO, JOSE, LUIS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 575 914 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Derivados condensados de aminodihidrotiazina como inhibidores de BACE

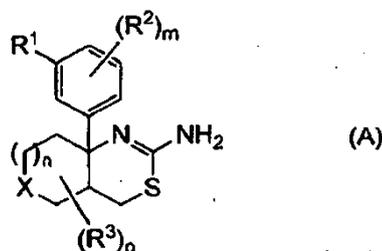
La presente invención se refiere a un derivado condensado de aminodihidrotiazina y su uso farmacéutico. Más particularmente, la presente invención se refiere a un derivado condensado de aminodihidrotiazina que tiene un efecto inhibitor de la producción de la proteína  $\beta$ -amiloides (en lo sucesivo denominada  $A\beta$ ) o un efecto inhibitor de la enzima 1 de escisión de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloides de sitio beta (en lo sucesivo denominada BACE1 o beta-secretasa), y es eficaz para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa causada por la proteína  $A\beta$ , en particular demencia de tipo Alzheimer, síndrome de Down o similares, y a una composición farmacéutica que comprende el derivado condensado de aminodihidrotiazina como un ingrediente activo.

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad caracterizada por la degeneración y pérdida de neuronas así como por la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares. Actualmente, solo los síntomas de la enfermedad de Alzheimer son tratados usando un agente mejorador de los síntomas, caracterizado por un inhibidor de la acetilcolinesterasa, y aún no se ha desarrollado un remedio fundamental para inhibir la progresión de la enfermedad. Es necesario desarrollar un método para controlar la causa del comienzo de la patología con el fin de crear un remedio fundamental para la enfermedad de Alzheimer.

Se supone que las proteínas  $A\beta$  como productos de degradación de las proteínas precursoras amiloides (denominadas en lo sucesivo APP) están muy implicadas en la degeneración y pérdida de neuronas y el comienzo de los síntomas de la demencia. Las proteínas  $A\beta$  tienen, como componentes principales,  $A\beta_{40}$ , que consta de 40 aminoácidos, y  $A\beta_{42}$ , con dos aminoácidos añadidos al C-terminal. Se sabe que  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  son muy propensas a la agregación, y son los principales componentes de las placas seniles. Además, se sabe que  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  se incrementan por mutaciones en la APP y los genes de presenilina que se observan en la enfermedad de Alzheimer familiar. En consecuencia, se espera que un compuesto que reduce la producción de  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  sea un inhibidor de la progresión de la enfermedad o un agente profiláctico para la enfermedad de Alzheimer.

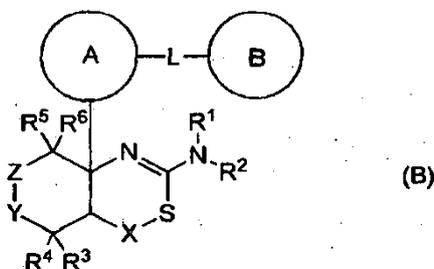
$A\beta$  se produce por la escisión de APP por beta-secretasa (BACE1) y posteriormente por gamma-secretasa. Por esta razón, se han hecho intentos para crear inhibidores de gamma-secretasa y beta-secretasa con el fin de inhibir la producción de  $A\beta$ .

La solicitud de patente internacional publicada W02011/005738 (Eli Lilly and Company) describe compuestos de fórmula (A) y su uso como inhibidores de BACE:



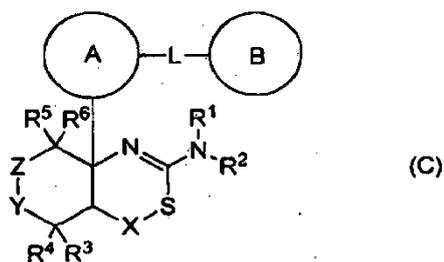
en la que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , X, m, n y p se definen aquí.

Los compuestos condensados de aminodihidrotiazina de fórmula (B) ya se han descrito en la solicitud de patente internacional publicada WO2009/091016 (Eisai R&D Management Co., Ltd):



en la que el anillo A representa un grupo arilo de  $C_{6-14}$  o similar; L representa  $-NR^eCO-$  [en el que  $R^e$  representa un átomo de hidrógeno o similar] o similar; el anillo B representa un grupo arilo de  $C_{6-14}$  o similar; X representa un grupo alquileo de  $C_{1-3}$  o similar; Y representa un enlace sencillo o similar; Z representa un grupo alquileo de  $C_{1-3}$  o similar;  $R^1$  y  $R^2$  representan independientemente un átomo de hidrógeno o similar; y  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  representan independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o similar.

Otros compuestos de aminodihidrotiazina condensados de fórmula (C) se han descrito en la solicitud de patente internacional publicada WO2010/038686 (Eisai R&D Management Co., Ltd.):

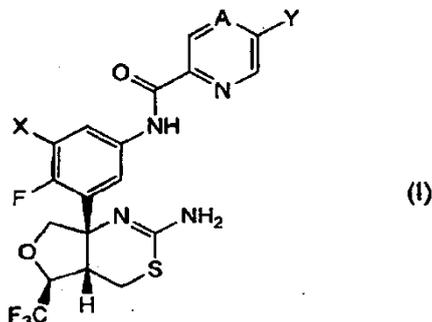


5 en la que el anillo A representa un grupo arilo de C<sub>6-14</sub> o similar; L representa -NR<sup>e</sup>CO- [en el que R<sup>e</sup> representa un átomo de hidrógeno o similar] o similar; el anillo B representa un grupo arilo de C<sub>6-14</sub> o similar; X representa un grupo alquileo de C<sub>1-3</sub> o similar; Y representa un enlace sencillo o similar; Z representa un átomo de oxígeno o similar; R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan independientemente entre sí un átomo de hidrógeno o similar; y R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o similar.

10 La presente invención representa una selección del género de los compuestos descritos en el documento WO2009/091016.

Un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos adicionales que tengan un efecto inhibitor de la producción de Aβ o un efecto inhibitor de BACE1 y que sean útiles como agentes profilácticos o terapéuticos para una enfermedad neurodegenerativa causada por Aβ y caracterizada por demencia de tipo Alzheimer, compuestos los cuales son derivados condensados de aminodihidrotiazina.

15 De este modo, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I):



en la que

X es hidrógeno o flúor;

A is CH o N;

20 Y es metilo, etilo, monofluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, difluoroetilo, metoxi, etoxi, metoximetilo o -C=N;

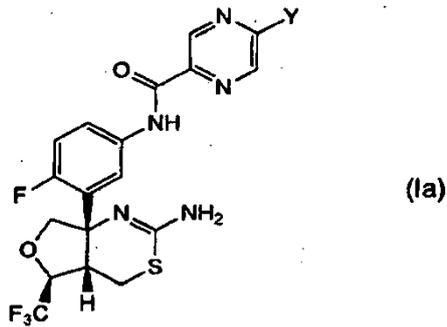
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En una realización de la presente invención, X es hidrógeno.

En otra realización de la presente invención, A es N.

25 En otra realización de la presente invención, Y es metilo, monofluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo o metoxi.

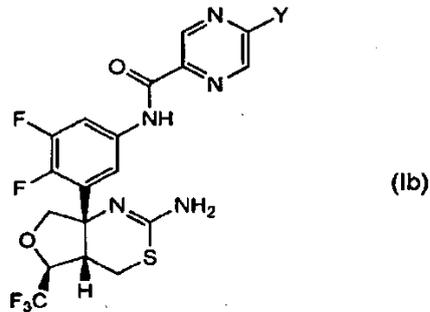
Un grupo preferido de compuestos de la presente invención es el compuesto de fórmula (Ia) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



en la que Y es como se ha definido aquí anteriormente. Preferiblemente, Y es metilo, monofluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, difluoroetilo, metoxi, etoxi, o metoximetilo.

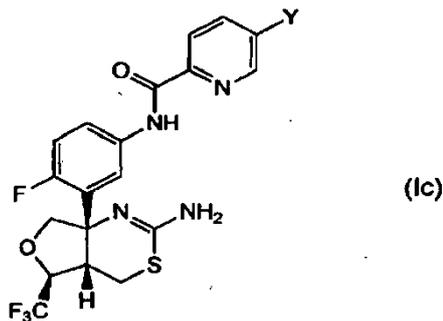
5 En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (1a) en la que Y es metoxi o monofluorometilo.

Otro grupo preferido de compuestos de la presente invención es el compuesto de fórmula (1b) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



10 en la que Y es como se ha definido aquí anteriormente. Preferiblemente, Y es metilo, monofluorometilo, difluorometilo o metoxi.

Un grupo preferido adicional de compuestos de la presente invención es el compuesto de fórmula (1c) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:

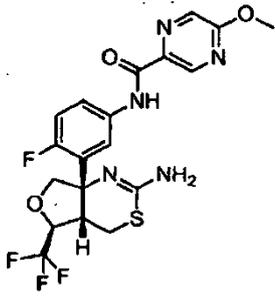


15 en la que Y es como se ha definido aquí anteriormente. Preferiblemente, Y es metilo, etilo, trifluorometilo, metoxi o  $C\equiv N$ .

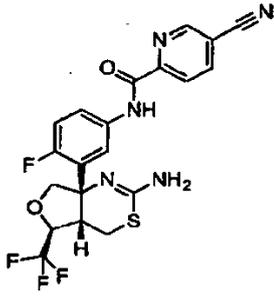
Los compuestos preferidos de la presente invención son:

Compuestos preferidos de la presente invención son:

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida:

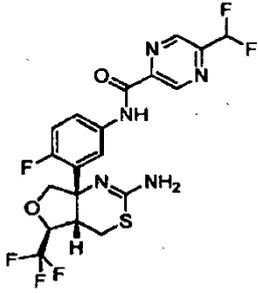


N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-cianopicolinamida:

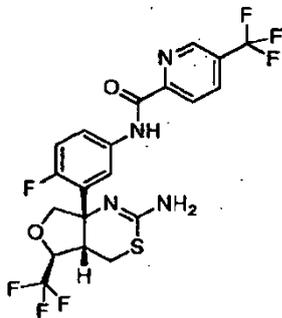


5

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida:

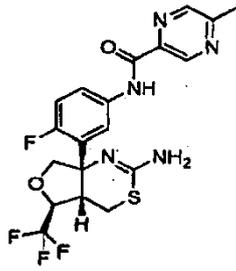


N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)picolinamida:

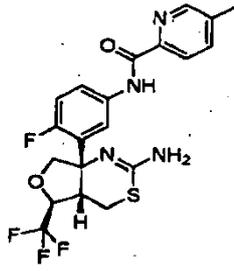


10

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metilpirazin-2-carboxamida:

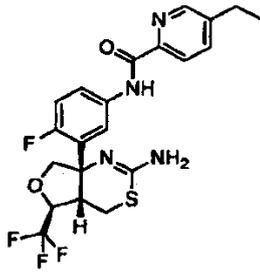


N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metilpicolinamida:

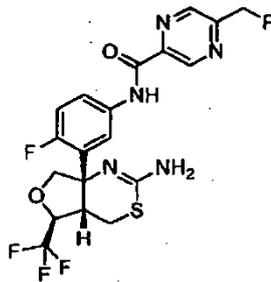


5

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-etilpicolinamida:

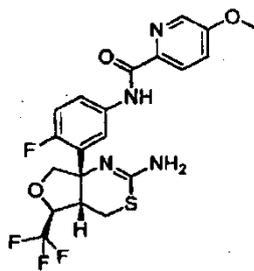


N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(fluorometil)pirazin-2-carboxamida:

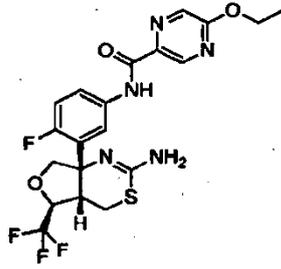


10

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida:

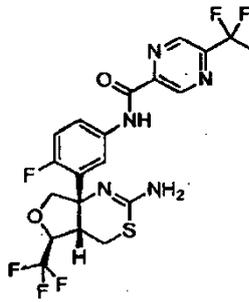


N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-etoxipirazin-2-carboxamida:

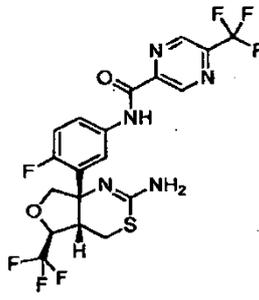


5

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(1,1-difluoroetil)pirazin-2-carboxamida:

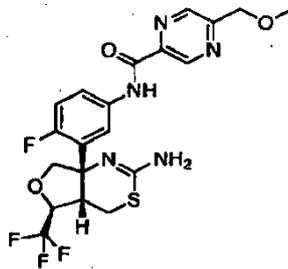


N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)pirazin-2-carboxamida:

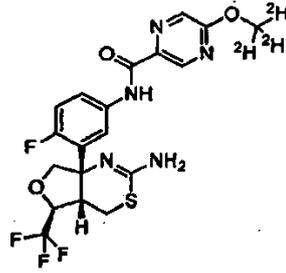


10

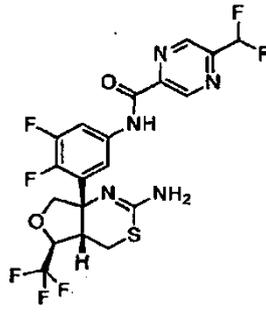
N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(metoximetil)pirazin-2-carboxamida:



N-{3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5-dihidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(7H)-il]-4-fluorofenil}-5-[(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)metiloxi]pirazin-2-carboxamida:

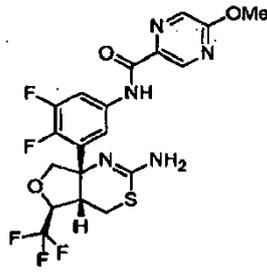


N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida:

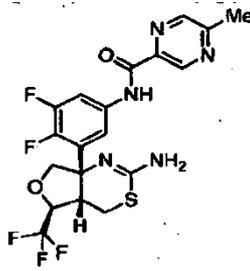


5

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida:

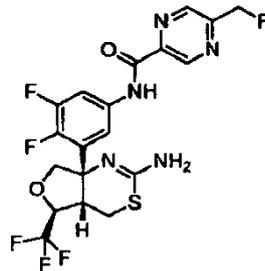


N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-metilpirazin-2-carboxamida:



10

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-(fluorometil)-pirazin-2-carboxamida:



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto que es N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

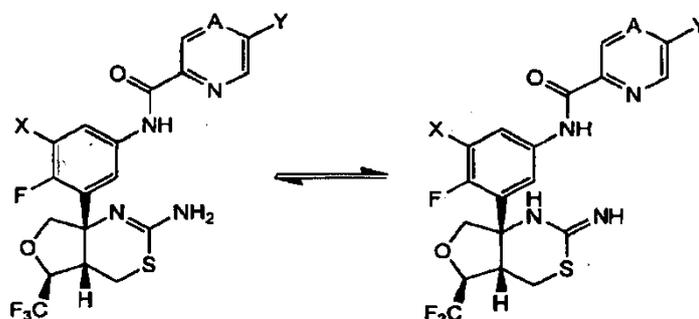
- 5 En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto que es N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(fluorometil)pirazin-2-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos específicos dentro del alcance de esta invención incluyen aquellos nombrados en los Ejemplos siguientes y sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 10 Como se usa aquí, el término "difluoroetilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene dos átomos de carbono y está sustituido con dos átomos de flúor. Los ejemplos del grupo son  $\text{CH}_3\text{-CF}_2\text{-}$ ,  $\text{CH}_2\text{F-CHF-}$  y  $\text{CHF}_2\text{-CH}_2\text{-}$ . En la presente invención, el grupo es preferiblemente  $\text{CH}_3\text{-CF}_2\text{-}$ .

El compuesto de fórmula (I) no se limita a un isómero específico, e incluye todos los isómeros posibles (tal como un isómero de ceto-enol, un isómero de imina-enamina y un rotámero) y mezclas de los mismos. Por ejemplo, el

- 15 compuesto de fórmula (I) incluye los siguientes tautómeros:



Los compuestos de la presente invención contienen tres centros quirales ubicados en el anillo de tetrahidrofuro-tiazinilo dentro de la fórmula (I). La configuración estereoquímica en cada uno de estos centros quirales es preferiblemente S, es decir, son estereoisómeros (4aS,5S,7aS). Para evitar dudas, los estereoisómeros (4aS,5S,7aS) de la presente invención pueden estar presentes como una mezcla con uno o más de los otros estereoisómeros posibles, por ejemplo, en una mezcla racémica.

- 20

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) que es estereoquímicamente puro en los centros quirales (4aS,5S,7aS). En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión estereoquímicamente puro denota un compuesto que tiene 80% o más en peso del estereoisómero (4aS,5S,7aS) y 20% o menos en peso de otros estereoisómeros. En una realización adicional, el compuesto de fórmula (I) tiene 90% o más en peso del estereoisómero (4aS,5S,7aS) y 10% o menos en peso de otros estereoisómeros. En una realización todavía adicional, el compuesto de fórmula (I) tiene 95% o más en peso del estereoisómero (4aS,5S,7aS) y 5% o menos en peso de otros estereoisómeros. En una realización aún más adicional, el compuesto de fórmula (I) tiene 97% o más en peso del estereoisómero (4aS,5S,7aS) y 3% o menos en peso de otros estereoisómeros.

- 25

En la presente memoria descriptiva, aunque puedan estar presentes polimorfos cristalinos del compuesto, el compuesto de modo similar no está limitado a ello y puede estar presente como una forma cristalina única o una mezcla de formas cristalinas únicas. El compuesto puede ser un anhídrido o un hidrato. Cualquiera de estas formas se incluye en las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva.

- 30

La presente invención también incluye compuestos marcados isotópicamente, que son idénticos a los compuestos de fórmula (I), excepto que uno o más átomos se reemplaza por un átomo que tiene un número másico o masa atómica diferente del número másico o masa atómica usualmente encontrado en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor, fósforo, cloro, tecnecio y yodo, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$ .

- 35

Los compuestos de la presente invención y derivados farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sales) de dichos compuestos que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos están dentro del alcance de la presente invención. Los compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como  $^3\text{H}$  y/o  $^{14}\text{C}$ , son útiles en ensayos de distribución de tejidos de sustratos y/o fármacos.  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  se consideran útiles debido a su facilidad de preparación y

- 40
- 45 Los isótopos  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$  y  $^{18}\text{F}$  se consideran útiles en PET (tomografía de emisión de positrones), y los isótopos  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$  se consideran útiles en SPECT (tomografía computarizada de emisión de fotón único),

5 todos útiles en formación de imágenes del cerebro. La sustitución con isótopos más pesados, tales como  $^2\text{H}$ , puede permitir ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo una semivida *in vivo* aumentada o requisitos reducidos de dosificación y, por lo tanto, se consideran útiles en algunas circunstancias. Los compuestos marcados isotópicamente de fórmula (I) de esta invención se pueden preparar generalmente

10 El derivado condensado de aminodihidrotiazina de la fórmula (I) según la presente invención puede ser una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas descritas por Berge, Bighley y Monkhouse, J. Pharm. Sci., 1977, 766, 1-19. Los ejemplos específicos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales de ácidos inorgánicos (tales como sulfatos, nitratos, percloratos, fosfatos, carbonatos, bicarbonatos, hidrof fluoruros, hidroc loruros, hidrobromuros e hidroyoduros), carboxilatos orgánicos (tales como acetatos, oxalatos, maleatos, tartratos, fumaratos, citratos, malonatos y lactatos), sulfonatos orgánicos (tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos, toluenosulfonatos y canfosulfonatos), sales de aminoácidos (tales como aspartatos y glutamatos), sales de aminas cuaternarias, sales de metales alcalinos (tales como sales de sodio y sales de potasio) y sales de metales alcalino-térreos (tales como sales de magnesio y sales de calcio).

15 El compuesto de la fórmula (I) según la presente invención se puede convertir en una sal farmacéuticamente aceptable mediante un método convencional en caso necesario. La sal se puede preparar por un método en el que se combinan adecuadamente los métodos usados normalmente en el campo de la química orgánica sintética y similares.

20 Los ejemplos específicos del método incluyen titulación de neutralización de una disolución libre del compuesto de la presente invención con una disolución ácida.

El derivado condensado de aminodihidrotiazina de la fórmula (I) o sal farmacéuticamente aceptable según la presente invención puede ser un solvato del mismo. Los ejemplos de un solvato incluyen un hidrato.

25 El compuesto de la fórmula (I) según la presente invención se puede convertir en un solvato sometiendo el compuesto en caso necesario a una reacción formadora de solvato conocida *per se*.

La presente invención proporciona además un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en terapia.

30 El derivado condensado de aminodihidrotiazina o sal farmacéuticamente aceptable del mismo o solvato del mismo según la presente invención tiene un excelente efecto inhibitor de la producción de  $\text{A}\beta$  o efecto inhibitor de BACE1 y es útil como un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad neurodegenerativa causada por  $\text{A}\beta$  y caracterizada por demencia de tipo Alzheimer. Los compuestos de la invención reducen tanto  $\text{A}\beta_{40}$  como  $\text{A}\beta_{42}$ . Además, los compuestos de la presente invención pueden tener un efecto inhibitor de BACE 2.

35 De este modo, en otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir la producción de la proteína  $\beta$ -amiloide.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir la enzima 1 de escisión de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloide de sitio beta (BACE 1).

40 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar una enfermedad neurodegenerativa. Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen demencia de tipo Alzheimer (EA), síndrome de Down, angiopatía amiloide cerebrovascular (AAC), deterioro cognitivo leve (DCL), pérdida de memoria, demencia presenil, demencia senil, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, y otras demencias degenerativas tales como demencias de origen vascular y degenerativo mixto, demencia asociada con parálisis supranuclear, demencia asociada con degeneración basal cortical, demencia asociada con la enfermedad de Parkinson (EP), y demencia asociada a EA de tipo cuerpos difusos de Lewy. En una realización, la enfermedad neurodegenerativa es demencia de tipo Alzheimer (EA).

45 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa, tal como demencia de tipo Alzheimer (EA), síndrome de Down, angiopatía amiloide cerebrovascular (AAC), deterioro cognitivo leve (DCL), pérdida de memoria, demencia presenil, demencia senil, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, y otras demencias degenerativas tales como demencias de origen vascular y degenerativo mixto, demencia asociada con parálisis supranuclear, demencia asociada con degeneración basal cortical, demencia asociada con la enfermedad de Parkinson (EP), y demencia asociada a EA de tipo cuerpos difusos de Lewy. En una realización, la enfermedad neurodegenerativa es demencia de tipo Alzheimer (EA).

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto para uso en un método para inhibir la producción de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa, tal como demencia de tipo Alzheimer (EA), síndrome de Down, angiopatía amiloide cerebrovascular (AAC), deterioro cognitivo leve (DCL), pérdida de memoria, demencia presenil, demencia senil, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, y otras demencias degenerativas tales como demencias de origen vascular y degenerativo mixto, demencia asociada con parálisis supranuclear, demencia asociada con degeneración basal, cortical, demencia asociada con la enfermedad de Parkinson (EP), y demencia asociada a EA de tipo cuerpos difusos de Lewy, que implica administrar a un sujeto humano en necesidad del mismo una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen las nombradas anteriormente. En una realización, la enfermedad neurodegenerativa es demencia de tipo Alzheimer (EA). "Cantidad efectiva" quiere decir una cantidad suficiente para causar un beneficio al sujeto, o al menos para provocar un cambio en la condición del sujeto.

Las condiciones adicionales que pueden ser tratadas por los compuestos de la presente invención incluyen diabetes de tipo 2, enfermedad de Creutzfeld-Jakob (ECJ), lesión de nervios periféricos, neuropatía periférica, parálisis supranuclear progresiva, accidente cerebrovascular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedades autoinmunes, inflamación, trombosis arterial, trastornos de ansiedad, trastornos psicóticos, epilepsia, ataques, convulsiones, trastornos de estrés, amiloidosis vascular, dolor, síndrome de Gerstmann-Straeussler-Scheinker, tembladera, encefalopatía, ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Wilson, enfermedad de Graves, enfermedad de Huntington, enfermedad de Whipple, enfermedad de Kostmann, glaucoma, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, hemorragia cerebral con amiloidosis, amiloidosis vascular, inflamación del cerebro, síndrome de X frágil, accidente cerebrovascular, síndrome de Tourette, miositis por cuerpos de inclusión, trastornos de estrés, depresión, trastorno bipolar y trastorno obsesivo compulsivo.

En un aspecto, la presente invención proporciona además un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar la diabetes de tipo 2. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona además el uso de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la diabetes de tipo 2.

En un aspecto aún adicional, la presente invención proporciona además un compuesto para uso en un método para inhibir la producción de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o tratar o prevenir la diabetes de tipo 2, que implica administrar a un sujeto humano en necesidad del mismo una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como ingrediente activo, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable. La composición puede estar en cualquier forma adecuada, dependiendo del método de administración previsto. Por ejemplo, puede estar en forma de una comprimido, cápsula o líquido para administración oral, o de una disolución o suspensión para administración parenteral.

El derivado condensado de aminodihidrotiazina o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la presente invención se puede formular mediante un método convencional. Los ejemplos preferibles de la forma de dosificación incluyen comprimidos, comprimidos recubiertos tales como comprimidos con película y comprimidos recubiertos de azúcar, gránulos finos, gránulos, polvos, cápsulas, jarabes, troscos, inhalantes, supositorios, inyecciones, ungüentos, colirios, gotas nasales, gotas óticas, cataplasmas y lociones.

Estas preparaciones sólidas, tales como comprimidos, cápsulas, gránulos y polvos, pueden contener generalmente 0,01 a 100% en peso, y preferiblemente 0,1 a 100% en peso del derivado condensado de aminodihidrotiazina o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la presente invención, como ingrediente activo.

El ingrediente activo se formula mezclando los ingredientes usados generalmente como materiales para una preparación farmacéutica y añadiendo un excipiente, un disgregante, un aglutinante, un lubricante, un colorante y un corrector usado normalmente, y añadiendo un estabilizante, un emulsionante, un absorbefaciente, un tensioactivo, un ajustador del pH, un conservante y un antioxidante en caso necesario, por ejemplo, usando un método convencional. Los ejemplos de tales ingredientes incluyen aceites animales y vegetales tales como aceite de soja, sebo de res y glicérido sintético; hidrocarburos tales como parafina líquida, escualano y parafina sólida; aceites de ésteres tales como miristato de octildodecilo y miristato de isopropilo; alcoholes superiores tales como alcohol cetosteárico y alcohol behenílico; una resina de silicona; aceite de silicona; tensioactivos tales como éster de ácido graso de polioxietileno, éster de ácido graso de sorbitán, éster de ácido graso de glicerol, éster de ácido graso de polioxietileno sorbitán, aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado y un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno; polímeros solubles en agua tales como hidroxietilcelulosa, ácido poliacrílico, un polímero de carboxivinilo, polietilenglicol, polivinilpirrolidona y metilcelulosa; alcoholes inferiores tales como etanol e isopropanol; alcoholes polihidroxilados tales como glicerol, propilenglicol, dipropilenglicol y sorbitol; azúcares tales como glucosa y sacarosa; polvos inorgánicos tales como anhídrido silícico, silicato de aluminio y magnesio, y silicato de aluminio; y agua purificada. Ejemplos del excipiente usado incluyen lactosa, almidón de maíz, sacarosa, glucosa, manitol,

sorbitol, celulosa cristalina y dióxido de silicio. Los ejemplos del aglutinante usado incluyen alcohol polivinílico, éter polivinílico, metilcelulosa, etilcelulosa, goma arábica, tragacanto, gelatina, goma laca, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, un copolímero de bloques de polipropilenglicol-polioxietileno, y meglumina. Los ejemplos del disgregante usado incluyen almidón, agar, gelatina en polvo, celulosa cristalina, carbonato de calcio, bicarbonato de sodio, citrato de calcio, dextrina, pectina y carboximetilcelulosa de calcio. Los ejemplos del lubricante usado incluyen estearato de magnesio, talco, polietilenglicol, sílice y aceite vegetal hidrogenado. Los ejemplos del colorante usado incluyen aquellos permitidos para ser añadidos a compuestos farmacéuticos. Los ejemplos de los correctores usados incluyen cacao en polvo, mentol, empasmo, aceite de menta, borneol y canela en polvo. Obviamente, los ingredientes no se limitan a los ingredientes aditivos anteriores.

5 Por ejemplo, una preparación oral se prepara añadiendo el derivado condensado de aminodihidrotiazina o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la presente invención como ingrediente activo, un excipiente y, en caso necesario, un aglutinante, un disgregante, un lubricante, un colorante, un corrector y similar, y formando luego la mezcla en polvo, gránulos finos, gránulos, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas o similares mediante un método convencional. Obviamente, los comprimidos o gránulos se pueden recubrir adecuadamente, por ejemplo, recubiertos con azúcar, en caso necesario.

10 Por ejemplo, una preparación de jarabe o inyección se prepara añadiendo un ajustador del pH, un solubilizante, un agente isotonicante y similar, y un agente solubilizante, un estabilizador y similar en caso necesario mediante un método convencional. La inyección puede ser una disolución preparada previamente, o puede ser polvo en sí o polvo que contiene un aditivo adecuado, que se disuelve antes del uso. La inyección puede contener generalmente 0,01 a 100% en peso, y preferiblemente 0,1 a 100% en peso del ingrediente activo. Además, una preparación líquida para administración oral, tal como una suspensión o un jarabe, puede contener por lo general 0,01 a 100% en peso, y preferiblemente 0,1 a 100% en peso del ingrediente activo.

15 Por ejemplo, una preparación externa se puede preparar mediante cualquier método convencional sin limitaciones específicas. Como material base, se puede usar cualquiera de los diversos materiales usados generalmente para un compuesto farmacéutico, un cuasi fármaco, un cosmético o similar. Los ejemplos del material base incluyen materiales tales como aceites de animales y vegetales, aceites minerales, aceites de ésteres, ceras, alcoholes superiores, ácidos grasos, aceites de silicona, tensioactivos, fosfolípidos, alcoholes, alcoholes polihidroxilados polímeros solubles en agua, minerales de arcilla, y agua purificada. En caso necesario se puede añadir un ajustador de pH, un antioxidante, un quelante, un conservante y fungicida, un colorante, un saborizante o similar. Además, en caso necesario se puede mezclar ingredientes, tales como un ingrediente que tiene un efecto inductor de diferenciación, un potenciador del flujo sanguíneo, un bactericida, un antiflogístico, un activador de células, vitamina, aminoácido, un humectante y un agente queratolítico.

20 La dosis del derivado condensado de aminodihidrotiazina o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la presente invención varía, por ejemplo, según el grado de los síntomas, la edad, el sexo, el peso corporal, el modo de administración, el tipo de sal y el tipo específico de la enfermedad. Típicamente, el ingrediente activo se administra por vía oral a un adulto de aproximadamente 30  $\mu$ g a 10 g, preferiblemente de 100  $\mu$ g a 5 g, y más preferiblemente desde 100  $\mu$ g a 1 g por día, o se administra a un adulto por inyección de aproximadamente 30  $\mu$ g a 1 g, preferiblemente de 100  $\mu$ g a 500 mg, y más preferiblemente de 100  $\mu$ g a 300 mg por día, en una o varias dosis, respectivamente.

25 Los compuestos de la fórmula (I) se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo medicamentos considerados útiles, ya sea como tratamientos modificadores de la enfermedad o sintomáticos de una enfermedad neurodegenerativa tal como la enfermedad de Alzheimer. De este modo, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un producto farmacéutico que comprende, en combinación, un primer ingrediente activo que es un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y por lo menos un ingrediente activo adicional útil en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. En una realización de la invención, la enfermedad neurodegenerativa es demencia de tipo Alzheimer (EA). Los ejemplos adecuados de tales ingredientes activos adicionales pueden ser agentes sintomáticos, por ejemplo aquellos que se sabe que modifican la transmisión colinérgica tales como agonistas o moduladores alostéricos de los receptores muscarínicos M1 y M3, antagonistas del receptor muscarínico M2, agonistas o moduladores alostéricos positivos (MAPs) de M4, inhibidores de la acetilcolinesterasa (tales como tetrahidroaminoacridina, hidrocloreuro de donepezilo y rivastigmina), agonistas o moduladores alostéricos del receptor nicotínico (tales como agonistas o moduladores alostéricos de  $\alpha 7$  o agonistas o moduladores alostéricos de  $\alpha 4\beta 2$ ), agonistas de PPAR (tales como agonistas de PPAR $\gamma$ ), agonistas o agonistas parciales del receptor de 5-HT $_4$ , antagonistas de histamina H3, antagonistas del receptor de 5-HT $_6$  o ligandos del receptor de 5HT $_{1A}$  y antagonistas o moduladores del receptor de NMDA, antagonistas de 5-HT $_{2A}$ , antagonistas de 5-HT $_7$ , agonistas o MAPs de D1, agonistas o MAPs de D4, agonistas o MAPs de D5, agonistas inversos o moduladores alostéricos negativos (MANs) de la subunidad  $\alpha 5$  de GABA-A, agonistas o MAPs de la subunidad  $\alpha 2/3$  de GABA-A, moduladores (MAPs o MANs) de mGluR2, MAPs de mGluR3, MAPs de mGluR5, inhibidores de PDE 1, inhibidores de PDE 2, inhibidores de PDE 4, inhibidores de PDE 5, inhibidores de PDE 9, inhibidores de PDE 10, inhibidores de GlyT1, inhibidores de DAAO, inhibidores de ASC1, moduladores de AMPA, activadores o inhibidores de SIRT1, antagonistas de AT4, antagonistas de GalR1, ligandos de GalR3, antagonistas de adenosina A1, antagonistas de adenosina A2a, antagonistas o agonistas de  $\alpha 2A$ , inhibidores selectivos y no selectivos de la

recaptación de norepinefrina (ISRNs), o agentes potenciales modificadores de la enfermedad tales como inhibidores o moduladores de la gamma secretasa, activadores o moduladores de alfa secretasa, inhibidores de la agregación de amiloide, anticuerpos anti amiloide, inhibidores de la agregación de tau o inhibidores de la fosforilación de tau/cinasas, activadores de la desfosforilación de tau/fosfatasa, inhibidores de la proteína cinasa cinasa 4 (MKK4/MEK4/MAP2K4) activada por mitógenos, inhibidores de la cinasa c-Jun N-terminal (JNK), inhibidores de la caseína cinasa, inhibidores de MK2 (proteína cinasa 2 activada por proteínas cinasas activadas por mitógenos), inhibidores de MARK (cinasa reguladora de la afinidad a microtúbulos), inhibidores de CDK5 (cinasa 5 dependiente de ciclinas), inhibidores de GSK-3 (glucógeno sintasa cinasa 3), inhibidores de tau-tubulina cinasa 1 (TTBK1). Ejemplos adicionales de tales otros agentes terapéuticos pueden ser los bloqueadores de canales de calcio, inhibidores de HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) reductasa (estatinas) y agentes reductores de lípidos, miméticos de NGF (factor de crecimiento nervioso), antioxidantes, ligandos de GPR3, activadores de plasmina, activadores de neprilisina (NEP), activadores de IDE (enzima que degrada la insulina), agonistas de los receptores de melatonina MT1 y/o MT2, ligandos de TLX/NR2E1 (receptor X sin ramificaciones), ligandos de GluR1, antagonistas de RAGE (receptor para productos finales de la glicación avanzada), inhibidores del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), ligandos de FPRL-1 (receptor 1 semejante a formil péptido), antagonistas de GABA, e inhibidores de MICAL (molécula que interactúa con casL), por ejemplo inhibidores de oxorreductasa, antagonistas/agonistas inversos de CB1, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), agentes antiinflamatorios (por ejemplo agentes que podrían ser usados para el tratamiento de la neuroinflamación ya sea mediante la mejora o la reducción de la neuroinflamación), ligandos de la proteína precursora de amiloide (APP), vacunas y/o anticuerpos anti-amiloide, agentes que promueven o mejoran el eflujo y/o el aclaramiento de amiloide, inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC), antagonistas de EP2, inhibidores de 11-beta-HSD1 (hidroxiesteroide deshidrogenasa), agonistas o MAPs del receptor X del hígado (LXR), miméticos y/o ligandos y/o potenciadores y/o inhibidores de proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteína (PRL), inhibidores de butiril colinesterasa, antagonistas y/o inhibidores de ácido quinurínico de quinurenina aminotransferasa (KAT), antagonistas del receptor de orfanina FQ/nociceptina (NOP)/ receptor 1 semejante a opioides (ORL1), ligandos (activadores o inhibidores) de transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT), e inhibidores del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), agonistas o MAPs de niacina y/o GPR109 en combinación con agentes reductores del colesterol y/o inhibidores de HMGCoA reductasa (estatinas), dimebolina o agentes similares, antihistamínicos, agentes de unión a metales/quelantes, antibióticos, secretagogos de la hormona del crecimiento, agentes reductores del colesterol, vitamina E, inhibidores de la absorción del colesterol, promotores y/o activadores del eflujo de colesterol, y agentes que aumentan la insulina.

En una realización, la presente invención proporciona un producto farmacéutico que comprende, en combinación, un primer ingrediente activo que es un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y por lo menos un ingrediente activo adicional seleccionado de:

- inhibidores de colinesterasa, por ejemplo donepezilo, galantamina, rivastigamina, tetrahidroaminoacridina y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,
- antagonistas de 5-HT<sub>6</sub>, por ejemplo SB-742457, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,
- inhibidores de HMG-CoA reductasa, por ejemplo lovastatina, rosuvastatina, atorvastatina, simvastatina, fluvastatina, pitavastatina, pravastatina, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los componentes individuales de tales combinaciones se pueden administrar ya sea de forma secuencial o simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas. Por consiguiente, el producto farmacéutico puede ser, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende el primer y otros ingredientes activos en mezcla. Alternativamente, el producto farmacéutico puede comprender, por ejemplo, el primer y otros ingredientes activos en preparaciones farmacéuticas separadas adecuadas para la administración simultánea, secuencial o separada a un paciente que lo necesite.

Las combinaciones mencionadas anteriormente pueden presentarse convenientemente para uso en forma de una formulación farmacéutica, y de este modo las formulaciones farmacéuticas que comprenden una combinación como se ha definido anteriormente junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable comprenden un aspecto adicional de la invención.

Cuando un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se usa en combinación con un segundo agente terapéutico activo, la dosis de cada compuesto puede diferir de la dosis cuando el compuesto se usa solo. Las dosis apropiadas serán apreciadas fácilmente por los expertos en la técnica.

De este modo, un aspecto adicional de la invención proporciona un método de preparación de una composición farmacéutica, que implica mezclar por lo menos un compuesto de fórmula (I) como se define anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más adyuvantes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables y/o con uno o más de otros agentes terapéutica o profilácticamente activos.

En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, uno o más de otros agentes para el tratamiento de

la enfermedad de Alzheimer, tales como un agonista o modulador alostérico de los receptores muscarínicos M1 y M3, un antagonista del receptor muscarínico M2, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, un agonista o modulador alostérico del receptor nicotínico, un agonista de PPAR, un agonista o agonista parcial del receptor de 5-HT<sub>4</sub>, un antagonista de histamina H3, un antagonista del receptor de 5-HT<sub>6</sub>, un ligando del receptor de 5HT<sub>1A</sub>, un antagonista o modulador del receptor de NMDA, un antagonista de 5-HT<sub>2A</sub>, un antagonista de 5-HT<sub>7</sub>, agonistas o modulador alostérico positivo (MAP) de D1, un agonista o MAP de D4, un agonista o modulador alostérico negativo (MAN) de la subunidad  $\alpha$ 5 de GABA-A, un agonista o MAP de la subunidad  $\alpha$ 2/3 de GABA-A, un modulador (MAP o MAN) de mGluR2, un MAP de mGluR3, un MAP de mGluR5, un inhibidor de PDE 1, un inhibidor de PDE 2, un inhibidor de PDE 4, un inhibidor de PDE 5, un inhibidor de PDE 9, un inhibidor de PDE 10, un inhibidor de GlyT1, un inhibidor de DAAO, un inhibidor de ASC1, un modulador de AMPA, un activador o inhibidor de SIRT1, un antagonista de AT4, un antagonista de GalR1, un ligando de GalR3, un antagonista de adenosina A1, un antagonista de adenosina A2a, un antagonista o agonista de  $\alpha$ 2A, un inhibidor selectivo y no selectivo de la recaptación de norepinefrina (ISRN), un inhibidor o modulador de la gamma secretasa, un activador o modulador de alfa secretasa, un inhibidor de la agregación de amiloide, un anticuerpo anti amiloide, un inhibidor de la agregación de tau, un inhibidor de la fosforilación de tau, un inhibidor de MK2 (proteína cinasa 2 activada por proteínas cinasas activadas por mitógenos), un inhibidor de MARK (cinasa reguladora de la afinidad a microtúbulos), un inhibidor de CDK5 (cinasa 5 dependiente de ciclinas), un inhibidor de GSK-3 (glucógeno sintasa cinasa 3), un bloqueador de canales de calcio, un inhibidor de HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) reductasa (estatina) y un agente reductor de lípidos, un mimético de NGF (factor de crecimiento nervioso), un antioxidante, un ligando de GPR3, un activador de plasmina, un activador de nepriliasina (NEP), un activador de IDE (enzima que degrada la insulina), un agonista de los receptores de melatonina MT1 y/o MT2, un ligando de TLX (receptor X sin ramificaciones), un ligando de GluR1, un antagonista de RAGE (receptor para productos finales de la glicación avanzada), un inhibidor del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), un ligando de FPRL-1 (receptor 1 semejante a formil péptido), un antagonista de GABA o un inhibidor de MICAL (molécula que interactúa con casL) tal como un inhibidor de oxorreductasa, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la presente invención proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un agente terapéutico adicional como se describe aquí anteriormente, para una administración secuencial o simultánea en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto para uso en un método para inhibir la producción de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa, tal como demencia de tipo Alzheimer (EA), síndrome de Down, angiopatía amiloide cerebrovascular (AAC), deterioro cognitivo leve (DCL), pérdida de memoria, demencia presenil, demencia senil, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, y otras demencias degenerativas tales como demencias de origen vascular y degenerativo mixto, demencia asociada con parálisis supranuclear, demencia asociada con degeneración basal cortical, demencia asociada con la enfermedad de Parkinson (EP), y demencia asociada a EA de tipo cuerpos difusos de Lewy, implicando el método administrar a un sujeto humano que sufre la afección una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de la composición farmacéutica descrita anteriormente o de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. "Cantidad efectiva" quiere decir una cantidad suficiente para causar un beneficio al sujeto, o por lo menos para provocar un cambio en la condición del sujeto.

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza patológicamente por la presencia de ovillos neurofibrilares (ONFs) y placas, que consisten en péptidos amiloides (A $\beta$ ) de longitud variable, por ejemplo 42 aminoácidos (A $\beta$ 42) y 40 aminoácidos (A $\beta$ 40). Además de estos marcadores patológicos, la atrofia cerebral es también evidente. Se cree que la acumulación de placas es debida a la agregación de péptidos A $\beta$ . Los péptidos A $\beta$  se forman en el cerebro mediante la escisión secuencial de la proteína precursora amiloide (APP) por la  $\beta$ -secretasa (BACE-1) y la  $\gamma$ -secretasa. Por lo tanto, los fármacos potenciales para la EA dirigidos a inhibir la formación de amiloide mediante la inhibición de BACE-1 o la  $\gamma$ -secretasa deben de ser capaces de lograr una exposición adecuada en el cerebro, con el fin de ejercer un efecto sobre EA.

Aunque BACE-1 representa una diana atractiva para detener o ralentizar la producción de péptidos amiloides, diversos grupos han encontrado que es difícil de identificar inhibidores de BACE-1 que puedan penetrar el sistema nervioso central (SNC) y de este modo inhibir la enzima en el lugar de acción.

El cerebro está protegido por varias barreras, incluyendo la barrera hematoencefálica (BHE) y los transportadores (Hitchcock y Pennington, J. Med. Chem. 2006, 29, 7559; Ueno, Curr. Med. Chem. 2007, 14, 1199; Gloor et al., Brain Res. Rev. 2001, 36, 258). Se han caracterizado varios transportadores de flujos de salida que impiden que los compuestos entren al cerebro. Uno de los mejor caracterizados y más prominente en la prevención de la penetración en el SNC de xenobióticos es la glicoproteína P (gp-P) (Kusuhara y Sugiyama, Drug Discovery Today, 2001, 6, 150; Mahar Doan et al., J. Pharm. Exp. Ther. 2002, 303, 1029; Lin, Drugs of Today 2004, 40, 5; Lin y Yamazaki, Clin Pharmacokinet 2003, 42, 59; Schinkel Adv. Drug Deliv. Rev. 1999, 36, 179). Se ha demostrado que el eflujo de gp-P es importante para los inhibidores de BACE-1 (Hussain et al., J. Neurochem. 2007, 100, 802). De este modo, es importante superar el eflujo de gp-P.

Los expertos en la técnica apreciarán que hay varias formas de medir o predecir la penetración en el SNC *in vitro* o *in vivo*. El potencial para la penetración en el SNC se puede evaluar *in vitro* determinando si un compuesto puede

## ES 2 575 914 T3

ser sometido al eflujo de gp-P, es decir, llevando a cabo un ensayo *in vitro* de gp-P. Los expertos en la técnica apreciarán que se puede usar un número de líneas de células, y que estas líneas de células pueden afectar o no a los resultados del ensayo. A continuación se describe un ensayo de este tipo (Cyprotex UK).

5 Se utilizó el siguiente ensayo de MDR-1 MDCK para evaluar el eflujo de gp-P. El ensayo se llevó a cabo en Cyprotex Discovery Ltd. 15 Beech Lane, Macclesfield, Cheshire, Reino Unido, SK10 2DR.

Permeabilidad de MDR1-MDCK (Bi-direccional; pH 7,4/pH 7,4)

Resumen del protocolo

10 Las células MDCK son una línea de células epiteliales de origen renal canino. Estas células se pueden transfectar para expresar de forma estable glicoproteína P activa (MDR1-MDCK), y son ideales para el estudio del eflujo de fármacos. El compuesto de ensayo se añadió al lado apical o basolateral de una monocapa confluyente de células MDR1-MDCK, y la permeabilidad se midió monitorizando la aparición del compuesto de ensayo en el lado opuesto de la membrana usando LC-MS/MS. A partir de esto, se midió/calculó una relación de un coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) y eflujo.

Objetivo

15 Para medir la permeabilidad del compuesto de ensayo en la dirección apical a basolateral (A-B) y basolateral a apical (B-A) a través de las células MDR1-MDCK, se calculó una relación de permeabilidades B-A y A-B (relación de eflujo) para demostrar si el compuesto sufre eflujo de glicoproteína P.

Los compuestos se proporcionaron como una disolución de 200  $\mu$ l de compuesto de ensayo 10 mM en DMSO.

Procedimiento experimental

20 Se usaron células MDR1-MDCK obtenidas del NIH (Rockville, MD, USA). Después del cultivo hasta la confluencia, las monocapas se prepararon enjuagando las dos superficies basolateral y apical dos veces con un amortiguador de pH 7,4 a 37°C. Las células se incubaron a continuación con un amortiguador de pH 7,4 en los dos compartimentos apical y basolateral durante 40 minutos para estabilizar los parámetros fisiológicos.

25 El amortiguador a pH 7,4 se retiró entonces del compartimento apical y se reemplazó con disoluciones de dosificación del compuesto de ensayo. Las disoluciones se prepararon diluyendo 10 mM del compuesto de ensayo en DMSO con el amortiguador para dar una concentración final del compuesto de ensayo de 10  $\mu$ M (concentración final de DMSO ajustada al 1%). El marcador de integridad fluorescente amarillo Lucifer también se incluyó en la disolución de dosificación. Las inserciones de compartimentos apicales se colocaron a continuación en placas de "compañía" que contienen amortiguador reciente a pH 7,4. Los patrones analíticos se obtuvieron a partir de las disoluciones de dosificación.

30 Para los experimentos basolateral a apical (B-A), el experimento se inició reemplazando el amortiguador en los insertos, colocándolos a continuación en placas de compañía que contienen disoluciones de dosificación. Las incubaciones se llevaron a cabo en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> con una humedad relativa de 95% a 37°C durante 60 minutos.

35 Después del periodo de incubación, se retiró la placa de compañía y las muestras apical y basolateral se diluyeron para el análisis por LC-MS/MS. La permeabilidad del compuesto de ensayo se evaluó por duplicado. En cada placa, los compuestos de características de permeabilidad conocidas se usaron como controles.

40 Los compuestos de ensayo y de control se cuantificaron por análisis de casete de LC-MS/MS usando una calibración de 5 puntos con la dilución apropiada de las muestras. Se usaron condiciones analíticas genéricas de Cyprotex. La concentración de partida ( $C_0$ ) se determinó a partir de la disolución de dosificación, y la recuperación experimental se calculó a partir de  $C_0$  y las concentraciones de compartimentos tanto apical como basolateral.

45 La integridad de las monocapas durante todo el experimento se comprobó monitorizando la permeación de amarillo Lucifer usando un análisis fluorimétrico. La permeación de amarillo Lucifer es baja si las monocapas no han sido dañadas. Si un valor de  $P_{app}$  de amarillo Lucifer estaba por encima de los límites de control de calidad (QC) en un pocillo de compuesto de ensayo individual, entonces se informó de un resultado  $n=1$ . Si los valores de  $P_{app}$  de amarillo Lucifer estaban por encima de los límites de control de calidad en los dos pocillos duplicados para un compuesto de ensayo, el compuesto se volvía a probar. Si en la repetición se observó una alta permeación de amarillo Lucifer en ambos pocillos, entonces se supuso la toxicidad o la fluorescencia inherente del compuesto de ensayo. No se llevaron a cabo experimentos adicionales en este caso.

50 Análisis de datos

El coeficiente de permeabilidad para cada compuesto ( $P_{app}$ ) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$P_{app} = (dQ \div dt) \div (C_0 \times A)$$

en la que dQ/dt es la velocidad de permeación del fármaco a través de las células, C<sub>0</sub> es la concentración de compartimiento donante a tiempo cero y A es el área de la monocapa de células. C<sub>0</sub> se obtuvo del análisis de la disolución de dosificación al inicio del experimento.

5 Además, se calculó una relación de eflujo (ER) partir de datos de la media AB y BA. Esto se deriva de:

$$ER = ((P_{app} (B - A)) \div ((P_{app} (A - B)))$$

Se cribaron dos compuestos de control junto con los compuestos de ensayo, propranolol (altamente permeable) y prazosina (un sustrato para glicoproteína P).

10 Sorprendentemente, se encontró que los compuestos de la presente invención muestran una relación de eflujo de gp-P más baja que los compuestos ejemplificados en el documento WO2009/091016, indicando que tienen el potencial para mostrar mayor penetración en el SNC. Los datos para los ejemplos seleccionados se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla. 1: datos del ensayo de gp-P para MDR-1 MDCK

Ejemplo	ER de gp-P
Ejemplo Comparativo 1	26,2
Ejemplo Comparativo 2	16,6
Ejemplo Comparativo 3	24,0
Ejemplo Comparativo 4	20,7
2	1,7
3	1,4
4	1,0
1	0,7
Ejemplo Comparativo 5	4,7
Ejemplo Comparativo 6	4,5
10	0,6
5	1,5
6	1,0
7	0,8
8	1,7
9	1,2
11	1,0
12	0,8
13	1,7
15	1,6
16	1,1
17	1,4
18	1,1

Ejemplo	ER de gp-P
Nota: El ejemplo 14 no se ha incluido intencionadamente	

Los Ejemplos Comparativos 1 a 6 están cubiertos por la solicitud de patente internacional publicada WO2009/091016; los Ejemplos Comparativos 1 a 4 se describen específicamente en el documento WO2009/091016 como Ejemplos 32, 35, 54 y 73, respectivamente. Los Ejemplos Comparativos 5 y 6 son N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(fluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-etoxipicolinamida, y N-(3-((4aS,5R,7aS)-2-amino-5-metil-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-etoxipicolinamida, respectivamente.

Los datos demuestran que los compuestos de la presente invención y los ejemplos específicos 1 a 13 y 15 a 18 tienen un menor eflujo de gp-P y por lo tanto una penetración en el SNC potencialmente mayor que los ejemplos representativos del documento WO2009/091016 usando el método reconocido mencionado anteriormente de evaluación de la penetración en el SNC. Por ejemplo, los Ejemplos Comparativos 1 a 6 tienen relaciones de eflujo de gp-P mayores que los compuestos de la presente invención. Además, los Ejemplos Comparativos 5 y 6 tienen relaciones de eflujo de gp-P mayores que un análogo cercano, el Ejemplo 10 de la presente invención, lo que demuestra claramente el efecto beneficioso que el grupo trifluorometilo en el anillo de tetrahidrofurano ejerce sobre el eflujo de gp-P, es decir, el grupo trifluorometilo reduce el eflujo de gp-P.

Los expertos en la técnica apreciarán que el ensayo *in vitro* de gp-P descrito anteriormente es un ensayo predictivo de una penetración *in vivo* en el SNC. De este modo, es también muy deseable si el eflujo disminuido mediado por gp-P se traduce a la situación *in vivo*. Los expertos en la técnica apreciarán que hay muchas formas de evaluar la penetración en el SNC de compuestos *in vivo*. Por ejemplo, se puede cuantificar las concentraciones de compuestos en la sangre o plasma y el cerebro, y se puede calcular una relación cerebro:sangre (Br:BI) o cerebro:plasma (Br:PI). Este método se ha usado históricamente y ha sido ampliamente aceptado como un método para determinar la penetración en el SNC (Summerfield et al., J. Pharmacol. Expt. Ther. 2007, 322, 205). Los expertos en la técnica apreciarán que este tipo de ensayo se pueda llevar a cabo en un estado estacionario, un solo punto de tiempo, múltiples puntos de tiempo, o se pueda realizar citando las relaciones de área bajo la curva (ABC). Todos los métodos son igualmente válidos, pero cada uno puede tener ciertas advertencias que serán apreciados por los expertos en la técnica. Se ha publicado bibliografía reciente para sugerir que es importante tener en cuenta las concentraciones libres *in vivo* y que cuando no se produce eflujo desde el cerebro la concentración plasmática libre debería de ser la misma o equivalente a la concentración cerebral libre (Kalvass y Maurer, Biopharmaceutics & Drug Disposition 2002, 23, 327; Mauer et al, Drug Metab. Disposition 2005, 33, 175; Trainor Expert Opin Drug Discov. 2007, 2, 51). De este modo, un compuesto que puede penetrar libremente el SNC y no está sometido a eflujo activo, por ejemplo por gp-P u otro transportador, debería de demostrar una relación libre en cerebro: libre en plasma (Br<sub>fr</sub>:Pl<sub>fr</sub>) o una relación no unida en cerebro: no unida en plasma (Br<sub>u</sub>:Pl<sub>u</sub>) de aproximadamente 1:1. Los expertos en la técnica apreciarán que las concentraciones libres o no unidas se puedan calcular multiplicando la concentración cerebral total o la concentración plasmática total por la fracción no unida en el tejido cerebral o plasma, que se puede medir por el ensayo descrito a continuación. Los expertos en la técnica apreciarán que la fracción no unida pueda cambiar con factores experimentales, por ejemplo la concentración, o la temperatura, etc. Los expertos en la técnica serán capaces de evaluar esto y seleccionar el conjunto de condiciones más apropiadas. Los expertos en la técnica también apreciarán que mientras las condiciones sean las mismas para cada compuesto examinado, entonces el ensayo presentará datos consistentes para el intervalo de compuestos ensayados, minimizando de este modo cualquier discrepancia. También se ha propuesto que las concentraciones de fármaco en el líquido cefalorraquídeo (LCR) sean equivalentes a las concentraciones libres en el cerebro para compuestos que no son expulsados activamente desde el cerebro (He et al., Xenobiotica 2009, 39, 687). Así, otro método para determinar la penetración en el SNC sería evaluar el LCR:libre en plasma (LCR:Pl<sub>fr</sub>) o LCR:no unido en plasma (LCR:Pl<sub>u</sub>). Si el fármaco libre en el plasma es capaz de permear al SNC y no es introducido o expulsado activamente, entonces la LCR:Pl<sub>fr</sub> o LCR:Pl<sub>u</sub> debe de ser aproximadamente 1:1. Los expertos en la técnica apreciarán los problemas asociados con la determinación de las concentraciones de fármaco en el LCR y la extracción del LCR; por ejemplo, el LCR puede estar contaminado por la sangre, dependiendo del método de extracción; también las concentraciones en el LCR pueden ser de menor exactitud, dependiendo de la dosis usada.

De este modo, se ha demostrado que un inhibidor de BACE de GlaxoSmithKline (GSK188909),  $Cl_{50}$  de BACE-1 5nM, que tiene una baja exposición en el SNC, fue ineficaz reduciendo la producción de A $\beta$ 40 en los cerebros de ratones TASTPM (que sobreexpresan tanto APPsw<sup>K595N/M596I</sup> humana como PS-1<sup>M146V</sup>) con la administración aguda (Hussain et al., J. Neurochem. 2007, 100, 802 - 809). Después de una dosis oral de 250 mg/kg, la concentración cerebral de GSK188909 en ratones TASTPM fue 0,62  $\mu$ M. Cuando un inhibidor de gp-P (GF120918) se dosificó 5 horas antes de la administración oral de GSK188909, se encontró que la concentración en el cerebro de GSK188909 fue 5,43  $\mu$ M después de una dosis oral de 250 mg/kg, es decir, la coadministración de un inhibidor de gp-P provocó un aumento de casi 9 veces en la penetración en el SNC, mostrando que el eflujo de gp-P es un mecanismo importante a la hora de prevenir que los inhibidores de BACE penetren en el SNC. Además, en ausencia de un inhibidor de gp-P, una dosis oral de 250 mg/kg de GSK188909 no tuvo ningún efecto en los niveles de A $\beta$ 40 en el cerebro en ratones TASTPM, mientras que cuando se coadministró un inhibidor de gp-P (5 horas antes de la

administración de GSK188909) se observó una reducción del 68% en los niveles de A $\beta$ 40 en el cerebro con respecto a los ratones tratados con vehículo.

5 Otra publicación ha informado de un efecto similar con tres inhibidores de BACE-1 de Bristol-Myers Squibb (Meredith et al., J. Pharm. Expt. Ther. 2008, 326, 502-513). Se encontró que los tres compuestos dados a conocer eran sustratos de la gp-P *in vitro*. Cuando se dosificaron a ratones, los tres compuestos mostraron baja penetración en el SNC, y no disminuyeron los niveles de amiloide en el cerebro pero fueron capaces de reducir los niveles de amiloide en el plasma. Cuando los mismos tres compuestos se administraron a ratones genosuprimidos (KO) para gp-P, el nivel de penetración en el SNC aumentó, y los compuestos fueron capaces de reducir los niveles de amiloide en el cerebro.

10 Los investigadores de Schering-Plough también han publicado artículos (Iserloh et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18, 418) para mostrar que los inhibidores de BACE-1 de su serie (por ejemplo, el ejemplo 11 de la referencia mencionada anteriormente), están sometidos a eflujo de gp-P, como resultado de lo cual se encontró que el compuesto muestra un bajo Br:PI (<0,1) en la rata.

15 La bibliografía citada anteriormente pone énfasis en las dificultades de identificar inhibidores de BACE-1 que no están sometidos a eflujo de gp-P. Los inhibidores serían muy deseables, y muchos grupos de investigación han intentado descubrir tales compuestos sin éxito. De este modo, serían deseables inhibidores de BACE-1 que no sean sustratos de la gp-P y por lo tanto puedan penetrar fácilmente el SNC y reducir amiloide en el cerebro.

20 Más recientemente, los investigadores de Wyeth han informado de un extenso trabajo para superar el eflujo de gp-P en una serie de inhibidores de acilguanidina cíclicos de BACE-1 (Malamas et al, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010, 20, 6597). Se descubrió que los compuestos eran sustratos débiles de la gp-P y con Br:PI acercándose a 1:1. Sin embargo, dos ejemplos principales con eflujo de gp-P reducido (84 y 89 de la referencia mencionada anteriormente) no disminuyeron A $\beta$ 40 en el cerebro de ratones Tg2576 8 horas después de una dosis oral de 30 mg/kg. La falta de eficacia se atribuyó al hecho de que los compuestos mostraron una unión elevada al tejido cerebral. De este modo, es importante descubrir inhibidores de BACE-1 que no sean sustratos de la gp-P pero que todavía tengan una fracción no unida razonable en el tejido cerebral y sean capaces de reducir amiloide en el cerebro.

25 También se ha mostrado que los inhibidores de BACE que no son sustratos de la gp-P *in vitro* pueden penetrar el SNC (por ejemplo, TC-1 de Merck), y pueden reducir los niveles de A $\beta$ 40 en el cerebro de ratones APP-YAC y monos (Sankaranarayanan et al., J. Pharmacol. Expt. Ther. 2009, 328, 131-140). De este modo, ensayos *in vitro* de gp-P mostraron que TC-1 no es un sustrato de la gp-P, y cuando TC-1 se dosificó a los ratones APP-YAC (100 mg/kg i.p.) fue capaz de penetrar modestamente el SNC como se muestra por las concentraciones cerebrales y la relación cerebro:plasma, y esta capacidad dio como resultado la reducción moderada de amiloide cerebral.

Tiempo	Conc. plasmática ( $\mu$ M)	Conc. cerebral ( $\mu$ M)	Br:PI	Reducción de A $\beta$ 40 cerebral (%)
2h	25	1,6	0,06	26
4h	13	1,8	0,14	29

Concentración plasmática y cerebral de TC-1 tras una dosis de 100 mg/kg i.p., y efectos correspondientes sobre los niveles de A $\beta$ 40 cerebral en ratones APP-YAC.

35 En experimentos separados se demostró que TC-1 podría penetrar en el LCR de monos cuando se coadministra con un inhibidor de CYP3A4 (ritonavir). En estos experimentos, se encontró que la concentración plasmática media de TC-1 fue 2,7  $\mu$ M, mientras que se encontró que la concentración de LCR fue 0,025  $\mu$ M. Sin embargo, puesto que TC-1 está ~ 99% enlazado a proteínas plasmáticas, se calculó que la concentración plasmática libre es ~ 0,027 nM. Se encontró que los niveles de A $\beta$ 40 del LCR mostraron una disminución del 42% con respecto a un grupo de control tratado con vehículo. De este modo, se esperaba que un inhibidor de BACE que pueda penetrar libremente en el SNC sea capaz de reducir los niveles de amiloide en el SNC. Sería beneficioso no tener que ser co-dosificado con un inhibidor de CYP3A4.

45 Los compuestos de la presente invención han demostrado reducir la producción de A $\beta$  en ensayos celulares, lo que se correlaciona con su capacidad para disminuir la producción de A $\beta$  en animales. De este modo, los compuestos de la presente invención tendrán utilidad reduciendo la producción de A $\beta$  en seres humanos y de este modo serán útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer.

Penetración *in vivo* en el SNC de rata

Se adquirieron ratas macho Sprague Dawley de Charles River UK Ltd. (Margate, Reino Unido) y se alojaron de acuerdo con las directrices del Ministerio del Interior del Reino Unido. Los fármacos se obtuvieron hasta las

concentraciones apropiadas en 0,5% de metilcelulosa. A los animales se les dosificó por vía oral (2 ml/kg) por sonda nasogástrica a las dosis descritas en las siguientes Tablas 2 a 4.

En los puntos de tiempo después de la dosificación, especificados en las Tablas 2 a 4 siguientes, a los animales se les administró una inyección i.p. de pentobarbital sódico (aproximadamente 330 mg/kg para anestesia terminal).

5 Usando una guillotina, los animales fueron decapitados y la sangre del tronco se recogió en tubos Falcon de 15 ml que contienen 100 UI de heparina. La sangre se sometió a vórtice seguido de centrifugación a 6000 rpm, 4°C durante 5 minutos. Se recogió plasma para ensayos DMPK y ELISA, y se almacenó a -80°C hasta su uso. Los cerebros se diseccionaron y se dividieron a lo largo de la línea media, se pesaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior.

10 Método para el análisis de muestras de plasma, cerebro y LCR

Preparación de las disoluciones de trabajo con acetonitrilo

15 El compuesto de ensayo se preparó como una disolución de 1 mg de base libre/ml en DMSO, se agitó en vórtice, y se sometió a ultrasonidos durante 5 min. La disolución de 1 mg/ml en DMSO se diluyó hasta lotes de 10 y 30 µg/ml en acetonitrilo, añadiendo 10 µl a 990 µl de acetonitrilo y 30 µl a 970 µl de acetonitrilo, respectivamente. Los lotes de 10 y 30 µg/ml en acetonitrilo se diluyeron en serie 1:9 (v/v) (lote de 100 µl en 900 µl de acetonitrilo) para dar las siguientes disoluciones: 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 y 30 µg/ml de acetonitrilo.

Preparación de patrones de plasma, blancos y muestras

20 El plasma de ratas macho Sprague Dawley de control y las muestras de plasma del estudio se almacenaron a -80°C hasta el día del análisis cuando se descongelaron a temperatura ambiente. El plasma de control se centrifugó (2.000 g durante 10 min) y se dividió en alícuotas (90 µl) en tubos eppendorf para la preparación de muestras patrón y blanco. Las muestras del estudio se dividieron previamente en alícuotas (100 µl) en tubos eppendorf inmediatamente después de la recolección del plasma.

25 Se añadió una alícuota (10 µl) del lote en acetonitrilo apropiado al plasma de control (para dar un volumen final de 100 µl) para dar los patrones de calibración requeridos que cubren el intervalo 1 - 3000 ng/ml. Se prepararon muestras del blanco y del blanco doble añadiendo 10 µl de acetonitrilo a 90 µl de plasma del blanco.

Preparación de patrones del cerebro, blancos y muestras

30 El cerebro de ratas macho Sprague Dawley de control y las muestras de cerebro del estudio se pesaron después de la recolección y se almacenaron a -80°C hasta el día del análisis cuando se descongelaron a temperatura ambiente. Una vez descongelados, los cerebros se diluyeron con agua (4 ml por gramo de tejido) y se homogeneizaron usando un homogeneizador mecánico. Se tomó una alícuota (100 µl) de cada muestra del estudio en tubos Micronics listos para el análisis, y se prepararon alícuotas suficientes (90 µl) de homogeneizado del cerebro de control para la preparación de patrones y blancos.

35 Se añadió una alícuota (10 µl) de los lotes en acetonitrilo apropiados al homogeneizado de cerebro de control (para dar un volumen final de 100 µl) para dar los patrones de calibración requeridos que cubren el intervalo de 1,5 a 5000 ng/g. Se prepararon muestras del blanco y del blanco doble añadiendo 10 µl de acetonitrilo a 90 µl de homogeneizado de cerebro del blanco.

Extracción de muestras de plasma y cerebro, patrones y blancos

40 Cada muestra de homogeneizado de cerebro y plasma, patrón y blanco (100 µl) se extrajo con una alícuota (300 µl) de acetonitrilo (que contiene ácido fórmico al 0,1% y 100 ng/ml de un patrón interno apropiado). Los blancos dobles se extrajeron con una alícuota (300 µl) de acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0,1%). Todas las muestras, patrones y blancos se mezclaron entonces por vórtice y se centrifugaron (2000 g durante 15 min). Entonces se tomó una alícuota (50 µl) del sobrenadante resultante en una placa de 2 ml de 96 pocillos profundos y se diluyó con acetonitrilo:agua (50:50 v/v) (150 µl) lista para el análisis por un método de LC-MS/MS específico.

Preparación de muestras de LCR, patrones y blancos

45 Las muestras de LCR de ratas macho Sprague Dawley de control y de LCR del estudio se almacenaron a -80°C hasta el día del análisis, cuando se descongelaron a temperatura ambiente. Se tomó una alícuota (50 µl) de cada muestra del estudio en tubos Micronics listos para el análisis, y se prepararon alícuotas suficientes (45 µl) de LCR de control para la preparación de patrones y blancos.

50 Se añadió una alícuota (5 µl) de los lotes en acetonitrilo apropiados al LCR de control (para dar un volumen final de 50 µl) para dar los patrones de calibración requeridos que cubren el intervalo de 1 - 1000 ng/ml. Las muestras de blanco y de blanco doble se prepararon añadiendo 5 µl de acetonitrilo a 45 µl de LCR del blanco.

Extracción de muestras de LCR, patrones y blancos

5 Cada muestra de LCR, patrón y blanco (50 µl) se extrajo con una alícuota (150 µl) de acetonitrilo (que contiene ácido fórmico al 0,1% y 100 ng/ml de un patrón interno apropiado). Los blancos dobles se extrajeron con una alícuota (150 µl) de acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0,1%. Todas las muestras se mezclaron después en vórtice, y entonces se diluyó adicionalmente una alícuota (50 µl) de cada una en 150 µl de acetonitrilo:agua (50/50 v/v) en un bloque de 2 ml de 96 pocillos profundos listo para el análisis de LC-MS/MS.

Todas las muestras se analizaron entonces usando una UPLC Waters Acquity acoplada a un espectrómetro de masas Waters Xevo TQ.

Condiciones de LC:

10 Columna: Acquity UPLC BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm, mantenida a 40°C. Fase móvil: A = 95% de agua: 5% de MeOH que contiene 0,01 M de acetato de amonio; B = 5% de agua: 95% de MeOH que contiene 0,01 M de acetato de amonio

Gradiente:

Tiempo (min)	B (%)
0	5
1,2	95
1,5	95
1,7	5
2,0	5

15 Caudal: 0,6 ml/min; volumen de inyección 5 µl; temperatura del automuestreador 6°C El flujo de LC se desvió para perder los primeros 0,3 min de cada inyección Las transiciones MS/MS se optimizaron automáticamente mediante el software Waters QuanOptimise.

Detección de amiloide

Extracción mediante DEA/NaCl de péptidos Aβ de cerebro de rata:

20 Se prepararon recientemente 100 ml de dietilamina (DEA) al 0,2% enfriada en 50 mM de NaCl (pH 10), y se añadió 1 ml/25 mg de tejido cerebral a cada hemisferio (es decir, 40x el volumen del cerebro). Los cerebros se homogeneizaron inmediatamente usando un Polytron PT 1200 durante 1,5 minutos, y las muestras se dejaron incubar en hielo durante una hora tras la homogeneización. Se transfirieron 3 ml del homogeneizado a un tubo de polialómero (Beckman nº 362333), y se centrifugaron a 133.000 x g (55.000 rpm) durante 45 min a 4°C. El sobrenadante se neutralizó después hasta un pH de 8 - 8,3 añadiendo 1/10 volumen de 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8. Las muestras se pueden usar recientes o congeladas instantáneamente en hielo seco, y almacenaron a -80°C hasta que se requieran para el análisis.

ELISA (kit de Wako) de βamiloide (40) humano/rata

30 El kit de ELISA de Aβ40 de Wako (nº de código 294-62501) usa el anticuerpo monoclonal BNT77, generado contra el epitopo Aβ(11-28) y el anticuerpo monoclonal BA27, que detecta específicamente la porción C-terminal de Aβ40. Este kit se usa para la determinación cuantitativa de Aβ(1-40) humano o de rata, y también especies de Aβ40 truncadas N-terminalmente (Aβ(x-40)) en matrices biológicas tales como medio de cultivo tisular, tejido homogeneizado, LCR y plasma.

35 Para el análisis, muestras de plasma y cerebro se diluyen 1:1 con el diluyente patrón contenido en el kit, y las muestras de LCR se diluyen 1:8 con el diluyente patrón contenido en el kit. El ensayo se lleva a cabo según las instrucciones del fabricante, y las muestras se analizan por duplicado. Los datos se analizan usando Microsoft Excel 2003, y el análisis estadístico se lleva a cabo usando Genstat 9ª edición.

40 De este modo, cuando el Ejemplo Comparativo 4 se administró en una dosis de 10 mg/kg p.o. y las muestras de plasma, cerebro y LCR se recogieron 2, 4, 6 y 8 horas después de la dosis, se midieron las siguientes concentraciones (Tabla 2):

Tabla 2: Datos para el Ejemplo Comparativo 4

Tiempo (h)	[PI] (nM)	<sup>1</sup> [PI <sub>u</sub> ] (nM)	[Br] (nM)	<sup>2</sup> [Br <sub>u</sub> ] (nM)	[CSF] (nM)	Br <sub>tot</sub> :PI <sub>tot</sub>	Br <sub>u</sub> :PI <sub>u</sub>	CSF:PI <sub>u</sub>
2	1257	440	971	65	104	0.8	0.15	0.24
4	1162	407	874	59	88	0.7	0.14	0.22
6	834	292	570	38	63	0.7	0.13	0.22
8	484	169	368	25	26	0.8	0.15	0.15

1 Calculado multiplicando [PI] por PI Fu.  
2 Calculado multiplicando [Br] por Br Fu.

A partir del estudio anterior, el Ejemplo Comparativo 4 mostró una reducción de 59% y 64% de Aβ40 en el cerebro a las 4 y 6 horas, respectivamente, y una reducción de 76% y 70% de Aβ40 en el LCR a las 4 y 6 horas respectivamente.

- 5 Ciertos compuestos de la presente invención se han evaluado *in vivo* en la rata para corroborar los niveles de penetración en el SNC; estos datos se presentan en las tablas a continuación.

10 Sorprendentemente, se ha encontrado que los compuestos de la presente invención muestran una mayor penetración en el SNC en la rata con respecto a los compuestos del documento WO2009/091016 por cualquiera de los métodos reconocidos mencionados anteriormente para determinar la penetración en el SNC. De este modo, los compuestos de la presente invención pueden mostrar perfiles mejorados por cuanto se dirigen más fácilmente al sitio de acción, el cerebro, y por lo tanto pueden mostrar una eficacia mejorada o eficacia a dosis o concentraciones más bajas, o menores efectos secundarios mediados periféricamente, a modo de separación preferencial en el SNC, o una combinación de cualquiera o de todos estos aspectos.

15 De este modo, cuando el Ejemplo 8 de la presente invención se administró a una dosis de 10 mg/kg p.o. y las muestras de plasma, cerebro y LCR se recogieron 2, 4, 6 y 8 horas después de la dosis, se midieron las siguientes concentraciones (Tabla 3):

Tabla 3: Datos para el Ejemplo 8

Tiempo (h)	[PI] (nM)	<sup>1</sup> [PI <sub>u</sub> ] (nM)	[Br] (nM)	<sup>2</sup> [Br <sub>u</sub> ] (nM)	[LCR] (nM)	Br <sub>tot</sub> :PI <sub>tot</sub>	Br <sub>u</sub> :PI <sub>u</sub>	LCR:PI <sub>u</sub>
2	1189	124	3961	87	65	3.3	0.7	0.5
4	657	68	2582	57	39	3.9	0.8	0.6
6	229	24	845	19	12	3.7	0.8	0.5
8	186	19	709	16	<sup>3</sup> n.q.	3.8	0.8	<sup>4</sup> n.d.

1 Calculado multiplicando [PI] por PI Fu.  
2 Calculado multiplicando [Br] por Br Fu.  
3 No es cuantificable. Concentraciones próximas a o por debajo del límite inferior de cuantificación y que no se pueden cuantificar con precisión.  
4 No determinado.

20 A partir del estudio anterior, el Ejemplo 8 mostró una reducción de 68% y 72% de Aβ40 en el cerebro a las 4 y 6 horas, respectivamente, y una reducción de 82% y 74% de Aβ40 en el LCR a las 4 y 6 horas, respectivamente. De este modo, los compuestos de la presente invención muestran una disminución del flujo de gp-P con respecto a descripciones anteriores, a la vez que demuestran eficacia en el SNC. La eficacia se consigue de este modo con concentraciones plasmáticas circulantes más bajas.

Cuando el Ejemplo 1 de la presente invención se administró a una dosis de 10 mg/kg p.o. y las muestras de plasma, cerebro y LCR se recogieron 2, 4, 6 y 8 horas después de la dosis, se midieron las siguientes concentraciones (Tabla 4):

Tabla 4: Datos para el Ejemplo 1

Tiempo (h)	[PI] (nM)	<sup>1</sup> [PI <sub>u</sub> ] (nM)	[Br] (nM)	<sup>2</sup> [Br <sub>u</sub> ] (nM)	[CSF] (nM)	Br <sub>tot</sub> :PI <sub>tot</sub>	Br <sub>u</sub> :PI <sub>u</sub>	CSF:PI <sub>u</sub>
2	462	23	2338	30	23	5.1	1.3	1.0
4	298	15	1550	20	18	5.2	1.3	1.2
6	401	20	1492	19	10	3.7	1.0	0.5
8	228	11	1194	16	18	5.2	1.5	1.6

1 Calculado multiplicando la [PI] por PI Fu.  
2 Calculado multiplicando la [Br] por Br Fu.

5

A partir del estudio anterior, el Ejemplo 1 mostró una reducción de 64% y 70% de Aβ40 en el cerebro a las 4 y 6 horas, respectivamente, y una reducción de 80% y 85% de Aβ40 en el LCR a las 4 y 6 horas, respectivamente. De este modo, los compuestos de la presente invención muestran una disminución del eflujo de gp-P con respecto a las invenciones anteriores, a la vez que demuestran eficacia en el SNC. La eficacia se consigue así con concentraciones plasmáticas circulantes más bajas.

10

Método para la determinación de la unión a las proteínas plasmáticas (UPP) y unión al tejido cerebral (UTC)

Preparación de los compuestos

Los compuestos se disolvieron en DMSO para dar una disolución de 1 mg de base libre/ml, antes de la dilución adicional hasta 100 µg/ml en acetonitrilo (100 µl de 1 mg/ml en 900 µl de acetonitrilo).

15

Preparación de la matriz

En la mañana de la diálisis, el plasma y cerebro de ratas macho Sprague Dawley de control, previamente almacenados a -80°C, se descongelaron a temperatura ambiente. Se comprobó el plasma en busca del pH y, en caso necesario, se ajustó hasta 7,4 con HCl 1M. A continuación, el plasma se centrifugó (2000 g durante 10 min), y los cerebros se diluyeron con 2 ml de disolución salina amortiguada con fosfato (pH 7,4) por gramo de tejido y se homogeneizaron usando un homogeneizador mecánico. Entonces se añadió una alícuota (10 µl) de la disolución del compuesto en acetonitrilo 100 µg/ml a 1 ml de homogenado de plasma y cerebro, y se mezcló con vórtice para dar una concentración de compuesto final de 1 µg/ml en la matriz.

20

Preparación de la placa de RED

La placa de Diálisis de Equilibrio Rápido (RED) (Thermo Scientific) se preparó según las instrucciones de los fabricantes, es decir, la placa base se empapó en etanol al 20% (v/v) durante 10 min y luego se enjuagó dos veces con agua desionizada antes de dejarla secar. La placa base se llenó entonces con el número apropiado de insertos desechables (n=3 por compuesto) (Thermo Scientific), y la matriz que contiene 1 µg/ml de compuesto se añadió a la cámara de la matriz de los insertos (200 µl) y se añadió una alícuota (350 µl) de PBS a la cámara del amortiguador. La placa se cubrió entonces con un adhesivo y se incubó en aire a 37°C durante 6 h con agitación a 130 rpm.

25

30 Muestreo

Después de 6 h de incubación, el sello se retiró y se tomó una alícuota (50 µl) de las cámaras de PBS y se dispensó en tubos Micronics. También, se retiró una alícuota (50 µl) de las cámaras de la matriz y se colocó en tubos Micronics separados. El plasma y el cerebro se emparejaron con la matriz con 50 µl de PBS libre de fármaco y las muestras de PBS con 50 µl de la matriz libre de fármaco correspondiente, para dar composiciones y volúmenes finales iguales (100 µl).

35

Análisis de muestras

Las muestras se mezclaron en vórtice y se añadió una alícuota (300 µl) de acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0,1% y 100 ng/ml de un patrón interno apropiado. Las muestras se mezclaron entonces y se centrifugaron (2000 g

durante 15 min) y se retiró una alícuota del sobrenadante (100 µl) en una placa de 96 pocillos profundos y se diluyó con un volumen igual de agua listo para el análisis por medio de LC-MS/MS. Los siguientes datos se obtuvieron para los siguientes compuestos en el ensayo anterior (Tabla 5).

Tabla 5:

Compuesto	UPP de rata (%)	Plasma de rata fu	UTC de rata (%)	Cerebro de rata fu
Ejemplo Comparativo 4	65,0	0,350	93,3	0,067
Ejemplo 1	95,1	0,049	98,7	0,013
Ejemplo 8	89,6	0,104	97,8	0,022

Los datos representan la media de n=3 réplicas  
fu = fracción libre (no unida a proteínas)

5

A partir de los datos presentados anteriormente en este documento será evidente para los expertos en la técnica que los compuestos de los Ejemplos 1 y 8 logran una reducción del Aβ40 cerebral similar a la del Ejemplo Comparativo 4, pero con una concentración plasmática y concentración plasmática libre inferiores. Esto es ventajoso e indica que los compuestos de la invención tendrán una eficacia similar o mejor a concentraciones inferiores que los compuestos del documento WO2009/091016, y por lo tanto será menos probable que causen efectos secundarios indeseados mediados periféricamente, tales como efectos cardiovasculares, fosfolipidosis, toxicidad hepática, toxicidad renal y toxicidad gastrointestinal.

10

Evaluación de los efectos sobre el intervalo QTc en cobayas

15

Cobayas macho Dunkin-Hartley se pesaron y se anestesiaron usando 4% de isoflurano en carbógeno. La anestesia se mantuvo a 1,5% de isoflurano y los animales se mantuvieron bajo anestesia durante todo el estudio. Se administró xilazina en 2 mg/kg i.m. en la extremidad posterior como agente bradicárdico para permitir la detección de la prolongación de QTc por medio del software.

20

25

La arteria carótida y la vena yugular se canularon con líneas que contienen suero heparinizado y un ECG de 3 derivaciones conectado y monitorizado usando el software Pro LabChart. Se dejó que los animales se estabilicen durante 30 minutos después de la finalización de la intervención quirúrgica, antes del inicio de la infusión de vehículo i.v. (5% DMSO/90% MilliQ/5% HCl 0,1N) desde tiempo cero (velocidad de infusión = 0,2 ml/kg/min). A los 10 minutos, se recogió una muestra de sangre arterial para el análisis PK (150 µl; todas las jeringas de recogida se heparinizaron). A los 12 minutos, se inició la infusión del fármaco a 2,0 mg/kg/10 min i.v. La dosis se incrementó hasta 6,0 mg/kg/10 min, después 20 mg/kg/10 min i.v., con un período de infusión de 10 minutos y dos minutos de toma de muestra de sangre a cada dosis. Después de la dosis final, se tomó una muestra de sangre y se inició una segunda infusión de vehículo. Ocho minutos más tarde, se recogió una muestra de sangre terminal para el análisis PK del plasma, y el animal se eutanasió mediante un método de un Programa 1.

30

Los cambios de QTc (Bazett) se analizaron usando el software Pro LabChart. QTc se mantuvo sin cambios hasta la dosis/concentración ensayada más alta, lo que correspondía a una concentración plasmática no unida de 9503 nM para el Ejemplo 8 y 296 nM para el Ejemplo 1.

Evaluación de los efectos sobre el intervalo QTc en perros beagle

35

Perros beagle machos se pesaron y se les inyectó tiopental sódico para la inducción de la anestesia. La anestesia se mantuvo con mezcla de 1-1,5% de isoflurano y oxígeno, y los animales se mantuvieron bajo respiración artificial y anestesia usando isoflurano durante todo el estudio.

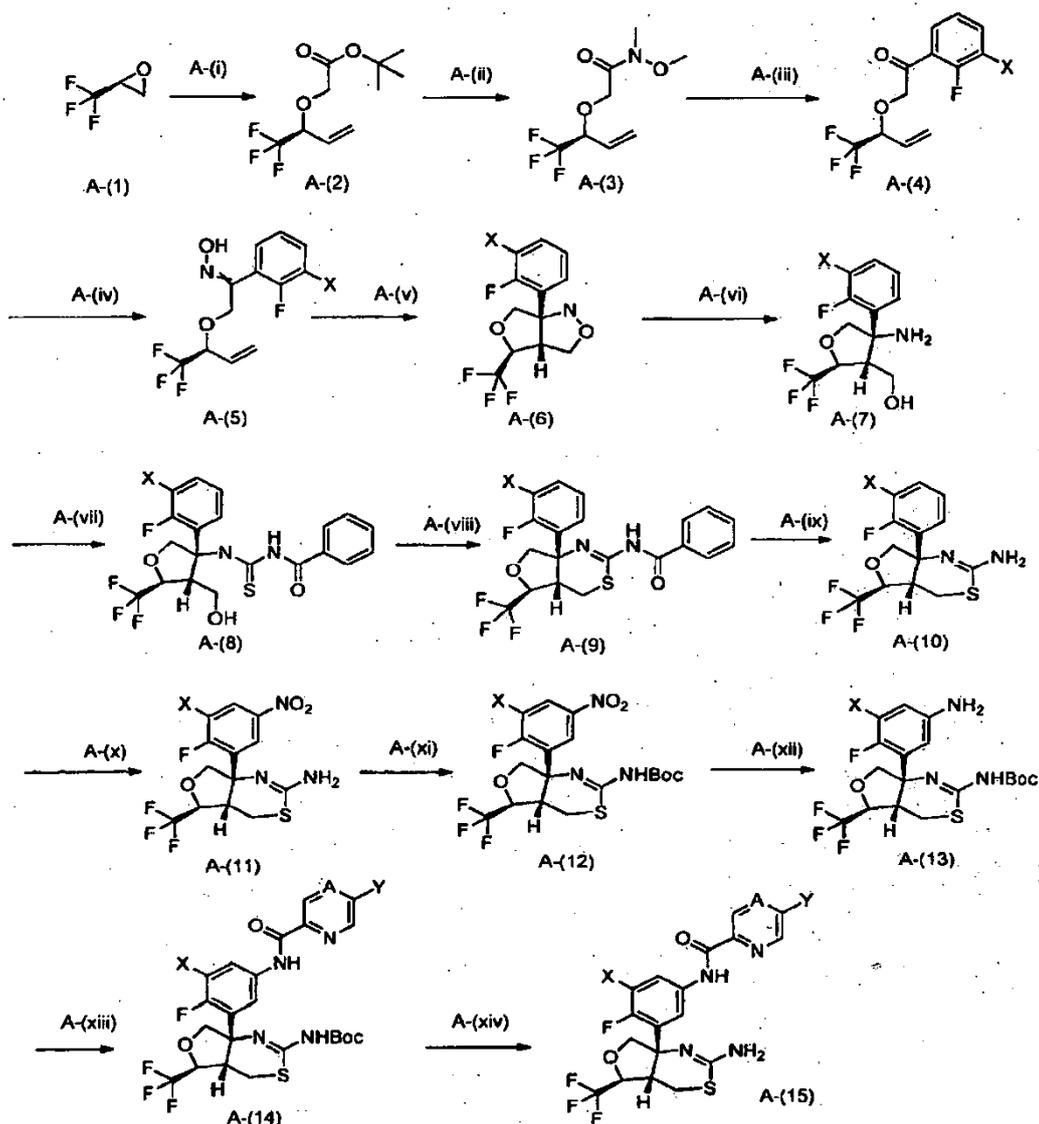
40

La arteria carótida y la vena safena se canularon con líneas que contienen disolución salina heparinizada y un LII ECG conectado y monitorizado usando el sistema de polígrafo. Se dejó que los animales se estabilicen durante 30 minutos antes de la infusión de la disolución del compuesto, y la infusión a través de la cánula se inició desde tiempo cero con 1 mg/kg/10 min. La dosis se aumentó hasta 3 mg/kg/10 min, luego 10 mg/kg/10 min. Se recogió una muestra de sangre arterial después de cada dosificación para el análisis PK.

QTc se mantuvo sin cambios hasta la dosis/concentración ensayada más alta, lo que correspondía a una concentración plasmática no unida de 4128 nM para el Ejemplo 8 y 1329 nM para el Ejemplo 1.

A continuación, se describen métodos para preparar el compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la presente invención.

A. Método de preparación general A:



En la fórmula, X, Y y A son como se han definido anteriormente.

5 El método de preparación general A es un método para preparar un compuesto A-(15) que corresponde al compuesto (I) según la presente invención a partir de un compuesto A-(1) como materia prima a través de múltiples etapas desde el Etapa A-(i) hasta la Etapa A-(xiv).

El compuesto A-(1) está disponible comercialmente.

Etapa A-(i):

10 Esta etapa es una etapa para obtener un compuesto A-(2) abriendo del epóxido A-(1) con un iluro de sulfonio para generar un alcóxido alílico intermedio que luego es alquilado para dar el compuesto A-(2). Los expertos en la técnica apreciarán que esta transformación puede llevarse a cabo en un solo recipiente o como dos reacciones individuales. Los expertos en la técnica apreciarán los beneficios y los inconvenientes de una reacción de un solo recipiente en comparación con llevar a cabo dos reacciones separadas y en consecuencia elegir el mejor método para sus requisitos.

15 Específicamente, el epóxido A-(1) puede ser abierto por el anión de yoduro de trimetilsulfonio y la pérdida resultante de sulfuro de dimetilo para dar el alcóxido alílico correspondiente. El yoduro de trimetilsulfonio se puede desprotonar con una base apropiada, por ejemplo butil-litio. El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no interfiera con la reacción. Ejemplos de disolventes adecuados incluyen THF. Los expertos en la técnica apreciarán que la palabra disolvente en este caso se usa para denotar el líquido en el que se efectúa la reacción, y que los reactivos pueden no disolverse. Preferiblemente, la reacción debería de llevarse a cabo por debajo de la temperatura ambiente, preferiblemente -30 - 20°C. Con la adición, la reacción se puede calentar hasta

20

temperatura ambiente para facilitar la reacción. El tiempo de reacción no está particularmente limitado y es por lo general 5 minutos a 24 horas, preferiblemente 1 - 6 horas.

Los expertos en la técnica apreciarán que el alcóxido generado a partir de esta reacción se puede hacer reaccionar con un agente alquilante directamente, tal como bromoacetato de terc-butilo, y que esta reacción puede proceder con o sin disolventes adicionales. Si se requieren disolventes adicionales para facilitar la reacción, entonces son adecuados disolventes tales como DMF o NMP. La temperatura de reacción no está particularmente limitada. Las temperaturas de reacción adecuadas incluyen temperatura ambiente hasta 80°C, preferiblemente temperatura ambiente. El tiempo de reacción no está particularmente limitado y es por lo general 5 minutos a 1 semana, preferiblemente 1 - 48 horas.

Los expertos en la técnica apreciarán que el alcóxido intermedio pueda ser paralizado, aislado y purificado luego sometido a condiciones de alquilación independientes. Esta reacción se puede llevar a cabo en las mismas condiciones como las que habitualmente se utilizan en la reacción de O-alquilación de un compuesto alcohólico (tal como las condiciones descritas en Tetrahedron Lett. 46 (2005) 45, 7751-7755). En esta reacción, el compuesto A-(2) se puede obtener mediante añadiendo una base tal como hidruro de sodio a una disolución del alcohol intermedio en THF para preparar un alcóxido, y después, por ejemplo, haciendo reaccionar el alcóxido con el bromoacetato de terc-butilo. El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción y permita que el material de partida se disuelva en el mismo hasta cierto punto. Ejemplos del disolvente incluyen disolventes tales como THF, DMF y sulfóxido de dimetilo. La reacción puede llevarse a cabo haciendo que 1 a 3 equivalentes de una base apropiada actúen en presencia del disolvente. Los ejemplos de la base usada incluyen hidruro de sodio, hidruro de potasio y t-butoxipotasio. El tiempo de reacción no está particularmente limitado y es por lo general 0,5 a 72 horas, y preferiblemente 0,5 a 12 horas. La temperatura de reacción es generalmente de -20°C a 50°C.

Un resultado más preferible, tal como un rendimiento mejorado, se puede lograr añadiendo una sal tal como yoduro de tetrabutilamonio en esta reacción.

Etapa A-(ii):

Esta etapa es una reacción secuencial de dos etapas para obtener el compuesto A-(3) a partir del compuesto A-(2) mediante la desprotección del grupo éster formando luego una amida de Weinreb.

Específicamente, el éster de terc-butilo del compuesto A-(2) se puede desproteger en las mismas condiciones como las usadas generalmente en la desprotección de un compuesto de éster de terc-butilo (tal como las condiciones descritas en un documento como TW Greene y P. G M. Wuts, "Protective Groups in Organic Chemistry", Tercera Edición, John Wiley & Sons (1999), p. 404-408). En esta reacción, el compuesto A-(2) se puede hacer reaccionar con un ácido apropiado en un disolvente adecuado, tal como ácido fórmico, como disolvente y ácido, por ejemplo. El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción y permita que el material de partida se disuelva en el mismo hasta cierto punto. El tiempo de reacción no está particularmente limitado y es por lo general 0,5 a 72 horas, y preferiblemente 0,5 a 24 horas. La temperatura de reacción es por lo general desde temperatura helada hasta 60°C.

El ácido intermedio puede transformarse luego en la amida de Weinreb (Tetrahedron Lett. 1981, 22, 3815) mediante la reacción de hidrocloreto de N,O-dimetilhidroxilamina bajo condiciones estándar de formación de amida, es decir, condensando el ácido intermedio con hidrocloreto de N,O-dimetilhidroxilamina usando un agente de condensación. Alternativamente, esta etapa es una etapa para obtener un compuesto A-(3) condensando el ácido intermedio con hidrocloreto de N,O-dimetilhidroxilamina por reacción de acilación.

La reacción de condensación del ácido intermedio con hidrocloreto de N,O-dimetilhidroxilamina usando un agente de condensación se puede llevar a cabo en las mismas condiciones como las usadas generalmente y descritas en los siguientes documentos. Los ejemplos del método conocido incluyen aquellos en Rosowsky et al.; J. Med. Chem., 34 (1), 227-234 (1991), Brzostwska et al.; Heterocycles, 32 (10), 1968-1972 (1991), y Romero et al.; J. Med. Chem., 37 (7), 998-1014 (1994).

El hidrocloreto de N,O-dimetilhidroxilamina puede ser una forma libre o una sal.

El disolvente en esta reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción. Los ejemplos del disolvente incluyen tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, acetato de etilo, acetato de metilo, diclorometano, cloroformo, N,N-dimetilformamida, tolueno, acetonitrilo y xileno. Los ejemplos del agente de condensación incluyen CDI (N,N'-carbonildiimidazol), Bop (hexafluorofosfato de 1H-1,2,3-benzotriazol-1-iloxi (tri(dimetilamino))fosfonio), WSC (hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), DCC (N,N-diciclohexilcarbodiimida), cianuro de dietilfosforilo, PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio) y EDC-HCl (hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). Las condiciones adecuadas incluyen un agente para activar el ácido, tal como N,N'-carbonil-diimidazol. Un equivalente a un gran exceso de hidrocloreto de N,O-dimetilhidroxilamina se usa con respecto al ácido intermedio. En caso necesario se puede agregar un equivalente a un gran exceso de una base orgánica tal como trietilamina.

El tiempo de reacción no está particularmente limitado y es por lo general 0,5 a 72 horas, y preferiblemente 0,5 a 24 horas. La temperatura de reacción varía según la materia prima usada, el disolvente y similares, y no está particularmente limitada. Es aceptable desde temperatura helada hasta temperatura de reflujo del disolvente, es preferible desde temperatura helada hasta temperatura ambiente.

5 Etapa A-(iii):

Esta etapa es una etapa para obtener un compuesto A-(4) por reacción de un reactivo organometálico (reactivo de aril-litio o reactivo de Grignard) con el compuesto A-(3) como se describe en Tetrahedron Lett. 1981, 22, 3815.

La reacción en esta etapa puede llevarse a cabo, por ejemplo, en las mismas condiciones como las descritas en Tetrahedron Lett. 1981, 22, 3815.

10 El reactivo de aril-litio (que incluye heterocíclico) o el reactivo de Grignard (que incluye heterocíclico) se puede preparar por un método conocido por una persona experta en la técnica. Específicamente, el reactivo de fenil-litio o el reactivo de fenil-magnesio (Grignard) correspondiente se puede preparar por intercambio halógeno-metal entre un compuesto de haluro de arilo y un reactivo organometálico comercialmente disponible, tal como un reactivo de alquil-litio como n-, sec- o terc-butil-litio o un reactivo de Grignard tal como bromuro de isopropilmagnesio, o magnesio metálico, por ejemplo.

15 El disolvente usado en esta etapa varía según el material de partida y el reactivo usado, y no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción, permita que el material se disuelva en el mismo hasta cierto punto, y siempre sea inerte durante la reacción. Los ejemplos preferibles del disolvente incluyen disolventes orgánicos tales como éter dietílico, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benceno y tolueno, y disolventes mixtos de los mismos. El tiempo de reacción no está particularmente limitado y es por lo general 0,1 a 48 horas, y preferiblemente 0,1 a 12 horas. La temperatura de reacción varía según el material de partida, el reactivo usado y similares, y preferiblemente se mantiene para estar por debajo de, por ejemplo, -78 a -60°C.

20 Etapa A-(iv):

Esta etapa es una etapa para obtener un compuesto A-(5) mediante la oximación del compuesto A-(4).

25 La reacción en esta etapa se puede llevar a cabo en las mismas condiciones como las que habitualmente se usan en la reacción de oximación de un compuesto carbonilo, tal como las condiciones descritas en Org. Lett. 9 (2007) 5, 753-756, Tetrahedron: Asymmetry 5 (1994) 6, 1018-1028 y Tetrahedron 54 (1998) 22, 5868-5882.

30 Específicamente, el compuesto A-(5) se puede obtener haciendo reaccionar el compuesto A-(4) con hidroxilamina o una sal de hidroxilamina (tal como hidrocloreto de hidroxilamina o sulfato de hidroxilamina) en presencia de una base o en ausencia de una base, por ejemplo.

35 El disolvente usado en esta reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción. Los ejemplos preferibles del disolvente incluyen disolventes orgánicos tales como etanol, metanol, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano y diclorometano, y mezclas de estos disolventes y agua. Los ejemplos de la base usada incluyen acetato de sodio, piridina, hidróxido de sodio, hidróxido de cesio, hidróxido de bario y 2,6-lutidina. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 5 minutos a 24 horas, y preferiblemente 5 minutos a 12 horas. La temperatura de reacción es generalmente -20°C hasta la temperatura de reflujo del disolvente, y más preferiblemente 0°C hasta la temperatura de reflujo del disolvente.

Etapa A-(v):

40 Esta etapa es una etapa para obtener un compuesto A-(6) mediante una cicloadición intramolecular térmica de la alquilenil oxima A-(5).

La reacción se lleva a cabo en presencia de un aditivo, por ejemplo hidroquinona.

45 El disolvente usado en esta reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción. Los disolventes de reacción adecuados incluyen disolventes de alto punto de ebullición tal como xilenos. La temperatura de reacción no está particularmente limitada y es por lo general 80 - 200°C o la temperatura de reflujo del disolvente. El tiempo de reacción no está particularmente limitado y es por lo general 0,5 a 48 horas, y preferiblemente 0,5 a 24 horas.

Etapa A-(vi):

Esta etapa es una etapa para obtener un compuesto A-(7) sometiendo el compuesto A-(6) a la reacción de escisión reductora del enlace N-O.

50 La reacción de escisión reductora del enlace N-O se puede llevar a cabo bajo las condiciones de uso de zinc-ácido ácido acético, por ejemplo un catalizador metálico tal como hidrógeno-óxido de platino, o hidruro de litio y aluminio.

La reacción que usa zinc, tal como zinc-ácido acético, puede llevarse a cabo en las mismas condiciones como las descritas en J. Org. Chem. 2003, 68, 1207-1215 y Org. Lett. 7 (2005) 25, 5741-5742, por ejemplo. Los ejemplos del ácido usado incluyen ácido acético, ácido fórmico y ácido clorhídrico. El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción y permita que el material de partida se disuelva en el mismo hasta cierto punto. Los ejemplos del: disolvente incluyen metanol, etanol, 1,4-dioxano, THF y agua. El ácido anterior también se puede usar como disolvente. La temperatura de reacción es generalmente -20°C hasta la temperatura de reflujo del disolvente, y preferiblemente temperatura helada hasta temperatura de reflujo del disolvente. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 5 minutos a 48, horas, y preferiblemente 5 minutos a 24 horas.

La reacción que usa un catalizador metálico, tal como hidrógeno-óxido de platino, se puede llevar a cabo en las mismas condiciones como las descritas en Tetrahedron: Asymmetry 5 (1994) 6, 1018-1028 y Tetrahedron, vol. 53, No. 16, p. 5752-5746, 1997, por ejemplo. El compuesto A-(7) se puede obtener por hidrogenación del compuesto A-(6) usando óxido de platino como catalizador en un disolvente tal como metanol, por ejemplo.

La reacción que usa hidruro de litio y aluminio se puede llevar a cabo en las mismas condiciones como las descritas en Bull. Chem. Soc. Jpn., 66, 2730-2737 (1993), por ejemplo. El compuesto A-(7) se puede obtener reduciendo el compuesto A-(6) usando hidruro de litio y aluminio en un disolvente tal como éter, por ejemplo.

#### Etapa A-(vii):

Esta etapa es una etapa para obtener un compuesto A-(8) a partir del compuesto A-(7). El derivado de tiourea A-(8) se puede obtener del compuesto A-(7) mediante un método conocido por una persona experta en la técnica.

El compuesto A-(8) se puede obtener en esta etapa haciendo reaccionar el compuesto A-(7) con isotiocianato de benzoílo en un disolvente tal como diclorometano o tolueno. Esta reacción se puede llevar a cabo en las mismas condiciones como las descritas en J. Med. Chem. 1990, 33, 2393-2407, por ejemplo. El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción y permita que el material de partida se disuelva en el mismo hasta cierto punto. Los ejemplos del disolvente incluyen diclorometano, cloroformo, tolueno, 1,4-dioxano y THF. La temperatura de reacción es generalmente -20°C hasta la temperatura de reflujo del disolvente, y preferiblemente temperatura helada hasta temperatura de reflujo del disolvente. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 5 minutos a 48 horas, y preferiblemente 5 minutos a 24 horas.

#### Etapa A-(viii):

Esta etapa es un método para obtener un compuesto A-(9) ciclando el compuesto A-(8).

En esta reacción, el compuesto A-(8) puede ser ciclado bajo diferentes condiciones para obtener el compuesto A-(9) activando el alcohol del compuesto A-(8).

Por ejemplo, el compuesto A-(9) se puede obtener en esta reacción calentando el compuesto A-(8) en un disolvente tal como metanol en presencia de un ácido, tal como ácido clorhídrico concentrado, por ejemplo. El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción y permita que el material de partida se disuelva en el mismo hasta cierto punto. Los ejemplos del disolvente incluyen disolventes tales como metanol, etanol, 1-propanol y agua, disolventes mixtos de los mismos, y ácidos usados como un disolvente. La reacción se puede llevar a cabo usando un equivalente a un gran exceso de un ácido apropiado para actuar en presencia o ausencia del disolvente. Los ejemplos del ácido usado incluyen ácido clorhídrico concentrado, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico y mezclas de los mismos. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 0,5 a 72 horas, y preferiblemente 0,5 a 24 horas. La temperatura de reacción es generalmente temperatura helada hasta temperatura de reflujo del disolvente.

Alternativamente, el compuesto A-(9) se puede obtener haciendo reaccionar el compuesto A-(8) con anhídrido trifluorometanosulfónico en un disolvente tal como diclorometano en presencia de una base tal como piridina. El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción y permita que el material de partida se disuelva en el mismo hasta cierto punto. Los expertos en la técnica apreciarán que no siempre se requiere un disolvente y que la reacción también se puede llevar a cabo en ausencia de un disolvente, por ejemplo cuando la base es piridina. Los ejemplos del disolvente incluyen disolventes tales como diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, THF, 1,2-dimetoxietano y tolueno, y disolventes mixtos de los mismos. La reacción se puede llevar a cabo usando 1 a 20 equivalentes de una base apropiada en tal disolvente. Los ejemplos de la base usada incluyen piridina, 2,6-lutidina, carbonato de sodio, carbonato de potasio y mezclas de los mismos. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 0,5 a 24 horas, y preferiblemente 0,5 a 12 horas. La temperatura de reacción es generalmente -78°C hasta temperatura ambiente.

#### Etapa A-(ix):

Esta etapa es un método para obtener el compuesto A-(10) desprotegiendo el grupo protector del compuesto A-(9). El compuesto A-(10) se puede obtener bajo condiciones de desprotección conocidas por una persona experta en la técnica.

5 Cuando el grupo protector es un grupo benzoilo, el compuesto A-(10) se puede obtener en esta reacción calentando el compuesto A-(9) en un disolvente tal como metanol en presencia de una base tal como DBU, por ejemplo. Esta reacción se puede llevar a cabo, por ejemplo, en las mismas condiciones como las descritas en Synth. Commun. 32 (2), 265-272 (2002). El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción y permita que el material de partida se disuelva en el mismo hasta cierto punto. Los ejemplos del disolvente incluyen disolventes tales como metanol, etanol y 1-propanol. La reacción se puede llevar a cabo usando 10 1 a 20 equivalentes de una base apropiada en tal disolvente. Los ejemplos de la base usada incluyen DBU. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 0,5 a 24 horas, y preferiblemente 0,5 a 12 horas. La temperatura de reacción es generalmente temperatura ambiente a temperatura de reflujo del disolvente.

15 Como alternativa, el compuesto A-(10) se puede obtener en esta reacción calentando el compuesto A-(9) con una base inorgánica, tal como carbonato de potasio, por ejemplo. El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción y permita que el material de partida se disuelva en el mismo hasta cierto punto. Los ejemplos del disolvente incluyen disolventes tales como metanol, etanol y 1-propanol. La reacción se puede llevar a cabo usando 1 a 20 equivalentes de una base apropiada en el disolvente, y preferiblemente se usa un ligero exceso. Los ejemplos de la base usada incluyen carbonato de potasio. El tiempo de reacción no está particularmente limitado y es por lo general 0,5 a 24 horas, y preferiblemente 0,5 a 12 horas. La temperatura de reacción es generalmente temperatura ambiente a temperatura de reflujo del disolvente, y preferiblemente 50 - 100°C. Los expertos en la técnica apreciarán que el disolvente seleccionado limitará la temperatura de reacción por su temperatura de reflujo. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen metanol a reflujo.

Etapa A-(x):

25 Esta etapa es una etapa para obtener el compuesto A-(11) mediante la reacción de nitración del compuesto A-(10). En esta reacción de nitración, el compuesto A-(11) se puede obtener a partir del compuesto A-(10) mediante un método conocido por una persona experta en la técnica. Los ejemplos del agente nitrante usado en la reacción incluyen nitrato de potasio/ácido sulfúrico concentrado, ácido nítrico fumante/ácido sulfúrico concentrado, y ácido nítrico fumante/anhidrido acético. Los disolventes adecuados para la reacción incluyen ácido trifluoroacético. La temperatura de reacción no está particularmente limitada, y es por lo general -20°C a temperatura ambiente, y las temperaturas de reacción preferibles incluyen 0 - 10°C.

Etapa A-(xi):

Esta etapa es una etapa para obtener un compuesto A-(12) mediante t-butoxicarbonilación del grupo amino del compuesto A-(11).

35 La reacción se puede llevar a cabo en las mismas condiciones como las usadas generalmente en la t-butoxicarbonilación de un amino compuesto, tal como las condiciones descritas en un documento tal como T. W. Greene y P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Chemistry", Tercera Edición, John Wiley & Sons (1999), p. 518-525. El compuesto A-(12) se puede obtener haciendo reaccionar el compuesto A-(11) con dicarbonato de di-terc-butilo usando un disolvente tal como tetrahidrofurano, por ejemplo. Los disolventes alternativos incluyen acetónitrilo y DMF. Los expertos en la técnica apreciarán que también se puede añadir una base a la mezcla de reacción, aunque no es esencial. Los ejemplos adecuados de una base incluyen, pero no se limitan a, trietilamina y diisopropiletilamina. La temperatura de reacción no está particularmente limitada, y es por lo general temperatura ambiente hasta reflujo, y preferiblemente temperatura ambiente hasta 60°C.

Etapa A-(xii):

45 Esta etapa es una etapa para obtener un compuesto A-(13) a partir del compuesto A-(12). El compuesto A-(13) se sintetiza reduciendo el nitro compuesto A-(12) mediante un método de síntesis conocido por una persona experta en la técnica. Los ejemplos del método incluyen reducción mediante hidrogenación catalítica usando un catalizador de metal noble tal como níquel Raney, paladio, rutenio, rodio o platino. Otros reactivos reductores incluyen cloruro de estaño, por ejemplo. Los ejemplos del disolvente incluyen disolventes alcohólicos tales como metanol, etanol y 1-propanol, preferiblemente etanol. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 0,5 a 24 horas, y preferiblemente 0,5 a 18, horas. La temperatura de reacción es por lo general temperatura ambiente. Las condiciones alternativas de reacción de reducción incluyen la reacción con hierro con un aditivo tal como cloruro de amonio o ácido clorhídrico, en un disolvente alcohólico tal como etanol, a una temperatura de reacción apropiada, por ejemplo, 65°C.

55 Etapa A-(xiii):

Esta es una etapa para obtener un compuesto A-(14) a partir del compuesto A-(13) condensando el compuesto A-(13) con un ácido carboxílico y un agente de condensación. La reacción de condensación se puede llevar a cabo en

las mismas condiciones como las usadas generalmente y descritas en los siguientes documentos. Los ejemplos del método conocido incluyen aquellos en Rosowsky et al.; J. Med. Chem., 34 (1), 227-234 (1991), Brzostwska et al.; Heterocycles, 32 (10), 1968-1972 (1991), y Romero et al.; J. Med. Chem., 37 (7), 998-1014 (1994).

El compuesto A-(13) puede ser una forma libre o una sal.

5 El disolvente en esta reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción. Los ejemplos del disolvente incluyen tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, acetato de etilo, acetato de metilo, diclorometano, cloroformo, N,N'-dimetilformamida, tolueno, acetonitrilo y xileno. Los ejemplos del agente de condensación incluyen CDI (N,N'-carbonildiimidazol), Bop (hexafluorofosfato de 1H-1,2,3-benzotriazol-1-iloxi(tri(dimetilamino))fosfonio), WSC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), DCC (N,N-diciclohexilcarbodiimida), cianuro de dietilfosforilo, PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitri(pirrolidino)fosfonio) y EDC-HCl (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). Las condiciones adecuadas incluyen un agente para activar el ácido, tal como N,N'-carbonil-diimidazol. Se puede usar un equivalente a un gran exceso del ácido con respecto al compuesto A-(13). Se puede añadir un equivalente a un gran exceso de una base orgánica, tal como trietilamina o N,N-diisopropilamina, en caso necesario.

10  
15 El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 0,5 a 72 horas, y preferiblemente 0,5 a 24 horas. La temperatura de reacción varía según la materia prima usada, el disolvente y similares, y no está particularmente limitada. Es aceptable temperatura helada hasta temperatura de reflujo del disolvente, es preferible temperatura helada hasta temperatura ambiente.

20 Alternativamente, el compuesto A-(14) se puede obtener convirtiendo el ácido carboxílico deseado en el cloruro de ácido correspondiente, y haciendo reaccionar después el cloruro de ácido con el compuesto A-(13). El cloruro de ácido se puede sintetizar mediante un medio conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, el ácido carboxílico deseado se puede convertir en el cloruro de ácido correspondiente mediante reacción con cloruro de tionilo en presencia o ausencia de un disolvente, por ejemplo diclorometano, N,N'-dimetilimidazolin-2-ona, NMP o DMF. Se puede usar uno a dos equivalentes o un gran exceso de cloruro de tionilo con respecto al ácido carboxílico deseado. La temperatura de reacción es -30°C hasta reflujo, y preferiblemente -10°C hasta temperatura ambiente. El cloruro de ácido también se puede formar tratando el ácido con cloruro de oxalilo en un disolvente tal como diclorometano en presencia de DMF. La temperatura de reacción es -30°C hasta temperatura ambiente, y preferiblemente -10°C hasta temperatura ambiente.

30 Alternativamente, el compuesto A-(14) se puede obtener convirtiendo el ácido carboxílico deseado en un anhídrido de ácido mixto y haciendo reaccionar después el anhídrido de ácido mixto con el compuesto A-(13). El anhídrido de ácido mixto se puede sintetizar por medios conocidos por un experto en la técnica. La síntesis se lleva a cabo haciendo reaccionar el ácido carboxílico deseado con un cloroformiato, tal como cloroformiato de etilo, en presencia de una base, por ejemplo como trietilamina. Se usa uno a dos equivalentes del cloroformiato y la base con respecto al ácido carboxílico deseado. La temperatura de reacción es -30°C hasta temperatura ambiente, y preferiblemente -20°C hasta temperatura ambiente.

35 El etapa de condensación del anhídrido de ácido mixto con el compuesto A-(13) se lleva a cabo haciendo reaccionar el anhídrido de ácido mixto con el compuesto A-(13) en un disolvente tal como diclorometano, tetrahidrofurano o N,N-dimetilformamida, por ejemplo. Se usa un equivalente a un gran exceso del ácido carboxílico deseado con respecto al compuesto A-(13).

40 El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 0,5 a 48 horas, y preferiblemente 0,5 a 12 horas. La temperatura de reacción es -20°C hasta 50°C, y preferiblemente -20°C hasta temperatura ambiente.

45 Alternativamente, el compuesto A-(14) se puede obtener convirtiendo el ácido carboxílico deseado en un éster activo y haciendo reaccionar después el éster activo con el compuesto A-(13). La etapa para obtener el éster activo se lleva a cabo haciendo reaccionar el ácido carboxílico deseado con un reactivo de la síntesis del éster activo en un disolvente tal como 1,4-dioxano, tetrahidrofurano o N,N-dimetilformamida, en presencia de un agente de condensación tal como DCC, por ejemplo. Los ejemplos del reactivo de la síntesis del éster activo incluyen N-hidroxisuccinimida. Se usa uno a 1,5 equivalentes del reactivo de la síntesis del éster activo y el agente de condensación con respecto al compuesto A-(13). El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 0,5 a 48 horas, y preferiblemente 0,5 a 24 horas.

50 La temperatura de reacción es de -20°C hasta 50°C, y preferiblemente -20°C hasta temperatura ambiente.

55 La etapa de condensación del éster activo con el compuesto A-(13) se lleva a cabo haciendo reaccionar el éster activo con el compuesto A-(13) en un disolvente tal como diclorometano, tetrahidrofurano o N,N-dimetilformamida, por ejemplo. Se usa un equivalente a un gran exceso del éster activo con respecto al compuesto A-(13). El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 0,5 a 48 horas, y preferiblemente 0,5 a 24 horas. La temperatura de reacción es -20°C a 50°C, y preferiblemente -20°C a temperatura ambiente.

Etapa A-(xiv):

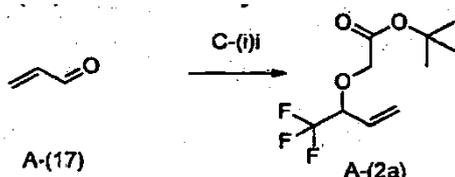


emplean un método para eliminar el ácido clorhídrico formado de este modo. El ácido clorhídrico formado en esta reacción puede afectar o no a la selectividad de la reacción que puede dar lugar o no a un resultado beneficioso. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 0,5 a 48 horas, y preferiblemente 0,5 a 12 horas. La temperatura de reacción es -30°C hasta reflujo, y preferiblemente -10°C hasta temperatura ambiente. El cloruro de ácido también se puede formar tratando el ácido con cloruro de oxalilo en un disolvente tal como diclorometano en presencia de DMF. La temperatura de reacción es -30°C hasta temperatura ambiente, y preferiblemente -10°C hasta temperatura ambiente.

#### C. Método de Preparación General C:

El Método de Preparación General C es un método alternativo para preparar un compuesto A-(2) que es un intermedio sintético del compuesto (I) según la presente invención a partir de un compuesto A-(17) como una materia prima a través del Etapa C-(i).

El compuesto A-(17) está disponible comercialmente.



#### Etapa i:

Esta etapa es una etapa para obtener un compuesto A-(2a) a partir de A-(17) añadiendo un anión trifluorometilo al compuesto A-(17) para generar un alcóxido alílico intermedio o trimetilsilil éter intermedio que entonces se alquila para dar el compuesto A-(2a). Los expertos en la técnica apreciarán que esta transformación puede llevarse a cabo en un solo recipiente o como dos reacciones individuales. Los expertos en la técnica apreciarán los beneficios y desventajas de una reacción de un solo recipiente en comparación con llevar a cabo dos reacciones separadas, y en consecuencia elegirán el mejor método para sus requerimientos.

Específicamente, la acroleína A-(17) puede reaccionar con un anión trifluorometilo que se puede generar mediante la acción de fluoruro a reactivos tales como (trifluorometil)trimetilsilano para generar el alcóxido alílico o trimetilsilil éter alílico correspondiente. El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no interfiera con la reacción. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen THF. Los intervalos de temperatura aceptables para la reacción incluyen -10°C hasta reflujo del disolvente, preferiblemente por debajo de la temperatura ambiente. Los expertos en la técnica apreciarán que ciertas reacciones químicas pueden ser exotérmicas, y que se deben de tomar las medidas de control para controlar estas reacciones exotérmicas. Los expertos en la técnica también apreciarán que la reacción exotérmica se puede controlar permitiendo el reflujo del disolvente. Los precursores adecuados para generar un anión trifluorometilo incluyen, pero no se limitan a, (trifluorometil)trimetilsilano (reactivo de Rupert, Chem. Rev. 1997, 97, 757), y las fuentes de fluoruro adecuadas incluyen, pero no se limitan a, fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF), difluorotriphenilsilicato de tetrabutilamonio (TBAT) y fluoruro de cesio. Aunque la temperatura de reacción inicial puede estar por debajo de la temperatura ambiente, es aceptable permitir que la temperatura de reacción alcance el reflujo del disolvente durante el curso de la reacción para facilitar la reacción. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 5 minutos a 24 horas, preferiblemente 1 - 6 horas.

Los expertos en la técnica apreciarán que el alcóxido generado a partir de esta reacción se puede hacer reaccionar directamente con un agente alquilante, tal como bromoacetato de terc-butilo, y que esta reacción puede transcurrir con o sin disolventes adicionales. Si se requieren disolventes adicionales para facilitar la reacción, entonces son apropiados disolventes tales como DMF o NMP. La temperatura de reacción no está particularmente limitada. Las temperaturas de reacción adecuadas incluyen temperatura ambiente hasta 80°C, preferiblemente temperatura ambiente. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 5 minutos a 1 semana, preferiblemente 1 - 48 horas. Alternativamente, la reacción de alquilación se puede llevar a cabo en condiciones de transferencia de fases, por ejemplo añadiendo una base acuosa, por ejemplo hidróxido de sodio acuoso. Los expertos en la técnica apreciarán que cuando se apliquen estas condiciones, se requiere el uso de un catalizador de transferencia de fases. Los catalizadores de transferencia de fases adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidrogenosulfato de tetrabutilamonio.

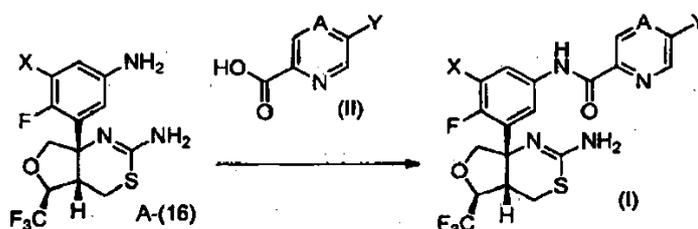
Los expertos en la técnica apreciarán que el alcóxido intermedio se puede enfriar, aislar y purificar luego sometido a condiciones de alquilación independientes. Esta reacción se puede llevar a cabo en las mismas condiciones que las que generalmente se usan en la reacción de O-alquilación de un compuesto alcohólico (tal como las condiciones descritas en Tetrahedron Lett. 46 (2005) 45, 7751-7755). En esta reacción, el compuesto A-(2a) se puede obtener añadiendo una base tal como hidruro de sodio a una disolución del alcohol intermedio en THF para preparar un alcóxido, y haciendo reaccionar entonces el alcóxido con el bromoacetato de terc-butilo, por ejemplo. El disolvente usado en la reacción no está particularmente limitado en la medida en que no inhiba la reacción y permita que el

material de partida se disuelva en el mismo hasta cierto punto. Los ejemplos del disolvente incluyen disolventes tales como THF, DMF y sulfóxido de dimetilo. La reacción se puede llevar a cabo haciendo que 1 a 3 equivalentes de una base apropiada actúen en presencia de tal disolvente. Los ejemplos de la base usada incluyen hidruro de sodio, hidruro de potasio y t-butoxipotasio. El tiempo de reacción no está particularmente limitado, y es por lo general 0,5 a 72 horas, y preferiblemente 0,5 a 12 horas. La temperatura de reacción es generalmente -20°C a 50°C.

Se puede lograr un resultado más preferible, tal como un rendimiento mejorado, añadiendo una sal tal como yoduro de tetrabutilamonio en esta reacción.

Los expertos en la técnica apreciarán que esta reacción genera un nuevo centro quiral en el compuesto A-(2a) y que el compuesto A-(2a) es el mismo que el compuesto A-(2), excepto que el compuesto A-(2) es enantioméricamente puro mientras que el compuesto A-(2a) es racémico. Se apreciará por los expertos en la técnica que el compuesto enantioméricamente puro A-(2) y el compuesto racémico A-(2a) son indistinguibles mediante técnicas analíticas, tales como RMN y cromatografía de líquidos; sin embargo, son distinguibles por HPLC quiral. Los expertos en la técnica apreciarán los métodos más apropiados para obtener el enantiómero deseado del compuesto A-(2a) o un intermedio sintético más avanzado o compuesto final. Los métodos apropiados y las etapas apropiadas de purificación de enantiómeros incluyen aquellos como se detallan en los ejemplos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (I), que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula A-(16), en el que X se define en la fórmula (I), con un compuesto de fórmula (II) en el que A e Y son como se definen en la fórmula (I), o un éster de alquilo de C<sub>1-6</sub>, anhídrido de ácido o haluro de ácido del mismo, para dar un compuesto de fórmula (I), y opcionalmente convertir el compuesto en un compuesto adicional de fórmula (I), o formar una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



La reacción de A-(16) y (II) se puede llevar a cabo convenientemente en un disolvente (tal como tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, acetato de etilo, acetato de metilo, diclorometano, cloroformo, N,N-dimetilformamida, tolueno, acetonitrilo o xileno) a una temperatura en el intervalo de -30°C a 100 °C. En una realización de la invención, el compuesto (II) puede tomar convenientemente la forma de un haluro de ácido (por ejemplo, cloruro) como se puede preparar haciendo reaccionar el ácido con un reactivo adecuado (por ejemplo, cloruro de tionilo).

Se apreciará por los expertos en la técnica que en el procedimiento de la presente invención ciertos grupos funcionales, tales como grupos hidroxilo, carboxilo o amino, en los reactivos de partida, puedan necesitar ser protegidos por grupos protectores. Por lo tanto, la preparación de los compuestos de fórmula (I) puede implicar adicionalmente la incorporación y eliminación de uno o más grupos protectores. La protección y desprotección de grupos funcionales se describe por ejemplo en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Chemistry, Tercera Edición", John Wiley & Sons (1999).

La presente invención se describirá más específicamente a continuación con referencia a los Ejemplos, los Ejemplos de Preparación y los Ejemplos de Ensayo. Sin embargo, la presente invención no está limitada a los mismos. Las abreviaturas usadas en los Ejemplos son abreviaturas convencionales conocidas por un experto en la técnica. Algunas abreviaturas se muestran a continuación:

LCMS, LC/MS y LC-MS (cromatografía de líquidos / espectrometría de masas); MS (espectrometría de masas); MDAP (purificación automática dirigida por masas); RMN (resonancia magnética nuclear), s, d, t, dd, m, br (singlete, doblete, triplete, doblete de dobletes, multiplete, ancho); Ph, Me, Et, Pr, Bu, Bn (fenilo, metilo, etilo, propilo, butilo, bencilo); THF (tetrahidrofurano); DCM (diclorometano); DMF (N,N-dimetilformamida); h, hr, hrs (horas); EDC y EDAC (hidrocloruro de N-3-(dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida); DMAP (4-N,N-dimetilaminopiridina); DMSO (dimetilsulfóxido); UV (ultravioleta); RT y rt (temperatura ambiente); Rt (tiempo de retención); min y mins (minutos); EtOAc (acetato de etilo); Et<sub>2</sub>O (éter dietílico); MeCN (acetonitrilo); EtOH (etan'ol); MeOH (metanol); PhCH<sub>3</sub> y PhMe (tolueno); TLC (cromatografía de capa fina); TFA (ácido trifluoroacético); NaOH (hidróxido de sodio); HCl (ácido clorhídrico); NMP (N-metilpirrolidinona o 1-metil-2-pirrolidinona); HPLC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento); TBAF (fluoruro de tetrabutilamonio); BuLi (n-butillitio); PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)fosfonio; Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>: tris(dibencilidenacetona)dipaladio; Pd(t-Bu<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>: bis(tri-t-butilfosfina)paladio; TFA: ácido trifluoroacético; PTLC: cromatografía de capa fina preparativa; HRMS (espectrometría de masas de alta resolución); Tr o Trt (trilito o trifenilmetilo).

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  se registró en un espectrómetro Bruker serie AM que funciona a una frecuencia (reportada) de 400 MHz. Los desplazamientos químicos en los espectros de resonancia magnética nuclear de protón se registran en unidades  $\delta$  (ppm) con respecto a tetrametilsilano, y las constantes de acoplamiento (J) se dan en hercios (Hz). Los patrones se designan como s: singlete, d: doblete, t: triplete, a: ancho.

- 5 La "temperatura ambiente" en los siguientes Ejemplos y en los Ejemplos de Preparación se refiere generalmente a aproximadamente 10 °C a aproximadamente 35°C. "%" indica % en peso a menos que se especifique de otro modo.

Los nombres químicos se generan a partir de estructuras químicas usando ChemBioDraw Ultra 11.0 y 12.0.

Descripción de las figuras:

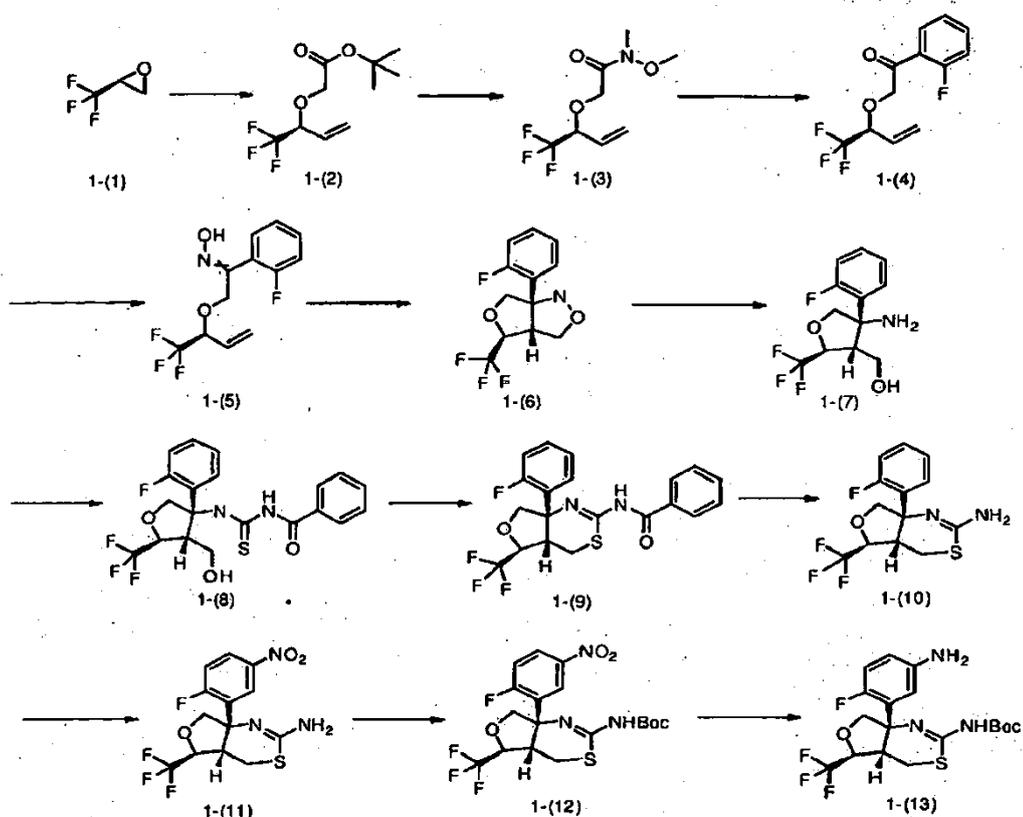
La Figura 1 es un cromatograma típico de un aislamiento mediante HPLC quiral del compuesto 1-(20).

## 10 Ejemplo 1 de Preparación

Síntesis de ((4a*S*,5*S*,7a*S*)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)carbamato de *tert*-butilo 1-(13)

1-(2) Síntesis de {(2*S*)-1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il]oxi}acetato de *tert*-butilo

- 15 A una suspensión de yoduro de trimetilsulfonio (110 g) en THF (500 ml) a -30°C se añadió hexametildisilazida de litio (530 ml, 1N en THF) en porciones durante 45 min. Tras agitar a -20°C durante 20 min., se añadió (S)-2-trifluorometiloxirano (37,97 g) a la misma temperatura durante 15 min., y la mezcla se dejó calentar hasta RT y se agitó durante 3 h. La suspensión se añadió entonces en porciones a una disolución enfriada con hielo de bromoacetato de *tert*-butilo (105,68 g) en NMP (200 ml). La mezcla resultante se dejó calentar hasta RT y agitar durante 2 días, antes de diluir con EtOAc (1 l). La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio (sat., ac., 4 x 400 ml), se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (5% de EtOAc en hexanos) para obtener el compuesto del título (70,1 g), que se usó en la etapa subsiguiente sin purificación. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 1,30 (s, 9 H) 3,83 - 3,96 (m, 2 H) 4,14 - 4,21 (m, 1 H) 5,34 - 5,48 (m, 2 H) 5,56 - 5,71 (m, 1 H)



- 25 1-(3) Síntesis de (S)-N-metoxi-N-metil-2-(1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)acetamida

Se disolvió {(2*S*)-1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il]oxi}acetato de *tert*-butilo (70,1 g, bruto) en ácido fórmico enfriado con hielo (200 ml). La mezcla se dejó calentar hasta RT y agitar toda la noche. La mezcla de reacción se concentró entonces a presión reducida, se añadió tolueno (200 ml), la mezcla se concentró, antes de una segunda adición de

- tolueno (200 ml) y concentración hasta un aceite. El residuo se disolvió en DCM (600 ml), se enfrió en un baño de hielo, y se añadió N,N'-carbonil diimidazol (35 g) en porciones durante 20 min. Tras agitar durante 45 min., se añadió hidrocloreuro de N,O-dimetil hidroxilamina (22 g), y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta RT y agitar toda la noche. Después se añadieron NaHCO<sub>3</sub> saturado (500 ml) y salmuera (250 ml), y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 750 ml). Las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (1% hasta 30% de EtOAc en hexanos) para obtener el compuesto del título (25,17 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 3,21 (s, 3 H), 3,71 (m, 3 H), 4,36 - 4,51 (m, 3 H), 5,54 - 5,69 (m, 2 H), 5,84 (ddd, J=17,7, 10,4, 7,3 Hz, 1 H) 1-(4)
- 1-(4) Síntesis de (S)-1-(2-fluorofenil)-2-((1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)etanona
- 10 Una disolución de n-butil-litio en hexano (2,50 M; 90 ml) se añadió gota a gota durante 25. min. a una disolución de 2-bromofluorobenceno (40,35 g) en THF (250 ml) en una atmósfera de N<sub>2</sub> a -78°C. La disolución de la reacción se dejó calentar hasta -60°C y agitar durante 60 min. Se añadió gota a gota (S)-N-metoxi-N-metil-2-((1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)acetamida (40 g) en THF (25 ml) a la disolución de la reacción, y tras agitar a -60°C durante 2 h, se añadió NH<sub>4</sub>Cl acuoso (100 ml) a la disolución de la reacción, seguido de calentamiento hasta RT. Se añadió salmuera (200 ml) a la disolución de la reacción, y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 400 ml). Las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporaron, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (1% hasta 10% de EtOAc en hexanos) para obtener el compuesto del título (33,59 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 4,40 (quinteto, J 6,3 Hz, 1 H) 4,81- 4,87 (m, 2 H), 5,54 - 5,69 (m, 2 H), 5,86 (ddd, J 17,4, 10,4, 7,3 Hz, 1 H) 7,12 - 7,22 (m, 1 H) 7,24-7,34 (m, 1 H) 7,54 - 7,63 (m, 1 H) 7,94 - 8,02 (m, 1 H).
- 15 1-(5) Síntesis de oxima de la (S)-1-(2-fluorofenil)-2-((1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)etanona
- Se disolvió (S)-1-(2-fluorofenil)-2-((1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)etanona (41,22 g) en metanol anhidro (400 ml), y se añadieron hidrocloreuro de hidroxilamina (14,0 g) y acetato de sodio (19,0 g). La mezcla de reacción se calentó hasta 50°C durante 90 min., después se enfrió hasta RT, se concentró a vacío, y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (2% hasta 15% de EtOAc en hexanos) para producir el compuesto del título como una mezcla de isómeros geométricos (40,54 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 4,04-4,15 (m, 0,8 H), 4,18 - 4,26 (m, 0,2 H), 4,44 - 4,57 (m, 0,4 H) 4,79 - 4,90 (m, 1,6 H) 5,37 - 5,56 (m, 2 H) 5,64-5,78 (m, 1 H) 7,03 - 7,26 (m, 2 H) 7,33 - 7,54 (m, 2 H), 7,90 (s a, 0,2 H), 8,51 (s a, 0,8 H).
- 20 1-(6) Síntesis de (3aR,4S,6aS)-6a-(2-fluorofenil)-4-(trifluorometil)hexahidrofuro[3,4-c]isoxazol
- Se disolvió oxima de la (S)-1-(2-fluorofenil)-2-((1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)etanona (40,54 g) en xilenos (400 ml) y hidroquinona (4,0 g) se añadió. La mezcla de reacción se calentó hasta reflujo (temperatura del bloque de calentamiento 140°C) durante 22 h, después se enfrió y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (1% hasta 30% de EtOAc en hexanos) para obtener el compuesto del título (28,76 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 3,71-3,81 (m, 1H), 4,04 - 4,35 (m, 4 H), 4,51-4,62 (m, 1 H), 5,38-5,54 (m, 1H), 7,07 - 7,26 (m, 2 H), 7,32 - 7,42 (m, 1 H), 7,54-7,67 (m, 1 H).
- 30 1-(7) ((2S,3R,4S)-4-amino-4-(2-fluorofenil)-2-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)metanol
- Se disolvió (3aR,4S,6aS)-6a-(2-fluorofenil)-4-(trifluorometil)hexahidrofuro[3,4-c]isoxazol (28,76 g) en ácido acético (200 ml), y la disolución se enfrió hasta 0°C. Se añadió cinc (50 g), y la mezcla de reacción se dejó calentar y agitar a RT durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó entonces con EtOAc (500 ml) y se filtró a través de celite, lavando con otros 500 ml de EtOAc. Las porciones orgánicas combinadas se evaporaron, se disolvieron en cloroformo (200 ml), y se añadió lentamente amoníaco (28% ac., 250 ml). Las capas se separaron, y la porción acuosa se extrajo adicionalmente con cloroformo (2 x 250 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporaron para producir el compuesto del título (31,12 g), que se usó en la etapa subsiguiente sin purificación adicional. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2,93 (ddd, J=7,7, 4,9, 2,5 Hz, 1 H), 3,84 (dd, J=12,4, 4,8 Hz, 1 H), 4,05 (dd, J=9,2, 3,2 Hz, 1H), 4,17 (dd, J=12,4, 2,3 Hz, 1 H), 4,31 (d, J=9,3 Hz, 1H), 4,72 (quin, J=7,3 Hz, 1H), 7,13 (ddd, J=13,1, 8,8, 1,3 Hz, 1 H), 7,22 (td, J=7,6, 1,3 Hz, 1 H), 7,31 - 7,40 (m, 1 H), 7,51 (td, J=8,0, 1,6 Hz, 1 H)
- 35 1-(8) Síntesis de N-(((3S,4R,5S)-3-(2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)-5-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)carbamotioil)benzamida
- Se añadió isotiocianato de benzoilo (19,0 ml) a una disolución que contiene ((2S,3R,4S)-4-amino-4-(2-fluorofenil)-2-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)metanol (28,72 g) en DCM (150 ml), y la mezcla se agitó a RT durante 18 h. Después se añadió bicarbonato de sodio (sat., ac., 200 ml), la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 300 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (5% hasta 30% de EtOAc en hexanos) para obtener el compuesto del título (37,07 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 3,22 (dd, J=8,1, 4,5 Hz, 1 H), 3,31 (td, J=8,0, 3,0 Hz, 1 H), 3,94 - 4,07 (m, 1 H), 4:31 - 4,46 (m, 1 H), 4,53 (d, J=9,9 Hz, 1 H), 4,83 (d, J=9,9 Hz, 1 H), 6,97 - 7,14 (m, 1 H), 7,22 (td, J=7,7, 1,3 Hz, 1 H), 7,31 - 7,45 (m, 1 H), 7,49 - 7,61 (m, 2 H), 7,61 - 7,70 (m, 1 H), 7,75 (td, J=8,1, 1,5 Hz, 1 H), 7,79 - 7,93 (m, 2 H), 8,90 (s, 1H), 11,85 (s, 1 H)
- 50
- 55

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

Se disolvió N-(((3S,4R,5S)-3-(2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)-5-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)carbamoil)benzamida (31,1 g) en piridina (150 ml), y la mezcla se enfrió hasta -20°C. Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (14,0 ml) gota a gota durante 30 min., y la reacción se dejó calentar hasta 0°C. Tras agitar durante 2 h, la reacción se paralizó mediante la adición de cloruro de amonio (sat., ac., 400 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se concentraron a vacío y se purificaron mediante cromatografía en columna en gel de sílice (2% hasta 30% de EtOAc/hex) para obtener el compuesto del título (18,50 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,86 (dd, J=13,9, 3,5 Hz, 1H), 3,25 (d, J=13,6 Hz, 1H), 3,61 (s a, 1 H), 4,00 - 4,10 (m, 1H), 4,66 (d, J=8,8 Hz, 1 H), 4,78 - 4,87 (m, 1H), 7,12 - 7,60 (m, 6 H), 7:68 - 7,73 (m, 1H), 7,99 - 8,16 (s a, 2 H), 8,62 - 8,66 (m, 1H)

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

Se disolvió N-((4aS,5S,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (21,5 g) en metanol (160 ml), se añadió 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (16,29 g), y la disolución se calentó hasta reflujo (temperatura del bloque de calentamiento 80°C). Después de 16 h, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (10% hasta 60% de EtOAc en hexanos) para producir el compuesto del título (13,82 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDC13) δ ppm 2,85 (dd, J=13,6, 3,8 Hz, 1 H), 3,14 (dd, J=13,5, 3,2 Hz, 1 H), 3,33 - 3,45 (m, 1 H), 3,92 (dd, J=8,1, 2,0 Hz, 1 H), 4,49 (s a, 2 H), 4:63 - 4,76 (m, 2 H), 7,08 (ddd, J=12,6, 8,1, 1,0 Hz, 1 H), 7,13 - 7,22 (m, 1 H), 7,25 - 7,36 (m, 1 H), 7,44 (td, J=8,0, 1,9 Hz, 1 H)

1-(11) Síntesis de (4aS,5S,7aS)-7a-(2-fluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina

Se disolvió N-((4aS,5S,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (5,15 g) en TFA (75 ml), y la disolución se enfrió hasta 0°C. Se añadió ácido sulfúrico (conc., 20 ml), seguido de ácido nítrico fumante (2 ml) gota a gota durante 20 min. Tras agitar a 0°C durante 90 min., la mezcla de reacción se vertió en hielo (200 g) y se basificó hasta pH 12 con NaOH 6N (ac.). Después de dejar que el hielo se derritiese, la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml), y las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron para producir el compuesto del título (22,1 g, pureza aprox. 71%), que se usó en la etapa subsiguiente sin purificación. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,89 (d, J=3,8 Hz, 1 H), 3,09 (s a, 1 H), 3,28 - 3,54 (m, 1 H), 3,80 - 4,03 (m, 1 H), 4,50 - 4,70 (m, 3 H), 4,71 - 4,86 (m, 1H), 7,21 - 7,30 (m, 1H), 8,18 - 8,28 (m, 1 H), 8,45 (dd, J=6,8, 2,8 Hz, 1 H)

1-(12) Síntesis de ((4aS,5S,7aS)-7a-(2-fluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)carbamato de *terc*-butilo

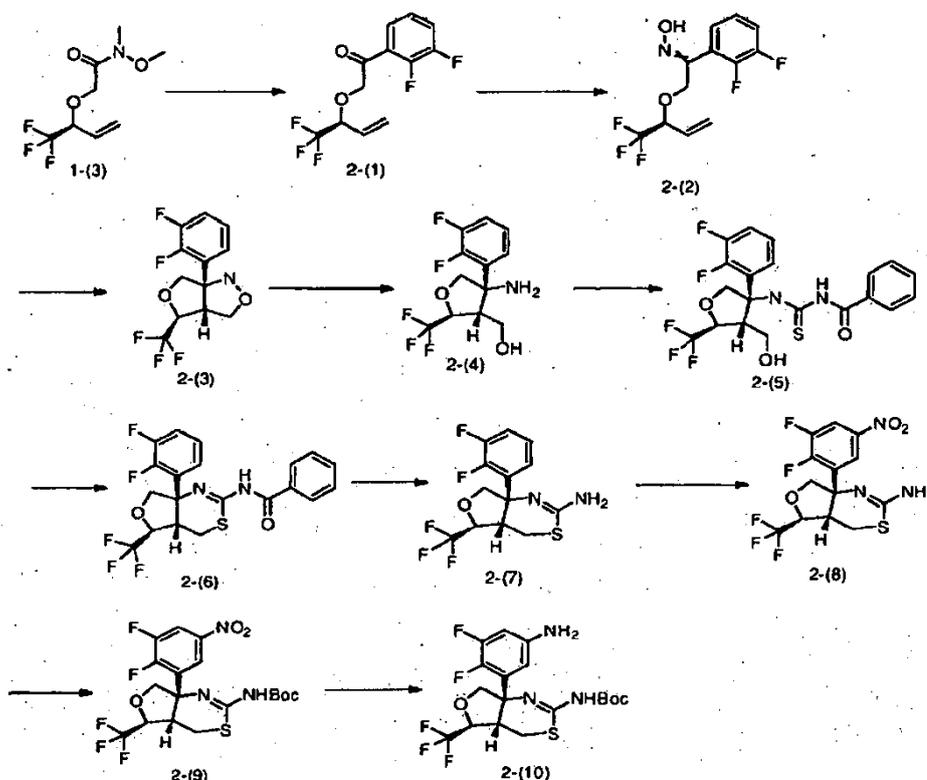
Se disolvió (4aS,5S,7aS)-7a-(2-fluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (20,6 g, bruto) en THF (300 ml), se añadió dicarbonato de di-*terc*-butilo (12 g) en porciones durante 20 min., y la mezcla de reacción se calentó hasta 60°C. Se añadieron porciones adicionales de dicarbonato de di-*terc*-butilo (10 g) hasta que el material de partida se consumió mediante TLC. La mezcla de reacción se enfrió, y se añadieron bicarbonato de sodio (sat., ac., 200 ml) y salmuera (200 ml). Después, la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml), y las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (10% hasta 25% de EtOAc en hexanos) para producir el compuesto del título (16,62 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 1,55 (s, 9 H), 2,73 - 2,84 (m, 1 H), 2,92 - 3,05-(m, 1 H), 3,43 - 3,55 (m, 1 H), 3,81 - 3,94 (m, 1H), 4,57 (d, J=8,3 Hz, 1 H), 4,73 - 4,83 (m, 1 H), 7,19 - 7,39 (m, 2 H), 8,20 - 8,29 (m, 1H), 8,32 (d, J=6,8 Hz, 1 H)

1-(13) Síntesis de ((4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)carbamato de *terc*-butilo

Se disolvió ((4aS,5S,7aS)-7a-(2-fluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)carbamato de *terc*-butilo (16,61 g) en etanol (250 ml), y se añadió cloruro de estaño dihidratado (25,0 g). Tras agitar a RT durante 18 h, la disolución se vertió en NaOH (2N ac., 300 ml), y se añadió celite<sup>®</sup> (-50 g). La mezcla resultante se filtró a través de más celite<sup>®</sup> y se extrajo con EtOAc (2 x 500 ml). Las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron para producir el compuesto del título (15,52 g). Este material se podría usar bruto, pero se purificó una porción mediante cromatografía en columna en gel de sílice (20% hasta 50% de EtOAc en hexanos) para producir material puro (79% de recuperación). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 1,53 (s, 9H), 2,77 (d, J=14,4 Hz, 1H), 3,09 (s a, 1H), 3,46 (s a, 1H), 3,62 (s a, 2H), 3,87 (s a, 1H), 4,61 (d, J=8,6 Hz, 1H), 4,71 (s a, 1H), 6,61 (s a, 2H), 6,85 - 6,95 (m, 1H)

## Ejemplo 2 de Preparación

Síntesis de ((4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)carbamato de *terc*-butilo 2-(10)



2-(1) Síntesis de (S)-1-(2,3-difluorofenil)-2-((1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)etanona

- 5 Una disolución de *n*-butil-litio en hexano (2,50 M, 13,5 ml) se añadió gota a gota durante 20 min. a una disolución que contiene 1-bromo-2,3-difluorobenceno (6,50 g) en Et<sub>2</sub>O (50 ml) en una atmósfera de N<sub>2</sub> a -78°C. La disolución de la reacción se dejó agitar durante 60 min. Después se añadió gota a gota (S)-*N*-metoxi-*N*-metil-2-((1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)acetamida) (5,20 g) en Et<sub>2</sub>O (10 ml) a la disolución de la reacción, y tras agitar a -78°C durante 1 h, se añadió NH<sub>4</sub>Cl acuoso (50 ml) a la disolución de la reacción, seguido de calentamiento hasta RT. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> (sat. ac., 100 ml) a la disolución de la reacción, y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporaron, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (1% hasta 10% de EtOAc en hexanos) para obtener el compuesto del título (3,91 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 4,33 - 4,43 (m, 1H), 4,80 - 4,84 (m, 2 H), 5,55-5,67 (m, 2 H), 5,76 - 5,94 (m, 1 H), 7,18 - 7,28 (m, 1 H), 7,37 - 7,47 (m, 1 H), 7,70 (ddt, J=7,9, 6,0, 1,7 Hz, 1H)

15 2-(2) Síntesis de oxima de la (S)-1-(2,3-difluorofenil)-2-((1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)etanona

- Se disolvió (S)-1-(2,3-difluorofenil)-2-((1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)etanona (3,91 g) en metanol anhidro (40 ml), y se añadieron hidrocloreto de hidroxilamina (1,25 g) y acetato de sodio (1,68 g). La mezcla de reacción se calentó hasta 50°C durante 90 min., después se enfrió hasta RT, se concentró a vacío, y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (2% hasta 20% de EtOAc en hexanos) para producir el compuesto del título como una mezcla de isómeros geométricos (4,10 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 4,04-4,26 (m 1 H), 4,43 - 4,55 (m, 0,4 H) 4,80 - 4,89 (m, 1,6 H) 5,39 - 5,55 (m, 2 H) 5,64-5,80 (m, 1H) 7,05 - 7,30 (m, 3 H), 7,76 (s a, 0,2 H), 8,30 (s a, 0,8 H).

2-(3) Síntesis de (4S)-6a-(2,3-difluorofenil)-4-(trifluorometil)hexahidrofuro[3,4-c]isoxazol

- 25 Se disolvió oxima de la (S)-1-(2,3-difluorofenil)-2-((1,1,1-trifluorobut-3-en-2-il)oxi)etanona (4,10 g) en xilenos (40 ml), y se añadió hidroquinona (380 mg). La mezcla de reacción se calentó hasta reflujo (temperatura del bloque de calentamiento 140°C) durante 20 h, después se enfrió y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (1% hasta 25% de EtOAc en hexanos) para obtener el compuesto del título (3,16 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 3,77 (s a, 1H), 3,99 - 4,16 (m, 1H), 4,16 - 4,22 (m, 1H), 4,22-4,44 (m, 2H), 4,51 (d, J=9,9 Hz, 1H), 5,44 (s, 1H), 7,07 - 7,24 (m, 2H), 7,38 (s a, 1H)

30 2-(4) Síntesis de ((2S,3R,4S)-4-amino-4-(2,3-difluorofenil)-2-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)metanol

Se disolvió (4S)-6a-(2,3-difluorofenil)-4-(trifluorometil)hexahidrofuro[3,4-c]isoxazol(3,16 g) en ácido acético (20 ml), y la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C. Se añadió cinc (5,0 g), y la reacción se dejó calentar y agitar a RT durante 20 h. La mezcla de reacción se diluyó entonces con EtOAc (50 ml) y se filtró a través de celite®, lavando con otros 100 ml de EtOAc. Las porciones orgánicas combinadas se evaporaron, se disolvieron en CHCl<sub>3</sub> (20 ml), y se añadió lentamente amoníaco (28% ac., 25 ml). Las capas se separaron, y la porción acuosa se extrajo adicionalmente con CHCl<sub>3</sub> (2 x 25 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporaron para producir el compuesto del título (3,12 g), que se usó en la etapa subsiguiente sin purificación adicional. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,93 (ddd, J=7,8, 5,1, 2,8 Hz, 1H), 3,85 (dd, J=12,4, 5,1 Hz, 1H), 4,03 (dd, J=9,1, 2,8 Hz, 1H), 4,14 (dd, J=12,3, 2,7 Hz, 1H), 4,35 (d, J=9,1 Hz, 1H), 4,68 (quin, J=7,3 Hz, 1H), 7,09 - 7,25 (m, 2H), 7,25 - 7,34 (m, 1H)

2-(5) Síntesis de N-(((3S,4R,5S)-3-(2,3-difluorofenil)-4-(hidroximetil)-5-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)carbamotioil)benzamida

Se añadió isotiocianato de benzoilo (2,0 ml) a una disolución que contiene ((2S,3R,4S)-4-amino-4-(2,3-difluorofenil)-2-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)metanol (3,12 g) en DCM (20 ml), y la mezcla se agitó a RT durante 18 h. Después se añadió bicarbonato de sodio (sat., ac., 50 ml), la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 75 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (5% hasta 40% de EtOAc en hexanos) para obtener el compuesto del título (4,18 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 3,12 (dd, J=7,6, 4,3 Hz, 1H), 3,18 - 3,29 (m, 1H), 4,03 (ddd, J=12,3, 7,2, 4,5 Hz, 1H), 4,35 - 4,49 (m, 1H), 4,59 (d, J=9,9 Hz, 1H), 4,81 (d, J=9,6 Hz, 1H), 7,07 - 7,23 (m, 2H), 7,49 (t, J=7,2 Hz, 1H), 7,56 (t, J=7,7 Hz, 2H), 7,67 (t, J=7,5 Hz, 1H), 7,88 (d, J=7,1 Hz, 2H), 8,92 (s, 1H), 11,89 (s, 1H)

2-(6) Síntesis de N-((4aS,5S,7aS)-7a-(2,3-difluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida

Se disolvió N-(((3S,4R,5S)-3-(2,3-difluorofenil)-4-(hidroximetil)-5-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)carbamotioil)benzamida (2,99 g) en piridina (14 ml), y la mezcla se enfrió hasta -20°C. Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (1,55 ml) gota a gota durante 10 min., y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta -10°C. Tras agitar durante 2 h, se añadió una porción adicional de anhídrido trifluorometanosulfónico (1,0 ml) gota a gota durante 10 min., la reacción se agitó durante otras 2 h, y después se paralizó mediante adición de cloruro de amonio (sat., ac., 50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se concentraron a vacío y se purificaron mediante cromatografía en columna en gel de sílice (5% hasta 20% de EtOAc/hex) para obtener el compuesto del título (1,20 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,86 (d, J=10,6 Hz, 1H), 3,20 (s a, 1H), 3,55 (s a, 1H), 4,04 (s a, 1H), 4,65 (d, J=8,8 Hz, 1H), 4,81 (s a, 1H), 7,06 - 7,24 (m, 3H), 7,40 - 7,64 (m, 3H), 7,82 - 8,21 (m, 2H)

2-(7) Síntesis de (4aS,5S,7aS)-7a-(2,3-difluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina

Se disolvió N-((4aS,5S,7aS)-7a-(2,3-difluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (2,00 g) en metanol (250 ml), se añadió 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (1,53g), y la disolución se calentó hasta reflujo (temperatura del bloque de calentamiento 80°C). Después de 3 h, la mezcla de reacción se vertió en hielo (50 g) y se basificó hasta pH 12 con NaOH 2 N (ac.). Después de dejar que el hielo se derritiese, la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporaron, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (0% hasta 50% de EtOAc en hexanos) para producir el compuesto del título (1,42 g). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,86 (dd, J=13,6, 3,8 Hz, 1H), 3,15 (dd, J=13,8, 3,2 Hz, 1H), 3,27 - 3,42 (m, 1H), 3,93 (dd, J=8,2, 1,9 Hz, 1H), 4,39 - 4,78 (m, 4H), 6,96 - 7,25 (m, 3H)

2-(8) Síntesis de (4aS,5S,7aS)-7a-(2,3-difluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina

Se disolvió (4aS,5S,7aS)-7a-(2,3-difluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (1,42 g) en TFA (6 ml), y la disolución se enfrió hasta 0°C. Se añadió ácido sulfúrico (conc., 1 ml), seguido de ácido nítrico fumante (0,30 ml) gota a gota durante 20 min. Tras agitar a 0°C durante 1 h, la mezcla de reacción se vertió en hielo (50 g) y se basificó hasta pH 12 con NaOH 2 N (ac.). Después de dejar que el hielo se derritiese, la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 75 ml), y las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron para producir el compuesto del título (1,91 g, pureza aprox. 80%), que se usó en la etapa subsiguiente sin purificación. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,88 (dd, J=13,8, 3,9 Hz, 1H), 3,11 (dd, J=13,6, 2,8 Hz, 1H), 3,37 (dt, J=7,4, 3,5 Hz, 1H), 3,93 (d, J=7,8 Hz, 1H), 4,53-4,83 (m, 4H), 8,09 (ddd, J=9,0, 6,3, 2,9 Hz, 1H), 8,27 (dt, J=5,2, 2,6 Hz, 1H)

2-(9) Síntesis de ((4aS,5S,7aS)-7a-(2,3-difluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)carbamato de *tert*-butilo

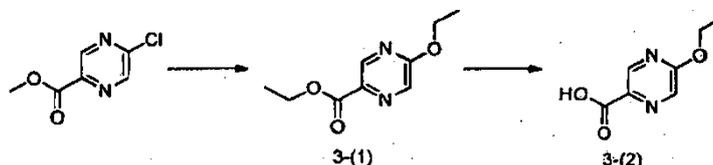
Se disolvió (4aS,5S,7aS)-7a-(2,3-Difluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (1,91 g, bruta) en THF (10 ml), se añadió dicarbonato de di-*tert*-butilo (1,3 g) en porciones durante 20 min., y la mezcla de reacción se calentó hasta 65°C. Después de 3 h, la mezcla de reacción se enfrió, y se añadió

bicarbonato de sodio (sat., ac., 50 ml). Después, la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 750 ml), y las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (0% hasta 20% de EtOAc en hexanos) para producir el compuesto del título (1,43g bruto, en una mezcla con la versión bis-boc).

5 2-(10) Síntesis de ((4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2,3-difluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)carbamato de *terc*-butilo

La mezcla bruta obtenida en el ejemplo 2-(9) de preparación que contiene ((4aS,5S,7aS)-7a-(2,3-difluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)carbamato de *terc*-butilo (1,43 g) se disolvió en etanol (25 ml), y se añadió cloruro de estaño dihidratado (2,50 g). Tras agitar durante 18 h, la disolución se vertió en NaOH (2N ac., 100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporaron y se purificaron mediante cromatografía en columna en gel de sílice (0% hasta 30% de EtOAc en hexanos) para producir, en primer lugar, el producto bis-boc (730 mg), y, en segundo lugar, el compuesto del título (300 mg). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 1,53 (s, 9 H), 2,76 (dd, J=13,9, 3,8 Hz, 1 H), 3,08 (d, J=13,6 MHz, 1 H), 3,36 - 3,45 (m, 1 H), 3,71 (s a, 2 H), 3,90 (d, J=8,3 Hz, 1 H), 4,57 (d, J=8,6 Hz, 1 H), 4,68 - 4,79 (m, 1H), 6,30 - 6,37 (m, 1H), 6,42 - 6,49 (m, 1H)

**Ejemplo 3 de preparación: Síntesis de ácido 5-etoxipirazin-2-carboxílico (3-(2))**



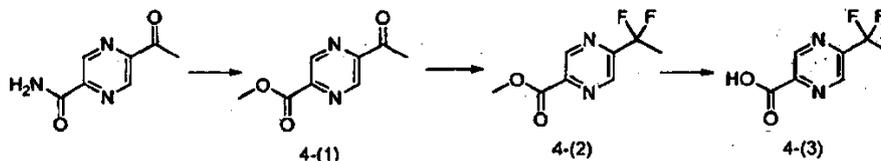
Síntesis de 5-etoxipirazin-2-carboxilato de etilo 3-(1)

Una disolución agitada de 5-cloropirazin-2-carboxilato de metilo (0,50 g) en etanol (10 ml) se enfrió hasta 0°C, y se añadió etóxido de sodio (disolución al 21% p/p en etanol, 1 ml) durante 10 min. Tras dejar calentar hasta RT y agitar durante 2 h, se añadió agua (100 ml), y la mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 150 ml). Las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron para producir el compuesto del título. (0,65 g, pureza aprox. 85%). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 1,45 (t, J=7,1 Hz, 3 H), 1,46 (t, J=7,1 Hz, 3 H), 4,48 (c, J=7,1 Hz, 2 H), 4,49 (c, J=7,1 Hz, 2 H), 8,28 (d, J=1,3 Hz, 1 H), 8,88 (d, J=1,3 Hz, 1H)

25 Síntesis de ácido 5-etoxipirazin-2-carboxílico 3-(2)

Se disolvió 5-etoxipirazin-2-carboxilato de etilo (0,65 g, pureza aprox. 85%) en dioxano (3 ml), y se añadió agua (3 ml), seguido de hidróxido de litio monohidratado (255 mg, en porciones durante 10 min.). Tras agitar a RT durante 24 h, se añadieron Et<sub>2</sub>O (25 ml) y NaHCO<sub>3</sub> (sat., ac., 25 ml). Las capas se separaron, y la capa orgánica se extrajo con NaOH (1 N, ac., 25 ml). Las porciones acuosas combinadas se acidificaron con HCl 6N hasta pH 2, y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 40 ml). Los extractos de EtOAc combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron para producir el compuesto del título como un polvo blancuzco. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 1,47 (t, J=7,1 Hz, 3 H), 4:53 (c, J=7,1 Hz, 2 H), 8,16 (d, J=1,2 Hz, 1 H), 8,98 (d, J=1,2 Hz, 1H)

**Ejemplo 4 de preparación: Síntesis de ácido 5-etoxipirazin-2-carboxílico (4-(3))**



35 5-Acetilpirazin-2-carboxilato de metilo 4-(1)

Se disolvió 5-acetilpirazin-2-carboxamida (3,275 g) en HCl metanólico (1,25 N, 150 ml), y la mezcla de reacción se calentó hasta reflujo y se agitó toda la noche. Tras enfriar, se añadió bicarbonato de sodio, y la mezcla se extrajo con EtOAc. La capa de EtOAc se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó para producir el compuesto del título (3,79 g, pureza aprox. 90%). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,788 (s, 3 H), 4,10 (s, 3 H), 9,33 (d, J=1,5 Hz, 1 H), 9,36 (d, J=1,5 Hz, 1 H)

5-(1,1-Difluoroetil)pirazin-2-carboxilato de metilo 4-(2)

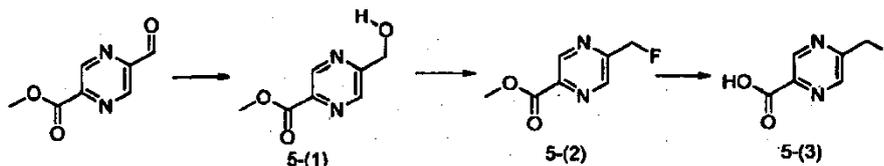
Se disolvió 5-acetilpirazin-2-carboxilato de metilo (300 mg, pureza aprox. 90%) en DCM (15 ml) y se enfrió hasta 0°C bajo nitrógeno. Se añadió trifluoruro de bis(2-metoxietil)aminoazufre (0,61 ml) gota a gota, y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta RT y agitar toda la noche. Se añadió cuidadosamente bicarbonato de sodio (sat., ac.), y la mezcla se extrajo con DCM. Las porciones orgánicas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporaron y se purificaron

mediante cromatografía en gel de sílice (35% de EtOAc en hexano) para producir el compuesto del título (155 mg) como un sólido blanco. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,00 (t,  $J=18,8$  Hz, 3 H), 4,01 (s, 3 H), 8,98 (d,  $J=1,5$  Hz, 1 H), 9,24 (d,  $J=1,5$  Hz, 1 H)

Ácido 5-(1,1-difluoroetil)pirazin-2-carboxílico 4-(3)

- 5 Se disolvió 5-(1,1-difluoroetil)pirazin-2-carboxilato de metilo (0,65 g, pureza aprox. 85%) en dioxano (2 ml), y se añadió agua (2 ml), seguido de hidróxido de litio monohidratado (54 mg, en porciones). Tras agitar a RT durante 90 min., la mezcla se concentró hasta 2 ml, y se añadió  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 ml). La mezcla se extrajo entonces con NaOH (1 N, ac., 20 ml), y las porciones acuosas se acidificaron con HCl 6N hasta pH 2. La porción acuosa se extrajo entonces con EtOAc, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó para producir el compuesto del título como un sólido blanco (119 mg). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,11 (t,  $J=18,8$  Hz, 3 H), 9,01 (d,  $J=1,3$  Hz, 1 H), 9,47 (d,  $J=1,3$  Hz, 1 H)

**Ejemplo 5 de preparación: Síntesis de ácido 5-(fluorometil)pirazin-2-carboxílico (5-(3))**



**5-(Hidroximetil)pirazin-2-carboxilato de metilo 5-(1)**

- 15 A una disolución de 5-formilpirazin-2-carboxilato de metilo (2,47 g) en THF (20 ml) se añadió borohidruro de sodio (170 mg) en porciones durante 10 min. Tras agitar durante 1 h, se añadió metanol (10 ml). La mezcla de reacción se agitó durante otros 20 min., y después se añadieron HCl (1 N, ac., 20 ml) y salmuera (20 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 40 ml), y las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporaron para producir el compuesto del título (1,31 g). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 4,07 (s, 3 H), 4,98 (s, 2 H), 8,80 (s, 1 H), 9,27 (s, 1 H)

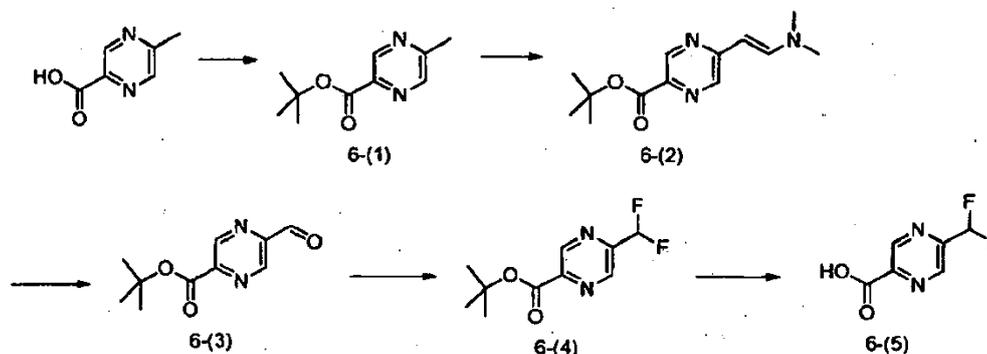
20 5-(Fluorometil)pirazin-2-carboxilato de metilo 5-(2)

- 25 A una disolución de 5-(hidroximetil)pirazin-2-carboxilato de metilo (0,64 g) en THF (20 ml) se añadió trietilamina (2,30 g), y la disolución se enfrió hasta  $0^\circ\text{C}$ . Después se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (1,22 g) seguido de fluoruro de nonafluorobutanilosulfonilo (2,28 g) gota a gota durante 5 min. Tras calentar hasta RT y agitar durante 2 h, se añadió  $\text{NaHCO}_3$  (sat., ac., 100 ml), y la mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml). Las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se evaporaron, y se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice (5% hasta 50% de EtOAc en hexano) para producir el compuesto del título (94 mg). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 4,07 (s, 3 H), 5,67 (d,  $J=46,5$  Hz, 2 H), 8,89 (s, 1 H), 9,28 (s, 1 H)

Ácido 5-(fluorometil)pirazin-2-carboxílico 5-(3)

- 30 Se disolvió 5-(fluorometil)pirazin-2-carboxilato de metilo (94 mg) en dioxano (1 ml), y se añadió agua (1 ml), seguido de hidróxido de litio monohidratado (60 mg). Tras agitar a RT durante 18 h, se añadió  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 ml), y la mezcla se extrajo entonces con NaOH (1 N, ac., 2 x 20 ml). Las porciones acuosas se acidificaron con HCl 6N hasta pH 1, se extrajeron con EtOAc (2 x 40 ml), las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , y se evaporaron para producir el compuesto del título como un sólido blanco (71 mg). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 5,70 (d,  $J=46,2$  Hz, 2 H), 8,85 (s, 1 H), 9,40 (s, 1 H)

35 **Ejemplo 6 de preparación: Síntesis de ácido 5-difluorometilpirazin-2-carboxílico (6-(5))**



Síntesis de 5-metilpirazin-2-carboxilato de t-butilo 6-(1)

Un complejo de trifluoruro de boro-éter dietílico (91,7  $\mu$ l) se añadió gota a gota a una suspensión de ácido 2-metilpirazin-5-carboxílico (1 g) y 2,2,2-tricloroacetimidato de terc-butilo (4,75 g) en THF (20 ml) con enfriamiento con hielo. La disolución de la reacción se calentó hasta RT, seguido de agitación durante 2 h. Se añadieron una disolución saturada de NaCl y EtOAc a la disolución de la reacción, y la capa orgánica se separó. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, y la materia insoluble se separó mediante filtración. El filtrado se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice para obtener el compuesto del título (1,4 g). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 1,65 (s, 9H), 2,65 (s, 3H), 8,57 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 9,10 (d, J = 1,6 Hz, 1H).

Síntesis de 5-((E)-2-dimetilamino-vinil)-pirazin-2-carboxilato de t-butilo 6-(2)

Una mezcla de 5-metilpirazin-2-carboxilato de t-butilo (1,35 g), DMF (25 ml) y dimetilacetal de N,N-dimetilformamida (25 ml) se agitó a 130°C durante 5 h. La disolución de la reacción se enfrió hasta RT y se diluyó con EtOAc. La mezcla se lavó con una disolución saturada de NaCl tres veces. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, y la materia insoluble se separó mediante filtración. El filtrado se concentró, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice para obtener el compuesto del título (648 mg). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 1,63 (s, 9H), 3,00 (s, 6H), 5,16 (d, J = 12,8 Hz, 1H), 7,72 (d, J = 12,8 Hz, 1H), 8,16 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 8,81 (d, J = 1,6 Hz, 1H).

Síntesis de 5-formilpirazin-2-carboxilato de t-butilo 6-(3)

Se añadió peryodato de sodio (1,67 g) a una disolución de 5-((E)-2-dimetilamino-vinil)-pirazin-2-carboxilato de t-butilo (645 mg) en THF al 50%-agua (26 ml), y la mezcla se agitó a RT durante 4 h. Se añadieron una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y EtOAc a la disolución de la reacción, y la capa orgánica se separó. La capa orgánica se lavó con una disolución saturada de NaCl y se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. La materia insoluble se separó mediante filtración, y el filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice para obtener el compuesto del título (249 mg). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 1,68 (s, 9H), 9,25 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 9,36 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 10,2 (s, 1H).

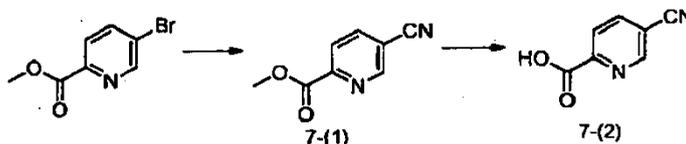
Síntesis de 5-difluorometilpirazin-2-carboxilato de t-butilo 6-(4)

Se añadió trifluoruro de [bis(2-metoxietil)amino]azufre (662  $\mu$ l) gota a gota a una disolución de 5-formilpirazin-2-carboxilato de t-butilo (249 mg) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12 ml) en una atmósfera de N<sub>2</sub> con enfriamiento con hielo. La disolución de la reacción se agitó durante 2 h mientras se volvía gradualmente hasta RT. Se añadieron una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y EtOAc a la disolución de la reacción, y la capa orgánica se separó. La capa orgánica se lavó con una disolución saturada de NaCl y se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. La materia insoluble se separó mediante filtración, y el filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice para obtener el compuesto del título (175 mg). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 1,67 (s, 9H), 6,75 (t, J = 54,4 Hz, 1H), 9,02 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 9,25 (d, J = 0,8 Hz, 1H).

Síntesis de ácido 5-difluorometilpirazin-2-carboxílico 6-(5)

Se añadió ácido trifluoroacético (1 ml) a una disolución de 5-difluorometilpirazin-2-carboxilato de t-butilo (175 mg) en diclorometano (1 ml), y la mezcla se agitó a RT durante 5 h. Se añadieron éter y NaOH 5 N a la disolución de la reacción. La capa acuosa se separó y se hizo ácida con ácido clorhídrico 5 N. Se añadió EtOAc a la capa acuosa, y la capa orgánica se separó. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, y la materia insoluble se separó mediante filtración. El filtrado se concentró para obtener el compuesto del título (100 mg). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 6,80 (t, J = 54,4 Hz, 1H), 9,02 (s, 1H), 9,47 (s, 1H).

**Ejemplo 7 de preparación: Síntesis de ácido 5-cianopiridin-2-carboxílico (7-(2))**



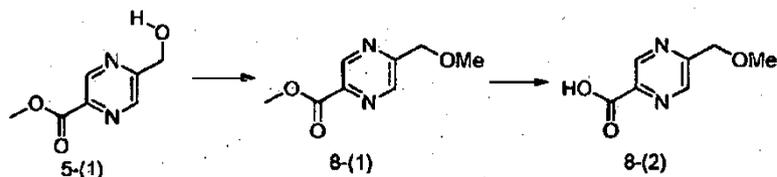
Síntesis de 5-cianopiridin-2-carboxilato de metilo 7(1)

Una mezcla de 5-bromopiridin-2-carboxilato de metilo (2,8 g) y cianuro de cobre (3,6 g) en NMP (30 ml) se calentó con agitación a 170°C durante 1,5 h. Se añadió agua a la disolución de la reacción a RT, y la materia insoluble se eliminó mediante filtración. El filtrado se extrajo con EtOAc. El extracto se lavó con una disolución saturada de NaCl y después se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El agente de secado se eliminó mediante filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida. El producto bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (sistema de EtOAc-heptano) para obtener el compuesto del título (920 mg). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 4,06 (s, 3H), 8,16 (dd, J = 2,0,8,0 Hz, 1H), 8,27 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 9,01 (d, J = 2,0 Hz, 1H).

Síntesis de ácido 5-cianopiridin-2-carboxílico 7-(2)

Una disolución del compuesto del Ejemplo 13-(1) de Preparación (920 mg) y una disolución 5 N de NaOH (2,26 ml) en etanol (30 ml) se agitaron a RT durante 10 min. Se añadió ácido clorhídrico 5 N (5,2 ml) a la disolución de la reacción a RT, seguido de extracción con EtOAc. El extracto se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El agente de secado se eliminó mediante filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (800 mg). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 8,18 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 8,51 (dd, J = 2,0, 8,0 Hz, 1H), 9,12-9,18 (m, 1H).

#### Ejemplo 8 de preparación: Síntesis de ácido 5-(metoximetil)pirazin-2-carboxílico (8-(2))



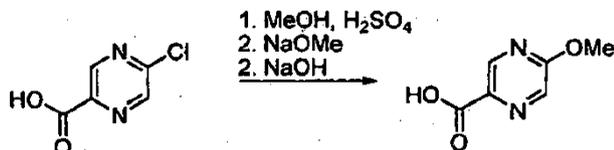
#### Síntesis de 5-(metoximetil)pirazin-2-carboxilato de metilo 8-(1)

El compuesto obtenido en el ejemplo de preparación 5-(1) (279 mg) se disolvió en DMF, y la disolución se enfrió hasta 0°C. Se añadió hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 70 mg), seguido de yodometano (250 mg). Tras 2 días, se añadió agua (25 ml), y la disolución se extrajo con EtOAc (100 ml). La capa acuosa se saturó con NaCl, y se extrajo adicionalmente con EtOAc (2 x 50 ml). Las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporaron, y se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice (30% hasta 50% de EtOAc en hexanos) para producir el compuesto del título (55 mg, pureza aprox. 65%). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 3,55 (s, 3 H), 4,05 (s, 3 H), 4,72 (s, 2 H), 8,84 (d, J=1,0 Hz, 1 H), 9,25 (d, J=1,0 Hz, 1 H)

#### Síntesis de ácido 5-(metoximetil)pirazin-2-carboxílico 8-(2)

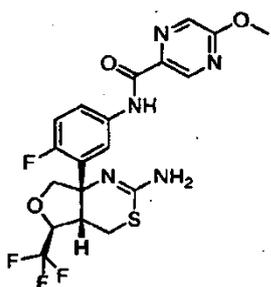
Se disolvió 5-(metoximetil)pirazin-2-carboxilato de metilo, 8-(1), (55 mg, bruto) en 1,4-dioxano (1 ml), y se añadió agua (1 ml) seguido de hidróxido de litio monohidratado (50 mg). Tras agitar a RT durante 1 h, se añadió agua (20 ml), y la mezcla se extrajo con éter (20 ml). La porción acuosa se acidificó hasta pH 2 y se extrajo con EtOAc (2 x 25 ml). Las capas de EtOAc combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron para producir el compuesto del título (19 mg). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 3,58 (s, 3 H), 4,77 (s, 2 H), 8,80 (s a, 1 H), 9,38 (s a, 1 H)

#### Ejemplo 9 de preparación: Ácido 5-metoxipirazin-2-carboxílico



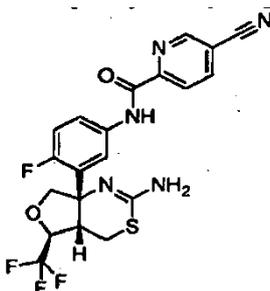
Se cargó ácido 5-cloropirazin-2-carboxílico (5,0 g, 0,032 moles) a un matraz de fondo redondo equipado con un termopar, un agitador de cabeza y un condensador de reflujo. Se cargó metanol (37,5 ml, 0,926 moles) seguido de ácido sulfúrico conc. (0,2 ml, 0,004 moles). El matraz de 3 bocas se equipó con un manto calefactor, y después la mezcla de reacción se calentó hasta aprox. 65,0°C (T interna). La mezcla de reacción se continuó agitando a aprox. 65,0°C (T interna) durante aprox. 4 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta aprox. 25,8°C (T interna). Se cargó metanol (12 ml, 0,31 moles), y la suspensión se continuó agitando a aprox. 22,3°C (T interna) durante aprox. 15 min., después se enfrió hasta aprox. 10,0°C (T interna) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se cargó metóxido de sodio al 25% en metanol (metóxido de sodio:metanol, 1:3, 7,7 ml) al matraz, mientras se mantenía la temperatura por debajo de 30,0°C (T interna). La mezcla de reacción se ajustó a 20,4°C (T interna). Después de 30 min., se combinaron hidróxido de sodio (2,0 g, 0,04 moles) y agua (37,5 ml, 2,08 moles) para formar una disolución, y después la disolución se cargó a la mezcla de reacción. Se cargó agua (50,0 ml, 2,78 moles), y después la mezcla de reacción se calentó hasta 40,0°C (T interna) durante aprox. 60 min. El manto calefactor se eliminó, y después la mezcla de reacción se enfrió hasta aprox. 25,4°C (T interna). Se añadió disolución ac. de HCl al 38% (cloruro de hidrógeno:agua, 38:62, 4,0 ml) a un caudal tal (aprox. 5 min.) que la temperatura se mantuvo por debajo de 30,0°C (T interna). La suspensión pegajosa se agitó durante 1 h a aprox. 21,4°C (T interna), y después se filtró sobre un embudo sinterizado. Los sólidos se enjuagaron con agua (10,0 ml, 0,555 moles) y se secaron a vacío toda la noche para producir ácido 5-metoxipirazin-2-carboxílico (3,59g). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO) δ 13,24 (1H, s a), 8,79 (1H, d, J = 1,2 Hz), 8,37 (1H, d, J = 1,2 Hz), 3,98 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO) δ 165,36, 161,88, 143,88, 136,82, 135,55, 54,69.

Procedimiento general para el acoplamiento de anilinas preparadas en los Ejemplos 1-(13) y 2-(10) de Preparación con ácidos arilcarboxílicos: Preparación de N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][3,1]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida (Ejemplo 1)



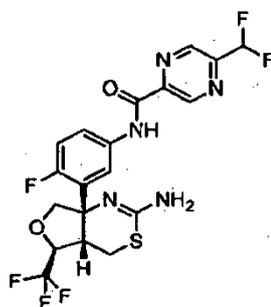
Se disolvió ((4aS,5S,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)carbamato de *terc*-butilo (Ejemplo 1 de Preparación, 56 mg) en DCM (2 ml), y se añadieron ácido 5-metoxipirazin-2-carboxílico (40 mg), N,N-diisopropiletilamina (80 mg) y hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidin-1-il)fosfonio (135 mg). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 18 h, y se añadió bicarbonato de sodio (sat., ac., 25 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 40 ml), las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporaron y se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de EtOAc/hexanos) para producir la amida (40 mg) como un sólido blanco. La amida se disolvió en DCM (2 ml), y se añadió TFA (1 ml). Tras agitar a RT durante 2 h, la mezcla de reacción se evaporó, y se añadió bicarbonato de sodio (sat., ac., 25 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 25 ml), y las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron para producir el compuesto del título como un sólido blanco (34 mg). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,78 - 2,87 (m, 1 H), 3,11 - 3,21 (m, 1 H), 3,38 - 3,48 (m, 1 H), 3,82 - 4,06 (m, 4 H), 4,48 - 4,72 (m, 2 H), 6,96 - 7,10 (m, 1 H), 7,52 (d, J=4,8 Hz, 1 H), 7,87 (d, J=8,8 Hz, 1 H), 8,09 (s, 1 H), 8,95 (s, 1 H), 9,46 (s a, 1 H)

**Ejemplo 2: N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-cianolpicolinamida**

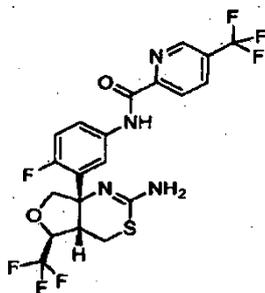


Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *terc*-butilo y ácido 5-cianopirazin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,82 (dd, J=13,6, 3,5 Hz, 1 H), 3,14 - 3,21 (m, 1 H), 3,37 - 3,45 (m, 1 H), 3,91 (d, J=9,1 Hz, 1 H), 4,50 - 4,71 (m, 2 H), 7,08 (dd, J=11,9, 8,8 Hz, 1 H), 7,46 - 7,57 (m, 1 H), 7,92 (dt, J=8,8, 3,4 Hz, 1 H), 8,17 (dd, J=8,3, 2,0 Hz, 1 H), 8,34 (d, J=8,1 Hz, 1 H), 8,81 - 8,92 (m, 1 H)

**Ejemplo 3: N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida**

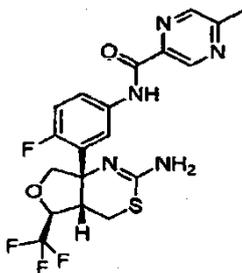


Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *terc*-butilo y ácido 5-difluorometil-pirazin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,80 (dd, J=13,8, 3,7 Hz, 1 H), 3,11 (dd, J=13,6, 2,8 Hz, 1 H), 3,31 - 3,41 (m, 1 H), 3,86 (d, J=8,3 Hz, 1 H), 4,57 (d, J=8,3 Hz, 1 H), 4,64 (dt, J=14,7, 7,1 Hz, 1 H), 4,75 (s a, 2 H), 6,69 (t, J=56,3 Hz, 1 H), 7,07 (dd, J=11,6, 8,8 Hz, 1 H), 7,57 (dd, J=7,1, 2,8 Hz, 1 H), 7,87 (dt, J=8,5, 3,6 Hz, 1 H), 8,85 (s, 1 H), 9,45 (s, 1 H), 9,58 (s a, 1 H)

**Ejemplo 4: N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)picolinamida**

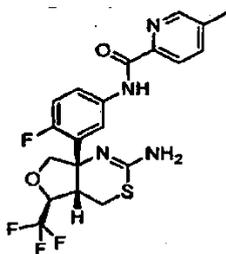
5 Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *terc*-butilo y ácido 5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,88 (dd,  $J=13,6$ , 3,8 Hz, 1 H), 3,20 (dd,  $J=13,6$ , 3,0 Hz, 1 H), 3,37 - 3,53 (m, 1 H), 3,94 (dd,  $J=8,3$ , 2,3 Hz, 1 H), 4,40 - 4,89 (m, 4 H), 7,14 (dd,  $J=11,9$ , 8,8 Hz, 1 H), 7,66 (dd,  $J=6,8$ , 2,8 Hz, 1 H), 7,98 (ddd,  $J=8,8$ , 4,0, 3,0 Hz, 1 H), 8,20 (dd,  $J=8,2$ , 1,6 Hz, 1 H), 8,45 (d,  $J=8,3$  Hz, 1 H), 8,90 (s, 1 H), 9,95 (s, 1 H)

10 **Ejemplo 5: N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metilpirazin-2-carboxamida**



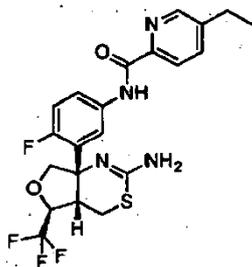
15 Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *terc*-butilo y ácido 5-metil-pirazin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,72 (s, 3 H), 2,88 (dd,  $J=13,6$ , 3,8 Hz, 1 H), 3,21 (dd,  $J=13,6$ , 3,0 Hz, 1 H), 3,42 - 3,49 (m, 1 H), 3,94 (d,  $J=8,3$  Hz, 1 H), 4,39 - 4,80 (m, 4 H), 7,14 (dd,  $J=11,9$ , 8,8 Hz, 1 H), 7,62 (dd,  $J=7,1$ , 2,8 Hz, 1 H), 7,93 - 7,99 (m, 1 H), 8,46 (d,  $J=1,0$  Hz, 1 H), 9,39 (d,  $J=1,3$  Hz, 1 H), 9,65 (s, 1 H)

**Ejemplo 6: N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metilpicolinamida**



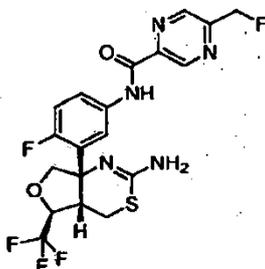
20 Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *terc*-butilo y ácido 5-metil-piridin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,37 (s, 3H), 2,78 (dd,  $J=13,6$ , 3,8 Hz, 1H), 3,12 (dd,  $J=13,6$ , 2,8 Hz, 1H), 3,28 - 3,40 (m, 1H), 3,87 (d,  $J=8,1$  Hz, 1H), 4,28 - 5,02 (m, 4H), 7,02 (dd,  $J=11,9$ , 8,8 Hz, 1H), 7,55 (dd,  $J=7,1$ , 2,8 Hz, 1H), 7,63 (dd,  $J=8,0$ , 1,4 Hz, 1H), 7,88 (ddd,  $J=8,8$ , 4,0, 2,9 Hz, 1H), 8,10 (d,  $J=8,1$  Hz, 1H), 8,31 - 8,40 (m, 1H), 9,90 (s, 1H)

25 **Ejemplo 7: N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-etilpicolinamida**



5 Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *terc*-butilo y ácido 5-etil-piridin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 1,33 (t,  $J=7,6$  Hz, 3 H), 2,78 (c,  $J=7,6$  Hz, 2 H), 2,88 (dd,  $J=13,5$ , 3,7 Hz, 1 H), 3,22 (dd,  $J=13,6$ , 2,8 Hz, 1 H), 3,42 - 3,48 (m, 1 H), 3,96 (d,  $J=7,3$  Hz, 1 H), 4,44 - 4,95 (m, 4 H), 7,12 (dd,  $J=11,6$ , 8,8 Hz, 1 H), 7,62 (dd,  $J=6,9$ , 2,7 Hz, 1 H), 7,74 (dd,  $J=8,1$ , 1,8 Hz, 1 H), 7,98 (dt,  $J=8,7$ , 3,5 Hz, 1 H), 8,21 (d,  $J=8,1$  Hz, 1 H), 8,44 - 8,48 (m, 1 H), 10,00 (s, 1 H)

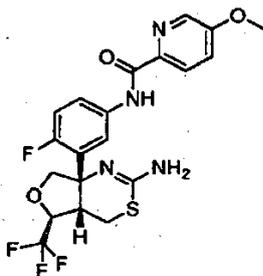
**Ejemplo 8: N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)pirazin-2-carboxamida**



10 Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *terc*-butilo y ácido 5-fluorometil-pirazin-2-carboxílico según el procedimiento general. Los detalles de una preparación actual son como siguen: - Se disolvió ((4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)carbamato de *terc*-butilo (500 mg) en DCM (10 ml), y se añadieron ácido 5-fluorometil-pirazin-2-carboxílico (223 mg), N,N-diisopropiletilamina (521 mg) y hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidin-1-il)fosfonio (750 mg). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 1 h, y se añadió bicarbonato de sodio (sat., ac., 50 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 75 ml), las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se evaporaron y se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente desde 0% hasta 30% de EtOAc/hexanos) para producir la amida (613 mg) como un sólido blanco. La amida se disolvió en DCM (2 ml), y se añadió TFA (1 ml). Tras agitar a RT durante 2 h, la mezcla de reacción se evaporó, y se añadió bicarbonato de sodio (sat., ac., 25 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 25 ml), y las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporaron para producir el compuesto del título como un sólido blanco.

25 RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,89 (dd,  $J=13,8$ , 3,7 Hz, 1 H), 3,21 (dd,  $J=13,9$ , 2,5 Hz, 1 H), 3,40 - 3,51 (m, 1 H), 3,96 (d,  $J=7,3$  Hz, 1 H), 4,42 - 4,85 (m, 4 H), 5,69 (d,  $J=46,5$  Hz, 2 H), 7,15 (dd,  $J=11,9$ , 8,8 Hz, 1 H), 7,64 (dd,  $J=7,1$ , 2,8 Hz, 1 H), 7,94 - 8,00 (m, 1 H), 8,77 (s, 1 H), 9,47 (s, 1 H), 9,68 (s, 1 H)

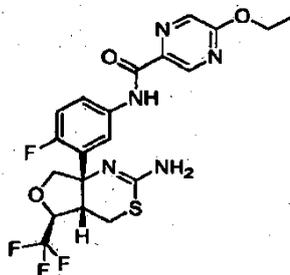
**Ejemplo 9: N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipiridin-2-carboxamida**



30 Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *terc*-butilo y ácido 5-metoxipiridin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,88 (dd,  $J=13,8$ , 3,7 Hz, 1 H), 3,23 (dd,  $J=13,8$ , 2,4 Hz, 1 H), 3,46 (d,  $J=7,3$  Hz, 1 H),

3,89 - 4,02 (m, 4 H), 4,54 - 5,00 (m, 4 H), 7,11 (dd,  $J=11,9$ , 8,8 Hz, 1 H), 7,36 (dd,  $J=8,8$ , 2,8 Hz, 1 H), 7,61 (dd,  $J=7,1$ , 2,8 Hz, 1 H), 7,97 (dt,  $J=8,5$ , 3,6 Hz, 1 H), 8,23 - 8,30 (m, 2 H), 9,86 (s, 1 H)

**Ejemplo 10:** N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-etoxipirazin-2-carboxamida

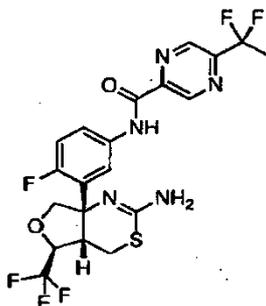


5

Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo y ácido 5-etoxipirimidin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 1,47 (t,  $J=7,1$  Hz, 3 H), 2,87 (dd,  $J=13,6$ , 3,5 Hz, 1 H), 3,20 (d,  $J=13,6$  Hz, 1 H), 3,40 - 3,50 (m, 1 H), 3,94 (d,  $J=7,8$  Hz, 1 H), 4,46 - 4,95 (m, 6 H), 7,11 (dd,  $J=11,5$ , 9,0 Hz, 1 H), 7,54 - 7,63 (m, 1 H), 7,90 - 8,01 (m, 1 H), 8,13 (s, 1 H), 9,00 (s, 1 H), 9,52 (s a, 1 H)

10

**Ejemplo 11:** N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(1,1-difluoroetil)pirazin-2-carboxamida

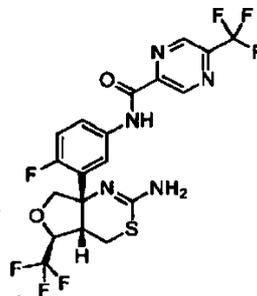


15

Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo y ácido 5-(1,1-difluoroetil)pirazin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,03 (t,  $J=18,8$  Hz, 3 H), 2,82 (d,  $J=12,0$  Hz, 1 H), 3,14 (d,  $J=12,4$  Hz, 1 H), 3,35 - 3,46 (m, 1 H), 3,77 - 4,07 (m, 1 H), 4,20 - 4,93 (m, 4 H), 7,08 (dd,  $J=11,7$ , 9,0 Hz, 1 H), 7,56 (d,  $J=4,5$  Hz, 1 H), 7,80 - 7,93 (m, 1 H), 8,87 (s, 1 H), 9,43 (s, 1 H), 9,59 (s a, 1 H)

20

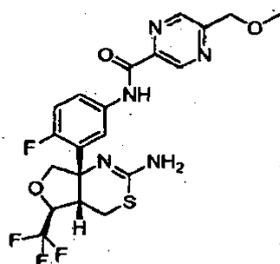
**Ejemplo 12:** N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)pirazin-2-carboxamida



25

Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo y ácido 5-trifluorometilpirazin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,80 (dd,  $J=13,6$ , 3,8 Hz, 1 H), 3,11 (dd,  $J=13,8$ , 2,9 Hz, 1 H), 3,30 - 3,44 (m, 1 H), 3,87 (d,  $J=8,3$  Hz, 1 H), 4,25 - 5,14 (m, 4 H), 7,07 (dd,  $J=11,9$ , 8,8 Hz, 1 H), 7,57 (dd,  $J=6,8$ , 2,8 Hz, 1 H), 7,86 (dt,  $J=8,4$ , 3,6 Hz, 1 H), 8,89 (s, 1 H), 9,53 (s, 2 H)

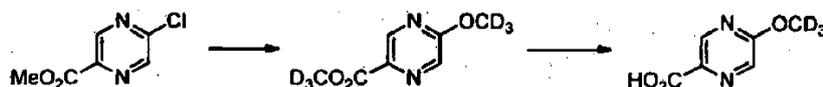
**Ejemplo 13:** N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(metoximetil)pirazin-2-carboxamida



Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *terc*-butilo y ácido 5-(metoximetil)pirimidin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,79 (dd,  $J=13,6$ , 3,8 Hz, 1 H), 3,11 (dd,  $J=13,6$ , 2,8 Hz, 1 H), 3,32 - 3,39 (m, 1 H), 3,49 (s, 3 H), 3,84 (d,  $J=8,3$  Hz, 1 H), 4,34 - 4,73 (m, 6 H), 7,05 (dd,  $J=11,6$ , 8,8 Hz, 1 H), 7,55 (dd,  $J=6,8$ , 2,8 Hz, 1 H), 7,88 (dt,  $J=8,4$ , 3,6 Hz, 1 H), 8,63 (s, 1 H), 9,34 (d,  $J=1,0$  Hz, 1 H), 9,60 (s, 1 H)

**Ejemplo 14: N-{3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5-dihidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(7H)-il]-4-fluorofenil}-5-[( $^2\text{H}_3$ )metiloxi]pirazin-2-carboxamida**

Síntesis de 14-(2) ácido 5-[( $^2\text{H}_3$ )metiloxi]pirazin-2-carboxílico



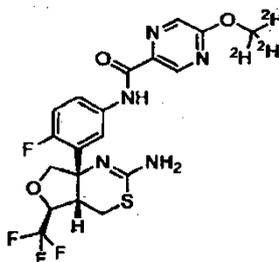
Parte (I): 5-[( $^2\text{H}_3$ )metiloxi]pirazin-2-carboxilato de ( $^2\text{H}_3$ )metilo

Se añadió sodio metálico recientemente cortado (160 mg) en porciones durante 10 min. a ( $^2\text{H}_3$ )metan( $^2\text{H}$ )ol (5 ml), y la disolución se agitó hasta que el sodio se hubo disuelto. Esta disolución se añadió entonces a 5-cloropirazin-2-carboxilato de metilo (1,02 g) en ( $^2\text{H}_3$ )metan( $^2\text{H}$ )ol (5 ml), y la disolución se dejó agitar a RT durante 1 h. La disolución se concentró entonces a presión reducida hasta un volumen de alrededor de 2 ml, y se añadió agua (50 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml), las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporaron para producir el compuesto del título (745 mg). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8,30 (d,  $J=1,3$  Hz, 1 H), 8,91 (d,  $J=1,3$  Hz, 1 H)

Parte (II): Ácido 5-[( $^2\text{H}_3$ )metiloxi]pirazin-2-carboxílico

A una disolución agitada de 5-[( $^2\text{H}_3$ )metiloxi]pirazin-2-carboxilato de ( $^2\text{H}_3$ )metilo en 1,4-dioxano (5 ml) se añadió agua (5 ml) seguido de hidróxido de litio monohidratado (300 mg). Tras agitar durante 1 h, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida hasta alrededor de 5 ml y se extrajo con éter dietílico (25 ml). La capa orgánica se extrajo con NaOH 1N (ac., 10 ml), y las porciones acuosas combinadas se acidificaron hasta pH 2 con ácido clorhídrico 6N. Tras enfriar en un refrigerador, la mezcla se filtró para producir el compuesto del título como un polvo marrón pálido (660 mg). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8,21 (d,  $J=1,3$  Hz, 1 H), 9,01 (d,  $J=1,3$  Hz, 1 H), 10,12 (s a., 1 H)

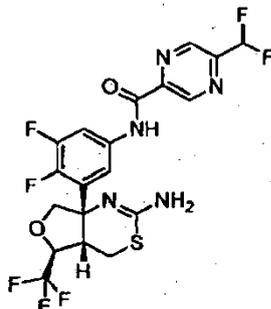
Parte (III): N-{3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5-dihidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(7H)-il]-4-fluorofenil}-5-[( $^2\text{H}_3$ )metiloxi]pirazin-2-carboxamida



Se disolvió ((4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *terc*-butilo (100 mg) en DCM (2 ml), y se añadieron ácido 5-[( $^2\text{H}_3$ )metiloxi]pirazin-2-carboxílico (55 mg), N,N-diisopropiletilamina (112 mg) y hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidin-1-il)fosfonio (180 mg). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 18 h, se añadió y bicarbonato de sodio (sat., ac., 25 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 40 ml), las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se evaporaron y se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice (2% hasta 25% de EtOAc en hexanos) para producir la amida (127 mg) como un sólido blanco. La amida se disolvió en DCM (2 ml), y se añadió TFA (1 ml). Tras agitar a RT durante 2 h, la mezcla de reacción se evaporó, y se añadió bicarbonato de sodio (sat., ac., 25 ml). La

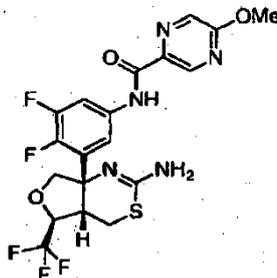
mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 40 ml), y las porciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron para producir el compuesto del título como un sólido blanco (104 mg). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,87 (dd, J=13,6, 3,8 Hz, 1 H), 3,21 (dd, J=13,6, 2,8 Hz, 1 H), 3,39 - 3,53 (m, 1 H), 3,95 (d, J=8,3 Hz, 1 H), 4,65 (d, J=8,3 Hz, 1 H), 4,72 (quin, J=7,2 Hz, 1 H), 4,87 (s a, 2 H), 7,12 (dd, J=11,9, 8,8 Hz, 1 H), 7,60 (dd, J=6,9, 2,7 Hz, 1 H), 7,95 (dt, J=8,5, 3,6 Hz, 1 H), 8,16 (d, J=1,0 Hz, 1 H), 9,02 (d, J=1,0 Hz, 1 H), 9,52 (s, 1 H)

**Ejemplo 15:** N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida



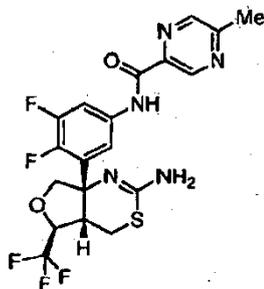
Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2,3-difluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo y ácido 5-difluorometil-pirazin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 2,90 (dd, J=13,8, 3,7 Hz, 1 H), 3,19 (dd, J=3,8, 2,7 Hz, 1 H), 3,31 - 3,49 (m, 1 H), 3,95 (d, J=7,6 Hz, 1 H), 4,44 - 5,15 (m, 4 H), 6,81 (t, J=55,8 Hz, 4 H), 7,22 - 7,35 (m, 1 H), 8,08 (ddd, J=11,2, 6,8, 2,7 Hz, 1 H), 8,94 (s, 1 H), 9,53 (s, 1 H), 9,67 (s, 1 H)

**Ejemplo 16:** N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida



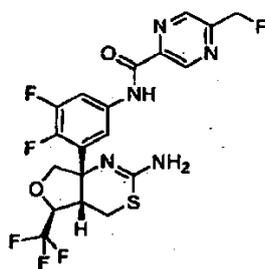
Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2,3-difluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo y ácido 5-metoxipirazin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + MeOD) δ ppm 2,83 (dd, J=13,9, 3,8 Hz, 1 H), 3,14 (dd, J=13,9, 3,0 Hz, 1 H), 3,29 - 3,39 (m, 1 H), 3,87 (d, J=8,3 Hz, 1 H), 4,04 (s, 3 H), 4,60 (d, J=8,3 Hz, 1 H), 4,67 (quin, J=6,3 Hz, 1 H), 7,11 - 7,21 (m, 1 H), 8,03 (ddd, J=11,6, 6,9, 2,7 Hz, 1 H), 8,15 (d, J=1,3 Hz, 1 H), 8,96 (d, J=1,3 Hz, 1 H)

**Ejemplo 17:** N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-metilpirazin-2-carboxamida



Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2,3-difluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahydro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo y ácido 5-metilpirazin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + MeOD) δ ppm 2,68 (s, 3 H), 2,84 (dd, J=13,6, 3,8 Hz, 1 H), 3,15 (dd, J=13,9, 3,0 Hz, 1 H), 3,30 - 3,42 (m, 1 H), 3,88 (d, J=10,4 Hz, 1 H), 4,61 (d, J=8,6 Hz, 1 H), 4,68 (quin, J=7,2 Hz, 1 H), 7,13 - 7,25 (m, 1 H), 8,05 (ddd, J=11,6, 6,8, 2,8 Hz, 1 H), 8,46 (s, 1 H), 9,30 (d, J=1,3 Hz, 1 H)

**Ejemplo 18: N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-(fluorometil)-pirazin-2-carboxamida**

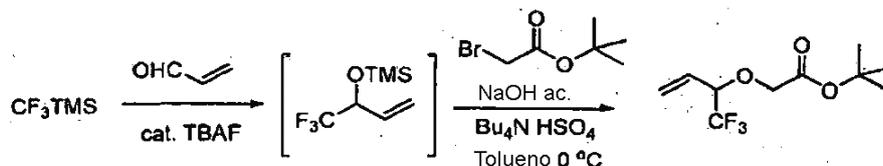


5 Sintetizada a partir de [(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2,3-difluorofenil)-5-trifluorometil-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato *terc*-butilo de y ácido 5-(fluorometil)pirazin-2-carboxílico según el procedimiento general. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,89 (dd,  $J=13,6$ , 3,8 Hz, 1 H), 3,19 (dd,  $J=13,6$ , 3,0 Hz, 1 H), 3,43 (dd,  $J=7,5$ , 3,4 Hz, 1 H), 3,86 - 3,99 (m, 1 H), 4,39 - 4,67 (m, 3 H), 4,74 (quin,  $J=7,1$  Hz, 1 H), 5,76 (d,  $J=45,5$  Hz, 2 H), 8,10 (ddd,  $J=11,4$ , 6,8, 2,8 Hz, 1 H), 8,77 (s, 1 H), 9,46 (s, 1 H), 9,69 (s, 1 H)

10 Aquí, más abajo, se describen Preparaciones Alternativas de los compuestos de los Ejemplos 1 y 8. Para estas preparaciones alternativas se registraron los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  RMN en un instrumento Varian 400 MHz o 500 MHz con software vNMR 6.1C.

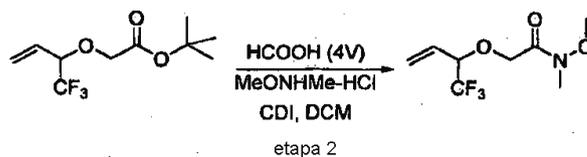
**Preparación Alternativa de N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida (Ejemplo 1)**

1-(14) Síntesis de 2-(1,1,1-trifluorobut-3-en-2-iloxi)acetato de *terc*-butilo



15 Una vasija de reacción se cargó con tolueno (3,2 l), THF (0,60 l) y acroleína (0,40 l, 5,985 moles) a rt bajo nitrógeno. Se añadió (trifluorometil)trimetilsilano (1,003 kg, 7,059 moles) a 17°C. La mezcla de reacción se enfrió hasta 2,5°C, y se añadió TBAF (0,01 M en THF, 0,400 l, 0,004 moles) durante 2 h. Durante la adición de TBAF, la temperatura de la mezcla de reacción se aumentó hasta 65°C. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, y después de 2 h, se añadió hidrogenosulfato de tetra-n-butilamonio (0,171 kg, 0,503 moles), seguido de bromoacetato de *terc*-butilo (0,987 kg, 5,064 moles). Se añadió hidróxido de sodio (50% en peso en agua, 4,2 kg, 52,6 moles) durante 2 h, mientras se mantenía la temperatura por debajo de 10°C. Después de 2 h a 0-5°C, a la mezcla de reacción se añadió agua (2,9 l) y metil *terc*-butil éter (6,0 l). La fase ac. se extrajo una vez más con metil *terc*-butil éter (6,0 l). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con NaCl ac. al 14% (3 x 1,6 l). Los orgánicos se concentraron a vacío para producir el compuesto del título como un aceite (1,150 kg, 94,5%), que se usó en la etapa subsiguiente sin purificación adicional: RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 5,86 - 5,74 (m, 1H), 5,59 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H), 5,56 (d,  $J = 10,9$  Hz, 1H), 4,37 - 4,30 (m, 1H), 4,11 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H), 4,06 (d,  $J = 16,4$  Hz, 1H), 1,40 (s, 9H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 168,51, 128,49 (d,  $J = 1,7$  Hz), 123,86, 123,71 (c,  $J = 281,8$  Hz), 82,22, 78,67 (c,  $J = 31,5$  Hz), 66,60, 28,02.

30 1-(15) Síntesis de *N*-Metoxi-*N*-metil-2-(1,1,1-trifluorobut-3-en-2-iloxi)acetamida

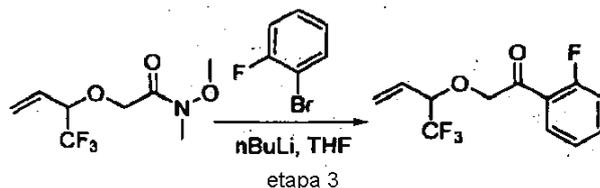


35 A un reactor que contiene 2-(1,1,1-trifluorobut-3-en-2-iloxi)acetato de *terc*-butilo (1,150 kg, 4,788 moles) se añadió ácido fórmico (6,2 kg) a rt. La mezcla de reacción se calentó hasta 55-60°C durante 4-5 h. El ácido fórmico se evaporó a vacío ( $T = 40-45^\circ\text{C}$ ) y disolvió con tolueno (2 x 3,0 l). Al residuo se añadió  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2,0 l) y se concentró adicionalmente a vacío. Al residuo resultante se añadió  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4,6 l), y la disolución se enfrió hasta 0°C, seguido de *N,N*-carbonildiimidazol (1,05 kg, 6,49 moles) en cinco porciones. La mezcla se agitó durante 30 min., y se añadió hidrocloreuro de *N,O*-dimetilhidroxilamina (0,67 kg, 6,72 moles) en porciones, mientras se mantenía la temperatura por debajo de 10°C. La mezcla de reacción se calentó hasta rt y se agitó durante 14 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta 3,2°C, y se cargó imidazol (100,7 g, 1,48 moles) en dos porciones. La mezcla de reacción se calentó

hasta rt, y se añadió agua (1,4 kg), seguido de metil *tert*-butil éter (14,0 l). La fase orgánica se lavó con HCl ac. 2,0 N (1,0 l y 0,7 l), seguido de NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (1,2 l) y NaCl ac. sat. (1,20 l). Los orgánicos se concentraron para producir el compuesto del título como un aceite (0,95 kg, 87,2%). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 5,85 - 5,76 (m, 1H), 5,62 (d, *J* = 17,2 Hz, 1H), 5,56 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 4,49 - 4,34 (m, 3H), 3,68 (s, 3H), 3,67 (s, 1H), 3,18 (s, 3H), 3,08 (s, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (126 MHz, cdcl<sub>3</sub>) δ ppm 169,9\*, 163,4\*, 128,61, 123,87 (d, *J* = 282,0 Hz), 123,82, 78,54 (c, *J* = 31,3 Hz), 66,12, 61,52, 60,56, 36,20, 32,24. Nota: este compuesto es una mezcla 3:1 de rotámeros enlazados a amida. \*Los desplazamientos químicos del carbonilo se estimaron indirectamente a través de HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (correlación de múltiples enlaces heteronuclear).

HRMS Calculado para C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 228,0848; observado 228,0836.

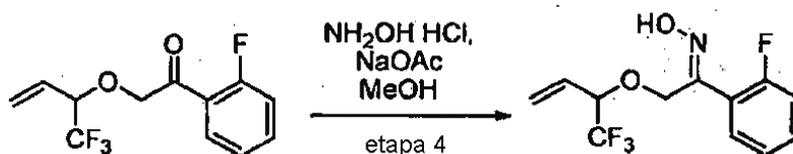
10 1-(16) Síntesis de 1-(2-Fluorofenil)-2-(1,1,1-trifluorobut-3-en-2-iloxi)etanona



A una disolución de 1-bromo-2-fluorobenceno (0,967 kg, 5,527 moles) en THF (6,2 l) a -75°C, se añadió n-butil-litio (2,50 M en hexano, 2,09 l, 5,22 moles) mientras se mantenía la temperatura por debajo de -65°C (aprox. 100 min.). Después de 15 min., se añadió una disolución de N-metoxi-N-metil-2-(1,1,1-trifluorobut-3-en-2-iloxi)acetamida (0,949 kg, 4,178 moles) en THF (1,6 l), mientras se mantenía la temperatura por debajo de -65°C (aprox. 70 min.). Tras 2,5 h a -78°C, la reacción se paralizó mediante adición de NH<sub>4</sub>Cl ac. sat. (3,0 l) y metil *tert*-butil éter (9,0 l). La mezcla de reacción se calentó hasta rt, la fase ac. se extrajo de nuevo con metil *tert*-butil éter (2,5 l). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con NaCl ac. sat. (2 x 0,3 l) y se concentraron a vacío para producir el compuesto del título como un aceite (1,007 kg, 80,0%). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7,96 (td, *J* = 7,6, 1,8 Hz, 1H), 7,62 - 7,54 (m, 1H), 7,33 - 7,25 (m, 1H), 7,20 - 7,12 (m, 1H), 5,86 (ddd, *J* = 17,5, 10,4, 7,3 Hz, 1H), 5,60 (dd, *J* = 20,5, 13,8 Hz, 2H), 4,91 - 4,76 (m, 2H), 4,39 (dc, *J* = 12,8,6,4 Hz, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 193,55, 162,14 (d, *J*<sub>CF</sub> = 254,1 Hz), 135,36 (d, *J*<sub>CF</sub> = 9,2 Hz), 130,62 (d, *J*<sub>CF</sub> = 3,2 Hz), 128,49, 124,85 (d, *J*<sub>CF</sub> = 3,3 Hz), 123,89, 122,93, 122,72 (d, *J*<sub>CF</sub> = 24,5 Hz), 116,50 (d, *J*<sub>CF</sub> = 23,7 Hz), 78,97 (c, *J*<sub>CF</sub> = 31,4 Hz), 74,56 (d, *J*<sub>CF</sub> = 12,4 Hz).

HRMS Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>F<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 263,0695; observado 263,0709.

25 1-(17) Síntesis de oxima de la 1-(2-Fluorofenil)-2-(1,1,1-trifluorobut-3-en-2-iloxi)etanona

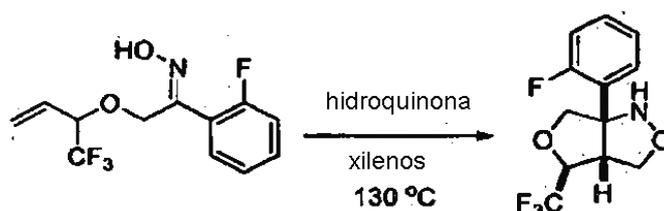


A un reactor se añadió hidrocloreuro de hidroxilamina (0,34 kg, 4,95 moles), acetato de sodio (0,47 kg, 5,70 moles) y MeOH (2,68 l). A esta suspensión se cargó una disolución de 1-(2-fluorofenil)-2-(1,1,1-trifluorobut-3-en-2-iloxi)etanona (0,998 kg, 3,806 moles) en MeOH (1,8 l), y la mezcla de reacción se calentó hasta 40-50°C. En cuanto terminó (aprox. 2 h), la mezcla de reacción se enfrió hasta rt, y se filtró sobre Celite (0,5 peso) y se enjuagó con EtOAc (3,0 l). El filtrado se concentró a vacío, y al residuo resultante se añadió metil *tert*-butil éter (6,3 l), agua (0,94 l) y NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (2,5 l). La fase orgánica se lavó una vez con agua (1,6 l) y con NaCl ac. sat. (0,1 l). La fase orgánica se concentró a vacío para producir el compuesto del título como un aceite (1,03 kg, 95,0%). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7,49 - 7,35 (m, 2H), 7,24 - 7,06 (m, 2H), 5,78 - 5,65 (m, 1H), 5,54 - 5,40 (m, 2H), 4,89 - 4,81 (m, 1H), 4,53 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H), 4,47 (d, *J* = 12,6 Hz, 0,5H), 4,27 - 4,18 (m, 1H), 4,13 - 4,05 (m, 0,5H).

HRMS Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>F<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 278,0804; observado 278,0780.

Nota: La oxima de la 1-(2-fluorofenil)-2-(1,1,1-trifluorobut-3-en-2-iloxi)etanona existe como un equilibrio de isómeros estructurales, que tiene en cuenta los valores de la integrales de número menor que el entero.

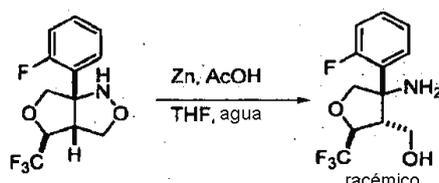
1-(18) Síntesis de (3aR\*,4S\*,6aS\*)-6a-(2-fluorofenil)-4-(trifluorometil)hexahidrofuro[3,4-c]isoxazol



A una disolución de oxima de la 1-(2-fluorofenil)-2-(1,1,1-trifluorobut-3-en-2-iloxi)etanona (1,085 kg, 3,328 moles) en xilenos (6,9 l) se añadió hidroquinona (86,2 g, 0,8 moles) a rt. La disolución se calentó hasta 128°C (temperatura interna) durante 18 h. La disolución se enfrió hasta rt, y se añadieron hexanos (7,0 l), seguido de HCl ac. 4,0 M (2,4 l). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h, y se filtró. Al sólido se añadió agua (2,0 l), metil *tert*-butil éter (7,0 l) y NaOH ac. al 25% en peso. (0,4 l). La capa ac. se extrajo una vez con metil *tert*-butil éter (7,0 l), los orgánicos se combinaron, se lavaron con NaCl ac. al 27% (2,0 l) y se concentraron a vacío hasta un aceite negro (512,0 g, 56%).  
 5 RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7,64 - 7,52 (m, 1H), 7,39 - 7,31 (m, 1H), 7,19 (td, *J* = 7,7, 1,2 Hz, 1H), 7,11 (ddd, *J* = 11,9, 8,2, 1,0 Hz, 1H), 4,54 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H), 4,34 - 4,23 (m, 1H), 4,26 - 4,17 (m, 1H), 4,16 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H), 4,10 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 3,71 (d, *J* = 20,2 Hz, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 160,59 (d, *J*<sub>CF</sub> = 247,0 Hz), 130,50 (d, *J*<sub>CF</sub> = 8,7 Hz), 128,72, 124,69 (d, *J*<sub>CF</sub> = 3,3 Hz), 124,45 (c, *J*<sub>CF</sub> = 281,8 Hz), 124,43 (d, *J*<sub>CF</sub> = 11,9 Hz), 116,66 (d, *J*<sub>CF</sub> = 22,7 Hz), 83,70 (c, *J*<sub>CF</sub> = 32,1 Hz), 78,17 (d, *J*<sub>CF</sub> = 3,1 Hz), 77,63. 54,53.

HRMS Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>F<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 278,0804; observado 278,0802.

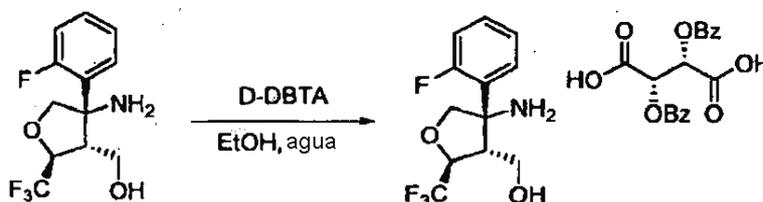
1-(19) Síntesis de ((2S\*,3R\*,4S\*)-4-amino-4-(2-fluorofenil)-2-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)metanol



Se colocó cinc (389,2 g, 5,95 moles) en una vasija de reacción, y se añadió agua (893 ml). Se añadió ácido acético (135 ml, 2,38 moles) mientras se mantenía la temperatura por debajo de 10°C. Después de 15 min., se añadió 6a-(2-fluorofenil)-4-(trifluorometil)hexahidrofuro[3,4-c]isoxazol (550,0 g, 1,98 moles) como una disolución en THF (665 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h a rt. Se añadió cloruro de metileno (1,89 l), seguido de 28% ac. NH<sub>4</sub>OH (552 ml) mientras la temperatura se mantuvo por debajo de 30°C. La mezcla se agitó durante 30 min., y después se filtró sobre Celite (80 g) aclarando con cloruro de metileno (378 ml). La capa ac. se extrajo con cloruro de metileno (1,89 l). Los orgánicos se combinaron, se lavaron con NaCl ac. sat. (1,0 l) y se concentraron a vacío para producir un aceite (502 g, 90,6%). El residuo bruto se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.  
 20

HRMS Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>F<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 280,0961; observado 280,0972.

25 1-(20) Síntesis de (2S,3S)-2,3-bis(benzoiloxi)succinato de ((2S,3R,4S)-4-Amino-4-(2-fluorofenil)-2-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)metanol



A una disolución de 4-amino-4-(2-fluorofenil)-2-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)metanol (0,502 kg, 1,798 moles) en etanol (4,865 l) se añadió ácido dibenzoil-D-tartárico (0,642 kg, 1,798 moles). La suspensión resultante se calentó hasta 67°C. Se añadió agua (94,0 ml, 5,2 moles) durante 15 min., mientras se mantenía la temperatura >66°C.  
 30

La disolución resultante se enfrió hasta 45°C, mientras se producía precipitación. La suspensión se volvió a calentar hasta 60°C, y después se enfrió hasta temperatura ambiente a 5°C/hora. La suspensión se filtró, y el sólido se enjuagó con una disolución premezclada y enfriada de etanol (950 ml) y agua (20 ml). El sólido se secó hasta peso constante a vacío (370 g, 97,6% ee). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 8,13 (d, *J* = 7,2 Hz, 4H), 7,66 - 7,58 (m, 3H), 7,54 - 7,45 (m, 5H), 7,36 - 7,20 (m, 2H), 5,92 (s, 2H), 4,79 - 4,66 (m, 1H), 4,40 - 4,28 (m, 1H), 4,04 (dd, *J* = 12,1, 3,4 Hz, 1H), 3,92 (dd, *J* = 12,1, 5,4 Hz, 1H), 3,30 - 3,24 (m, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO) δ ppm 169,61, 165,81, 160,23 (d, *J* = 246,1 Hz), 133,00, 131,34 (d, *J* = 9,1 Hz), 129,65, 129,55, 128,08, 127,97 (d, *J* = 3,5 Hz), 124,95 (d, *J* = 3,3 Hz), 116,56 (d, *J* = 23,5 Hz), 77,48 (c, *J*<sub>CF</sub> = 31,0 Hz), 76,33, 73,20,65,61 (d, *J* = 3,1 Hz), 57,11. HRMS Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>F<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 280,0961; observado 280,0967 (para amino alcohol).  
 35

## ES 2 575 914 T3

La estereoquímica absoluta del compuesto del título se asignó por comparación con una muestra preparada partiendo de (S)-2-(trifluorometil)oxirano enantioenriquecido.

Parámetros de HPLC quiral:

Equipos, Reactivos, y Fase Móvil:

5 Equipo:

Columna de HPLC:	Chiralcel OD, 4,6 x 250 mm, 10 $\mu$ m, Daicel Chemical Industries, Ltd., n° de catálogo 14025.
Sistema de suministro del disolvente:	Bomba ternaria Agilent 1100 HPLC, mezclándose a baja presión con gasificador en línea o equivalente.
Inyector automático:	Inyector automático Agilent 1100, intervalo 0,1 a 100 $\mu$ l, o equivalente.
Detector:	Detector de longitud de onda variable Agilent 1100 o equivalente.
Software cromatográfico:	Software Agilent ChemStation versión A.09.03 o superior para HPLC, Waters Empower 2 Build 2154 o equivalente.
Material de vidrio volumétrico:	Clase A.
Pipeta volumétrica:	Clase A.
Pipeteador:	Eppendorf calibrada de volumen ajustable, o equivalente.
Balanza:	Balanza analítica, capaz de pesar $\pm$ 0,1 mg.

Reactivos:

Heptano:	Grado HPLC, Baker (n° de catalogo 9177-03), o equivalente.
2-Propanol:	Grado HPLC, Baker (n° de catalogo 9095-03), o equivalente.
Trietilamina:	$\geq$ 99%, Sigma-Aldrich (n° de catalogo T0886), o equivalente.

Fase móvil:

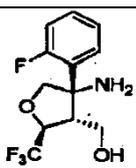
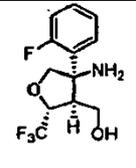
10 Añádanse 70 ml de 2-propanol y 930 ml de heptano (medido por separado con cilindros graduados de 100 ml y 1000 ml) y 1,0 ml de trietilamina (medida con pipeta volumétrica de vidrio) a un matraz apropiado y mézclese. Degasifíquese en línea durante el uso. Disolución de dilución: 2-propanol

Parámetros de HPLC:

Columna de HPLC:	Chiralcel OD, 4,6 x 250 mm, 10 $\mu$ m, Daicel Chemical Industrie Ltd., n° de catálogo 14025
Temperatura:	35°C
Caudal*:	0,8 ml/min
Gradiente:	NA
Volumen de inyección:	5 $\mu$ l
Detección:	262 nm UV
Tiempo de adquisición de datos:	30 min
Tiempo total de ejecución:	30 min
Presión máxima de la columna:	35 bares

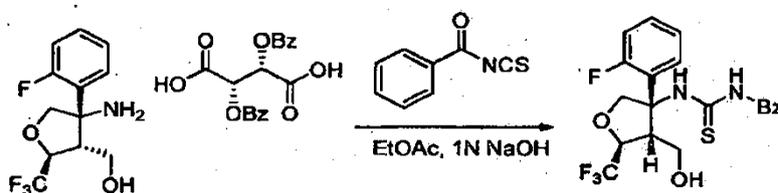
Columna de HPLC:	Chiralcel OD, 4,6 x 250 mm, 10 $\mu$ m, Daicel Chemical Industrie Ltd., n° de catálogo 14025
Lavado de la aguja:	2-propanol
* El caudal se puede ajustar a $\pm 0,2$ ml/min para obtener tiempos de retención especificados.	

Tiempos de retención de analitos e impurezas:

Pico del compuesto	Tiempo de retención (Tiempo de retención relativo, TRR)
	20,6 min $\pm$ 10% (TRR 1,00)
 (Enantiomero)	19,2 min (TRR 0,93)

5 En la Figura 1 se presenta un cromatograma típico a partir de un aislamiento mediante HPLC quiral del Compuesto 1-(20).

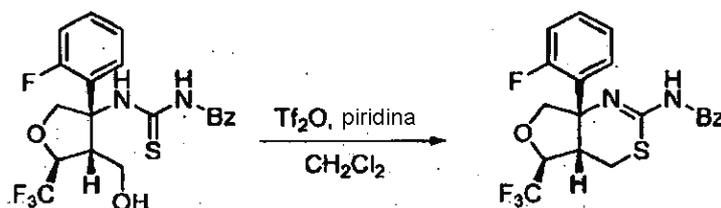
1-(21) Síntesis de *N*-((3*S*,4*R*,5*S*)-3-(2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)-5-(trifluorometil)-tetrahidrofuran-3-ilcarbamotioil)benzamida



10 A una sal quiral de (2*S*,3*S*)-2,3-bis(benzoiloxi)succinato de ((2*S*,3*R*,4*S*)-4-amino-4-(2-fluorofenil)-2-(trifluorometil)tetrahidrofuran-3-il)metanol (0,361 kg, 0,556 moles) se añadió EtOAc (1,08 l), y la suspensión se enfrió hasta  $-3^{\circ}\text{C}$ . Se añadió NaOH ac. 1,0 N (1,30 l) durante 20 min., mientras se mantenía  $T < 5^{\circ}\text{C}$ . Después de 5 min., se añadió isotiocianato de benzoilo (80,0 ml, 594 mmoles) durante 8 min., mientras se mantenía  $T < 5^{\circ}\text{C}$ . Después de 1 h, se cargó EtOAc (722 ml). La capa ac. se eliminó, y los orgánicos se lavaron con  $\text{NaHCO}_3$  ac. sat. (361 ml) y con NaCl ac. sat. (361 ml). Los orgánicos se filtraron sobre celite (90 g) y se enjuagaron con EtOAc. (360 ml). Los orgánicos se concentraron a vacío para producir un residuo que se volvió a disolver en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1,1 l) y se concentraron para producir el compuesto del título como una espuma amarilla (261 g, 99% de rendimiento teniendo en cuenta los disolventes residuales) que se usó en la etapa siguiente. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 12,04 (s, 2H), 11,20 (s, 2H), 7,95 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 7,69 - 7,60 (m, 1H), 7,56 - 7,42 (m, 2H), 7,37 - 7,28 (m, 1H), 7,24 - 7,12 (m, 2H), 5,59 (t,  $J = 4,5$  Hz, 1H), 5,03 (d,  $J = 9,7$  Hz, 1H), 4,92 (d,  $J = 9,7$  Hz, 1H), 4,75 - 4,63 (m, 1H), 3,92 - 3,74 (m, 2H), 2,77 - 2,66 (m, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 179,98, 167,85, 159,75 (d,  $J_{\text{CF}} = 245,0$  Hz), 133,44, 132,58, 129,88, 129,81, 129,04, 128,85, 126,31 (d,  $J_{\text{CF}} = 9,8$  Hz), 124,36, 116,83 (d,  $J_{\text{CF}} = 23,4$  Hz), 76,11 (c,  $J_{\text{CF}} = 31,0$  Hz), 74,37 (d,  $J_{\text{CF}} = 6,1$  Hz), 68,77 (d,  $J_{\text{CF}} = 3,4$  Hz), 57,03, 52,23.

HRMS Calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  441,0896; observado 441,0818.

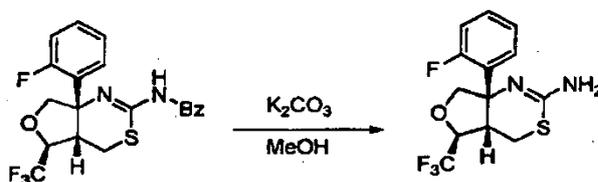
25 1-(22) Síntesis de *N*-((4*aS*,5*S*,7*aS*)-7*a*-(2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4*a*,5,7,7*a*-tetrahydro-4*H*-furo[3,4-*d*][1,3]tiazin-2-il)benzamida



Una disolución de *N*-((3*S*,4*R*,5*S*)-3-(2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)-5-(trifluorometil)-tetrahidrofuran-3-ilarbamotioil)benzamida (258,3 g, 583,8 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1,55 l) se enfrió hasta  $-19,4^\circ\text{C}$ . Se añadió piridina (118 ml, 1,46 moles) mientras se mantenía la temperatura a  $-20^\circ\text{C}$ , y después la mezcla de reacción se enfrió hasta  $-24^\circ\text{C}$ . En otra vasija se purgó nitrógeno, se añadió  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (258 ml) seguido de anhídrido trifluorometanosulfónico (108,0 ml, 642,2 mmoles). La disolución resultante se añadió a la mezcla de reacción durante 30 min., mientras se mantenía la temperatura  $< -19,7^\circ\text{C}$ . Tras terminar la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 30 min. a  $-20^\circ\text{C}$  hasta  $-15^\circ\text{C}$ , y después se calentó hasta  $-11^\circ\text{C}$  durante 20 min. Se añadieron  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ac. saturado (646 ml) y agua (390 ml). La mezcla se calentó hasta la temperatura ambiente, y la capa ac. se eliminó. Los orgánicos se lavaron con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ac. saturado premezclado (646 ml) y agua (390 ml). Las capas ac. se combinaron, y se extrajeron una vez con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (520 ml). Los orgánicos se combinaron, y se concentraron a vacío para producir una espuma naranja clara (250 g, 100%). El residuo se usó en la etapa siguiente sin purificación. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8,03 (d,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 7,52 (t,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 7,48 - 7,31 (m, 4H), 7,20 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 7,12 (dd,  $J = 12,0, 8,4$  Hz, 1H), 4,82 - 4,73 (m, 1H), 4,60 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H), 4,03 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 3,57 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H), 3,20 (d,  $J = 13,6$  Hz, 1H), 2,81 (dd,  $J = 13,8, 2,5$  Hz, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 171,50, 159,57 (d,  $J_{\text{CF}} = 247,2$  Hz), 134,62, 132,49, 130,65 (d,  $J_{\text{CF}} J = 8,8$  Hz), 129,77, 128,51, 128,45, 125,14 (c,  $J_{\text{CF}} = 281,8$  Hz), 124,97 (d,  $J_{\text{CF}} = 3,0$  Hz), 124,66 (d,  $J_{\text{CF}} = 10,3$  Hz), 117,05 (d,  $J_{\text{CF}} = 23,5$  Hz), 66,81 (d,  $J_{\text{CF}} = 5,2$  Hz), 38,90, 23,20.

HRMS Calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  425,0947; observado 425,0945.

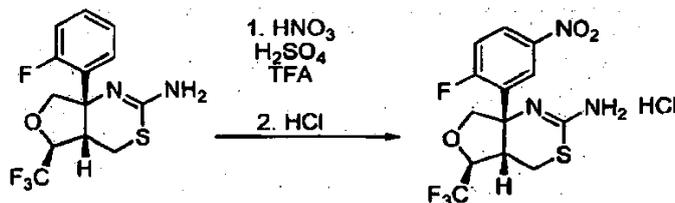
1-(23) Síntesis de (4*aS*,5*S*,7*aS*)-7*a*-(2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4*a*,5,7,7*a*-tetrahidro-4*H*-furo[3,4-*d*][1,3]tiazin-2-amina



A una disolución de *N*-((4*aS*,5*S*,7*aS*)-7*a*-(2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4*a*,5,7,7*a*-tetrahidro-4*H*-furo[3,4-*d*][1,3]tiazin-2-il)benzamida (250,2 g, 589,5 mmoles) en metanol (1,25 l) se añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (81,5 g, 590,0 mmoles). La suspensión se calentó hasta  $65^\circ\text{C}$  durante 6 h. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, el disolvente se evaporó a vacío. Al residuo resultante, se añadió  $\text{NaOH}$  ac. 1,0 N (1,18 l) y THF (502 ml). La mezcla heterogénea se calentó hasta  $45^\circ\text{C}$  durante 1 h. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, y se añadió EtOAc (1,38 l). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (0,75 l). Los orgánicos se combinaron, se lavaron con  $\text{NaHCO}_3$  ac. saturado (500 ml) y  $\text{NaCl}$  ac. saturado (500 ml). Los orgánicos se concentraron a vacío para producir el compuesto del título como un aceite marrón (184,1 g, 91,6% de rendimiento teniendo en cuenta los disolventes residuales). RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 7,49 - 7,42 (m, 1H), 7,40 - 7,33 (m, 1H), 7,26 - 7,15 (m, 2H), 6,26 (s, 2H), 4,77 - 4,54 (m, 1H), 4,40 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 3,80 (dd,  $J = 7,9, 2,3$  Hz, 1H), 3,24 - 3,17 (m, 1H), 3,00 (dd,  $J = 13,9, 3,2$  Hz, 1H), 2,85 (dd,  $J = 13,9, 3,9$  Hz, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 159,75 (d,  $J_{\text{CF}} = 245,1$  Hz), 149,51, 131,31 (d,  $J_{\text{CF}} = 3,9$  Hz), 130,13 (d,  $J_{\text{CF}} = 8,8$  Hz), 128,08 (d,  $J_{\text{CF}} = 10,4$  Hz), 128,28 (c,  $J_{\text{CF}} = 282,1$  Hz), 124,87 (d,  $J_{\text{CF}} = 3,0$  Hz), 116,80 (d,  $J = 23,8$  Hz), 78,77, 76,80 (c,  $J_{\text{CF}} = 30,8$  Hz), 66,31, 36,37, 23,27.

HRMS Calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{F}_4\text{N}_2\text{OS}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  321,0685; observado 321,0677.

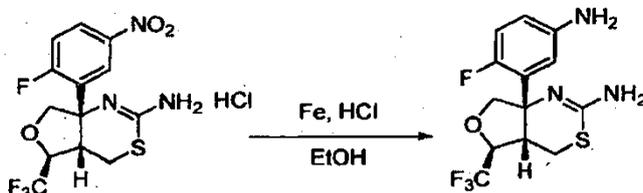
1-(24) Síntesis de hidrocloreuro de (4*aS*,5*S*,7*aS*)-7*a*-(2-fluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4*a*,5,7,7*a*-tetrahidro-4*H*-furo[3,4-*d*][1,3]tiazin-2-amina



A una vasija enfriada que contiene (4*aS*,5*S*,7*aS*)-7*a*-(2-fluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4*a*,5,7,7*a*-tetrahidro-4*H*-furo[3,4-*d*][1,3]tiazin-2-amina (184,1 g, 574,8 mmoles) se añadió ácido trifluoroacético (0,954 kg) en porciones mientras la

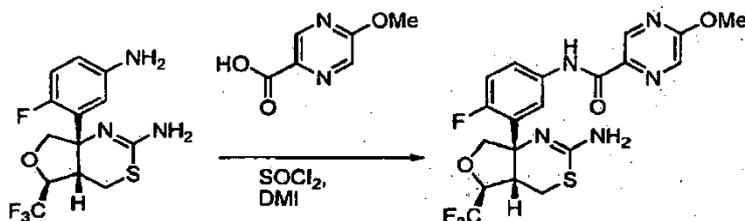
- temperatura se mantuvo por debajo de 20°C. La mezcla se enfrió hasta 3,5°C, y se añadió ácido sulfúrico (146 ml, 2,73 moles) durante 20 min., mientras la temperatura se mantuvo por debajo de 5°C. Se añadió ácido nítrico fumante (39,8 ml, 0,948 moles) durante 30 min., mientras la temperatura se mantuvo por debajo de 10°C. Después de 1,5 h a 0-10°C, la mezcla de reacción se paralizó lentamente transfiriéndola a una disolución ac. de NaOH (575 g, 14,4 moles) en agua (4,6 l) enfriada hasta 5°C. La suspensión resultante se agitó durante 1 h a 21°C. La suspensión se filtró entonces, y el sólido se enjuagó con agua fría (920 ml). El sólido se secó a vacío hasta peso constante, y después se disolvió en etanol (1,05 l). La disolución se calentó hasta 35°C, y se añadió HCl conc. (55,6 ml, 0,690 moles) mientras se mantenía la temperatura por debajo de 40°C. La suspensión se enfrió entonces hasta -5°C, se mantuvo durante 1 h y se filtró. El sólido se enjuagó con etanol frío (420 ml) y se secó hasta peso constante para obtener el compuesto del título (185,0 g, 87,3%). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO) δ ppm 11,80 (s, 2H), 8,45 - 8,36 (m, 1H), 8,31 (dd, *J* = 6,6,2,5 Hz, 1H), 7,66 (dd, *J* = 11,1, 9,3 Hz, 1H), 4,96 - 4,72 (m, 1H), 4,58 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 4,27 (d, *J* = 9,9 Hz, 1H), 3,76 - 3,66 (m, 1H), 3,39 (dd, *J* = 14,9, 3,6 Hz, 1H), 3,24 (dd, *J* = 14,3, 4,6 Hz, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO) δ ppm 168,34, 163,33 (d, *J*<sub>CF</sub> = 257,8 Hz), 144,58, 127,61 (d, *J*<sub>CF</sub> = 11,6 Hz), 125,84, 124,10, 119,28 (d, *J*<sub>CF</sub> = 26,5 Hz), 77,38 (c, *J*<sub>CF</sub> = 31,5 Hz), 75,99, 65,88 (d, *J*<sub>CF</sub> = 4,8 Hz), 40,36, 23,98.
- 15 HRMS Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>F<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 366,0536; observado 366,0523.

1-(25) Síntesis de (4a*S*,5*S*,7a*S*)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-*d*][1,3]tiazin-2-amina



- Se añadió etanol (0,975 l) a hierro en polvo (62,5 g, 1,12 moles) en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió HCl concentrado (9,03 ml) a temperatura ambiente, y la suspensión se calentó hasta 65°C durante 1,5 h. La suspensión se enfrió entonces hasta 50°C, y se añadió NH<sub>4</sub>Cl ac. sat. (299 g). La temperatura de la mezcla de reacción se dejó alcanzar 50°C, y se añadió en porciones hidrocloruro de (4a*S*,5*S*,7a*S*)-7a-(2-fluoro-5-nitrofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-*d*][1,3]tiazin-2-amina (75,0 g, 187,0 moles), mientras se mantenía la temperatura por debajo de 68°C. Después de 30 min., se añadió etanol (0,45 l), y la mezcla de reacción se enfrió hasta 20-25°C durante 1 h. La suspensión se agitó durante 2 h y se filtró sobre Celite (75 g), aclarando con etanol (0,972 l). La disolución se concentró a vacío hasta un sólido marrón. Se añadió agua (0,9 l) seguido de NaOH 3,0 N (0,187 l, 560 mmoles), mientras se mantenía la temperatura por debajo de 35°C. La suspensión resultante se agitó durante 1 h a 20-25°C. La suspensión se filtró, y el sólido se enjuagó con agua fría (0,38 l). El sólido se secó a vacío a 40-45°C durante 24 h para obtener el compuesto del título (57,7 g, 95,5 %). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO) δ ppm 6,81 (dd, *J* = 12,5, 8,6 Hz, 1H), 6,62 (dd, *J* = 7,0, 2,9 Hz, 1H), 6,50 - 6,42 (m, 1H), 6,16 (s, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,72 - 4,54 (m, 1H), 4,35 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 3,74 (dd, *J* = 7,8, 2,5 Hz, 1H), 3,18 - 3,08 (m, 1H), 3,01 (dd, *J* = 13,9, 3,0 Hz, 1H), 2,84 (dd, *J* = 13,8,3,8 Hz, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO) δ ppm 156,20 (d, *J*<sub>CF</sub> = 243,0 Hz), 148,73, 145,49, 127,86 (d, *J*<sub>CF</sub> = 11,0 Hz), 116,79 (d, *J*<sub>CF</sub> = 24,8 Hz), 116,10 (d, *J*<sub>CF</sub> = 3,3 Hz), 114,10 (d, *J*<sub>CF</sub> = 8,0 Hz), 78,89, 76,57 (c, *J*<sub>CF</sub> = 31,0 Hz), 66,35, 36,35, 23,11. HRMS Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>F<sub>4</sub>N<sub>3</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> 336,0794; observado 336,0789.
- 35 El compuesto del título se sometió a un ensayo de Ames (*Salmonella typhimurium* tester strains TA98, TA100, TA1535 y TA1537 y *Escherichia coli* tester strain WP2 *uv*. Mutation Research 1975, 31, 347; Mutation Research 1976, 38, 3; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1976, 73, 950; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1975, 72, 5135) en ausencia y en presencia de hígado de rata S9. El compuesto fue negativo hasta la dosis/concentración más elevada ensayada (5000 ug/placa).

- 40 1-(26) Síntesis de N-(3-((4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida



- Una suspensión de ácido 5-metoxipirazin-2-carboxílico (26,29 g, 0,17 moles) en N,N'-dimetilimidazolin-2-ona (160 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 15 min., después se enfrió hasta 2,2°C. Se añadió cloruro de tionilo (14,7 ml, 0,202 moles), mientras se mantenía la temperatura por debajo de 5°C. La suspensión resultante se agitó a 0-10°C durante 2 h mientras se convertía en una disolución transparente. En otra vasija, se disolvió (4a*S*,5*S*,7a*S*)-

7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (52,0 g, 0,155 moles) en N,N'-dimetilimidazolin-2-ona (160 ml). La disolución resultante se añadió a la disolución de cloruro de acilo, mientras se mantenía la temperatura por debajo de 10°C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. Se cargó agua (780 ml), mientras se mantenía la temperatura por debajo de 30°C. La mezcla resultante se agitó durante 30 min., y después se añadió EtOAc (780 ml). A esta mezcla se añadió, NaOH ac. al 50% (84,8 g) hasta que el pH de la capa acuosa alcanzó 11. La capa ac. se extrajo con EtOAc (260 ml). Los orgánicos se combinaron, se lavaron con NaCl ac. sat. (260 ml) y con agua (260 ml). Los orgánicos se filtraron sobre una almohadilla de Celite (26 g) y se enjuagaron con EtOAc (260 ml). Los orgánicos se concentraron a vacío para producir un sólido. Al sólido se añadió 1-propanol (728 ml), y la suspensión se calentó hasta 75°C hasta que se formó una disolución transparente. La disolución se enfrió hasta -10°C y se mantuvo durante 1 h. El sólido se filtró, se enjuagó con 1-propanol frío (104 ml) y se secó a vacío (35°C) hasta peso constante para producir el compuesto del título (62,1 g, 84,9 %). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO) δ ppm 10,56 (s, 2H), 8,88 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 8,39 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,95 - 7,83 (m, 2H), 7,18 (dd, J = 12,0, 8,8 Hz, 1H), 6,25 (s, 2H), 4,76 - 4,60 (m, 1H), 4,36 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 4,01 (s, 3H), 3,88 (dd, J = 7,9, 2,3 Hz, 1H), 3,23 - 3,11(m, 2H), 2,91 (dd, J = 13,8,3,6 Hz, 1H); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO) 8 ppm 162,11, 161,93, 156,13 (d, J<sub>CF</sub> = 242,9 Hz), 149,38, 142,01, 138,35, 135,09, 133,98, 128,53 (d, J<sub>CF</sub> = 11,6 Hz), 126,06 (c, J<sub>CF</sub> = 282,0 Hz), 123,32, 121,93 (d, J<sub>CF</sub> = 8,6 Hz), 116,76 (d, J<sub>CF</sub> = 25,1 Hz), 78,86 (d, J<sub>CF</sub> = 6,9 Hz), 76,94 (c, J<sub>CF</sub> = 30,5 Hz), 66,37, 54,75, 36,44, 23,53.

HRMS Calculado para C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 472,1066; observado 472,1052.

Rotación óptica específica [α]<sub>D</sub> +110,5 (c 0,519, MeOH)

20 Parámetros de rotación óptica específicos:

Equipo:

Polarímetro: Perkin Elmer, modelo 341 o equivalente.

Celda: Celda Microglass, longitud de recorrido 100 mm, capacidad 1,0 ml, n° de cat. de Perkin-Elmer B001-7047.

25 Balanza: Balanza analítica calibrada capaz de pesar ± 0,1 mg

Baño de Agua: Congelador NESLAB RTE 1121 o equivalente.

Material de vidrio volumétrico: Clase A.

Patrón de cuarzo: número ID 098799, o equivalente.

Polarímetro: Perkin Elmer, modelo 341 o equivalente.

30 Equipo:

Reactivos:

Metanol: grado HPLC, Baker (n° de catálogo 9093-03) o equivalente

Parámetros del Instrumento:

Lámpara: Na/Hal, n° de cat. de Perkin-Elmer B000-8754

35 Celda: Microcell (100 mm), n° de cat. de Perkin-Elmer B004-1693

Trayecto de Célula: 100 mm (1 decímetro)

Modo: ROT

Longitud de onda: 589 nm

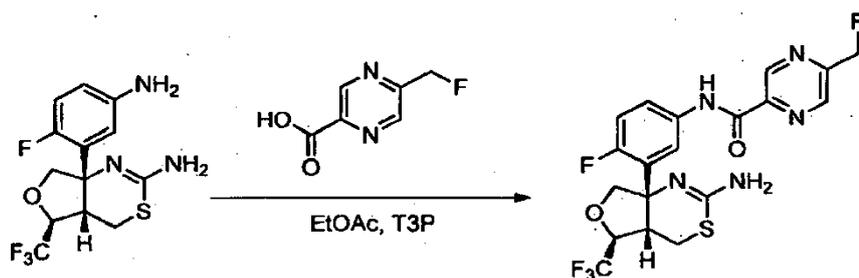
Temperatura de la celda: 20°C

40 Tiempo de integración: 2 segundos

Abertura: MICRO

Temperatura del baño de agua: 20 ± 1°C

**Preparación alternativa de N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][3,1]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(fluorometil)pirazin-2-carboxamida (Ejemplo 8)**



Se cargaron a un reactor ácido 5-(fluorometil)pirazin-2-carboxílico (32,6 g, 1,05 equiv.) y (4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (70,0 g, 1,0 equiv.)<sup>1</sup>, y se añadió acetato de etilo (EtOAc, 630 ml) a la mezcla para dar una suspensión. Una disolución de anhídrido del ácido n-propanofosfónico (T3P, 146 g, 1,10 equiv., 50% en peso en EtOAc) se añadió a temperatura ambiente mientras se controla la temperatura interna por debajo de 30°C. La mezcla de reacción se agitó a 40-45°C >3 horas, y se monitorizó mediante HPLC. La mezcla de reacción se enfrió hasta 15-20°C, y se cargó agua (140 ml). Después de 10-15 minutos, se cargó hidróxido de amonio al 28% (175 ml), mientras se controla la temperatura por debajo de 30°C. Se añadió EtOAc (245 ml), y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se separó y se volvió a extraer con EtOAc (490 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con NaCl ac. al 15% (140 ml) y con agua (140 ml). La capa orgánica se filtró sobre Celite (1,0 peso) y se enjuagó con EtOAc (140 ml). La disolución se concentró a vacío para obtener un sólido beige (rendimiento bruto cuantitativo) que se recristalizó en 1-propanol para producir N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(fluorometil)pirazin-2-carboxamida como un sólido blanco (70,0 g).

RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO) δ 10,89 (s, 1H), 9,30 (s, 1H), 8,89 (s, 1H), 7,95 (dd, J = 7,3, 2,7 Hz, 1H), 7,94 - 7,89 (m, 1H), 7,21 (dd, J = 12,0, 8,8 Hz, 1H), 6,22 (s, 2H), 5,71 (d, J = 46,3 Hz, 2H), 4,77 - 4,61 (m, 1H), 4,37 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 3,87 (dd, J = 8,0, 2,7 Hz, 1H), 3,20 (dt, J = 7,0, 3,5 Hz, 1H), 3,15 (dd, J = 13,9, 3,1 Hz, 1H), 2,91 (dd, J = 13,8, 3,8 Hz, 1H). RMN de <sup>13</sup>C (126 MHz, DMSO) δ 161,32 (s), 155,82 (d, J = 243,4 Hz), 153,71 (d, J = 18,7 Hz), 148,77 (s), 144,71 (d, J = 1,9 Hz), 143,30 (s), 141,01 (d, J = 5,6 Hz), 134,36 (d, J = 2,0 Hz), 128,20 (d, J = 12,1 Hz), 125,57 (c, J = 283,0 Hz), 123,12 (d, J = 3,6 Hz), 121,64 (d, J = 8,6 Hz), 116,35 (d, J = 25,2 Hz), 82,55 (d, J = 165,8 Hz), 78,37 (s), 76,44 (c, J = 30,6 Hz), 65,89 (d, J = 5,3 Hz), 35,89 (s), 23,01 (s). HRMS Calculado para C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>F<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 474,1023; observado 474,1032.

Rotación óptica específica:  $[\alpha]_D^{20} = +102,4$

<sup>1</sup> Aquí anteriormente se ha descrito una preparación de (4aS, 5S, 7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina en la etapa 1-(25) en la preparación alternativa de N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida (Ejemplo 1).

Ensayo celular in vitro:

Cuantificación del péptido Aβ en el cultivo de neuronas del cerebro de feto de rata

(1) Cultivo neuronal primario de rata

Los cultivos neuronales primarios se prepararon a partir de la corteza cerebral de ratas Wistar embrionarias de 18 días (Charles River, Reino Unido). Específicamente, los embriones se eliminaron asépticamente de ratas preñadas bajo anestesia de éter. El cerebro se aisló del embrión y se sumergió en HBSS (Sigma Aldrich # H9269) que contiene 10 mM de HEPES (Gibco # 15630-056). La corteza cerebral se recogió del cerebro aislado, bajo un microscopio estereoscópico. Los fragmentos de la corteza cerebral recogidos se trataron enzimáticamente en una disolución enzimática que contiene 0,05% de disolución de tripsina-EDTA (GIBCO, # 25300) a 37°C durante 20 minutos para dispersar las células. Las células se lavaron entonces dos veces y después se resuspendieron gentilmente en medio Neurobasal (Gibco # 21103) suplementado con 2% de suplemento B27 (GIBCO # 17504-044), 0,5 mM de L-glutamina (Gibco # 25030), 1x N2 (GIBCO # 17502-048), penicilina/estreptomicina 100 ug/ml (GIBCO 15140-122) y 5% de FCS inactivado por calor (PAA #A15-701). La dispersión celular se filtró a través de una malla de nylon de 40 μm (BD Falcon #352340) para eliminar la masa celular restante, y de esta manera se obtuvo una suspensión celular neuronal. La suspensión celular neuronal se diluyó con el medio anterior y después se cultivó en placas en un volumen de 100 μl/pocillo hasta una densidad celular inicial de 3,25 x 10<sup>5</sup> células/ml en una placa de cultivo de 96 pocillos recubiertos con poli-D-lisina (Greiner #655940). Las células cultivadas en placas se cultivaron en la placa de cultivo a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>-95% de aire durante 24 horas. La cantidad total del medio se reemplazó por un "medio Neurobasal de ensayo" (como anteriormente, excluyendo el FCS inactivado por calor), y entonces las células se cultivaron durante otros cinco días.

(2) Adición del compuesto

El fármaco se añadió a la placa de cultivo en el día 6 de cultivo de la siguiente manera. Se generaron 8 puntos de diluciones en serie de compuestos en DMSO a una concentración de x1000 la de la concentración del ensayo final (FAC). Las disoluciones del compuesto se prepararon entonces añadiendo 999  $\mu$ l del “medio Neurobasal de ensayo” (como se describe en la sección anterior) a 1  $\mu$ l de lote del compuesto en DMSO. La cantidad total del medio se eliminó de cada uno de los pocillos de la placa celular, y se añadieron 140  $\mu$ l/pocillo de “medio Neurobasal de ensayo” seguido de 60  $\mu$ l de la disolución del compuesto. La concentración final de DMSO fue 0,1%.

5

(3) Toma de muestras

Las células se cultivaron durante 1 o 3 días después de la adición del compuesto para los ensayos ABx-40 y ABx-42, respectivamente. Se recogieron 150  $\mu$ l de medio de muestra y se usaron como la muestra de ELISA.

10

(4) Evaluación de la supervivencia celular

La supervivencia celular se evaluó usando un ensayo de Alamar según el siguiente procedimiento. Después de recoger la muestra a usar en el ensayo de ELISA, se añadieron 50  $\mu$ l de disolución al 20% de azul de Alamar (Invitrogen #DAL1100) en el medio Neurobasal de ensayo a 50  $\mu$ l de muestra restante en cada pocillo. Las células se incubaron entonces a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>-95% de aire durante 1 hora.

15

La medida de la intensidad de fluorescencia para cada pocillo se llevó a cabo a 540/590 nm usando un lector de placas Pherastar plus (BMG Labtech). Tras la medida, los pocillos que no tienen células en las placas y que solamente contienen el medio y disolución de Alamar se fijaron como fondo (bkg).

(5) ELISA de A $\beta$

20

Se usó el kit de ELISA de  $\beta$ -Amiloide (42) humano/rata de Wako (#290-62601) y el kit de ELISA de  $\beta$ -Amiloide (40) humano/rata de Wako (#294-62501) de Wako Pure Chemical Industries, Ltd., para ELISA de A $\beta$ . El ELISA de A $\beta$  se llevó a cabo según los protocolos recomendados por los fabricantes, descritos en los documentos que acompañan a los kits. Los resultados se mostraron como porcentaje de los grupos de control, y los valores de IC<sub>50</sub> para cada compuesto se determinaron usando modelos de ajuste logístico de cuatro parámetros usando el paquete de software XLFIT5 (IDBS).

25

Los compuestos de la presente invención tienen un efecto reductor de la producción de A $\beta$ 42.

El compuesto de la fórmula general (I) o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la presente invención tiene un efecto reductor de la producción de A $\beta$ 42. De este modo, la presente invención puede proporcionar en particular un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad neurodegenerativa causada por A $\beta$  tal como demencia de tipo Alzheimer o síndrome de Down.

30

Como se midió mediante el ensayo *in vitro* anterior, los Ejemplos de compuestos 1 a 18 mostraron valores de IC<sub>50</sub> menores que 0,1  $\mu$ M como se muestra en la Tabla 5:

Tabla 5:

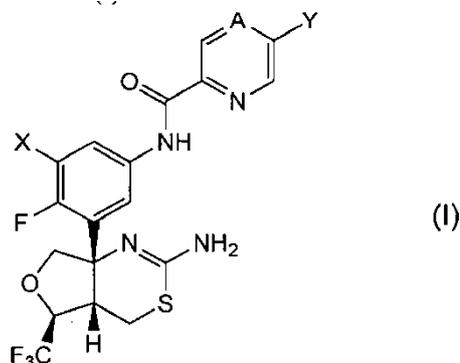
Ejemplo	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Ejemplo	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1	0,008	11	0,010
2	0,004	12	0,006
3	0,004	13	0,044
4	0,008	14	0,002
5	0,012	15	0,007
6	0,006	16	0,009
7	0,008	17	0,051
8	0,006	18	0,015

ES 2 575 914 T3

9	0,007		
10	0,010		

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

5 en la que

X es hidrógeno o flúor;

A es CH o N;

Y es metilo, etilo, monofluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, difluoroetilo, metoxi, etoxi, metoximetilo o -C≡N.

10 2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que X es hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que A es N, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que Y es metilo, monofluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo o metoxi, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto se selecciona de:

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida;

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-cianopicolinamida;

20 N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida;

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)picolinamida;

25 N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metilpirazin-2-carboxamida;

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metilpicolinamida;

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-etilpicolinamida;

30 N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(fluorometil)pirazin-2-carboxamida;

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida;

35 N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-etoxipirazin-2-carboxamida;

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(1,1-difluoroetil)pirazin-2-carboxamida;

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)pirazin-2-carboxamida;

5 N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(metoximetil)pirazin-2-carboxamida;

N-(3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5-dihidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a(7H)-il]-4-fluorofenil)-5-[(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)metiloxi]pirazin-2-carboxamida;

10 N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida;

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida;

N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-metilpirazin-2-carboxamida;

15 N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4,5-difluorofenil)-5-(fluorometil)-pirazin-2-carboxamida;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto según la reivindicación 1, el cual es N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un compuesto según la reivindicación 1, el cual es N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-(fluorometil)pirazin-2-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Un compuesto según la reivindicación 1, el cual es N-(3-((4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(trifluorometil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il)-4-fluorofenil)-5-etoxipirazin-2-carboxamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia.

10. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso para tratar una enfermedad neurodegenerativa tal como demencia de tipo Alzheimer (EA), síndrome de Down, angiopatía amiloide cerebrovascular (AAC), deterioro cognitivo leve (DCL), pérdida de memoria, demencia presenil, demencia senil, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, y otras demencias degenerativas tales como demencias de origen vascular y degenerativo mixto, demencia asociada con parálisis supranuclear, demencia asociada con degeneración basal cortical, demencia asociada con la enfermedad de Parkinson (EP), y demencia asociada a EA de tipo cuerpos difusos de Lewy.

11. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa tal como demencia de tipo Alzheimer (EA), síndrome de Down, angiopatía amiloide cerebrovascular (AAC), deterioro cognitivo leve (DCL), pérdida de memoria, demencia presenil, demencia senil, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, y otras demencias degenerativas tales como demencias de origen vascular y degenerativo mixto, demencia asociada con parálisis supranuclear, demencia asociada con degeneración basal cortical, demencia asociada con la enfermedad de Parkinson (EP), y demencia asociada a EA de tipo cuerpos difusos de Lewy.

12. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso para tratar demencia de tipo Alzheimer (EA).

13. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de demencia de tipo Alzheimer (EA).

14. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como ingrediente activo en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.

15. Un producto farmacéutico que comprende, en combinación, un primer ingrediente activo que es un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos un ingrediente activo adicional útil en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

Figura 1: Un cromatograma típico de un aislamiento mediante HPLC quiral del compuesto 1-(20)

