

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 285**

51 Int. Cl.:

**C07D 513/04** (2006.01)

**A61K 31/542** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2015 PCT/US2015/018909**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138208**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2015 E 15714991 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 3116881**

54 Título: **Compuestos de aminotiazina**

30 Prioridad:

**14.03.2014 US 201461953206 P**

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

**12.09.2018**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**MARTIN, FIONNA MITCHELL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 681 285 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).

## DESCRIPCION

Compuestos de aminotiazina

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de aminotiazina, a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, a los compuestos para su uso en el tratamiento de trastornos fisiológicos, y a compuestos intermedios y procedimientos útiles en la síntesis de los compuestos.

La presente invención pertenece al campo del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades y trastornos que implican al péptido amiloide  $\beta$  (Abeta), un segmento péptido neurotóxico y altamente agregador de la proteína precursora del amiloide (APP). La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo devastador que afecta a millones de pacientes en todo el mundo. A la vista de los agentes en el mercado actualmente aprobados que proporcionan beneficios sintomáticos, únicamente transitorios, al paciente, existe una necesidad no atendida significativa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

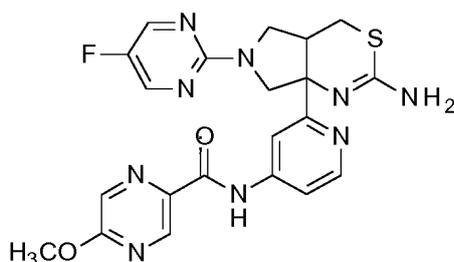
La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la generación, agregación, y deposición de Abeta en el cerebro. Se ha mostrado que la inhibición completa o parcial de  $\beta$ -secretasa (enzima de escisión de la proteína precursora del amiloide en el sitio  $\beta$ ; BACE) tiene un efecto significativo sobre patologías relacionadas con la placa o dependientes de la placa en modelos de ratones, lo que sugiere que, incluso pequeñas reducciones en los niveles de péptido Abeta, podrían dar como resultado una reducción significativa a largo plazo en la carga de la placa y de déficits sinápticos, proporcionando, de esta forma, beneficios terapéuticos significativos, particularmente en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El Documento WO 2014/013076 divulga derivados de isotiourea que son inhibidores de BACE útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas causadas por el péptido Abeta, tal como demencia del tipo de Alzheimer. La Patente de EE.UU. No. 8.158.620 divulga derivados de aminodihidrotiazina fusionados que poseen actividad inhibidora de BACE, y se han divulgado además como agentes terapéuticos útiles para una enfermedad neurodegenerativa causada por el péptido Abeta, tal como la demencia del tipo de Alzheimer.

Los inhibidores de BACE con penetración del sistema nervioso central (CNS) son deseados para proporcionar tratamientos para trastornos mediados por el péptido Abeta, tal como la enfermedad de Alzheimer. La presente invención proporciona ciertos nuevos compuestos que son inhibidores de BACE. Además, la presente invención proporciona ciertos nuevos compuestos que penetran el CNS, tiene un perfil de efecto secundario mejorado, y propiedades fisicoquímicas mejoradas, tal como solubilidad mejorada.

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:

Fórmula I



o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

La presente invención proporciona igualmente un compuesto de Fórmula I o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo para su uso en la inhibición de BACE.

La presente invención proporciona igualmente un compuesto de Fórmula I o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo para su uso en la inhibición de la escisión mediada por BACE de proteína precursora de amiloide.

La presente invención proporciona igualmente un compuesto de Fórmula I o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo para su uso en la inhibición de la producción del péptido Abeta.

Además, esta invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo para su uso en terapia. Además, esta invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Esta invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo para su uso en la prevención de la progresión del deterioro cognitivo moderado a la enfermedad de Alzheimer. Incluso además, esta invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Esta invención proporciona igualmente el

uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, para la fabricación de un medicamento para la prevención de la progresión del deterioro cognitivo moderado a la enfermedad de Alzheimer.

5 La invención proporciona además una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes, aceptables farmacéuticamente. En una realización particular, la composición comprende además uno o más de otros agentes terapéuticos. La presente invención abarca igualmente nuevos compuestos intermedios y procedimientos para la síntesis de los compuestos de Fórmula I.

10 El término “prevención de la progresión del deterioro cognitivo moderado a la enfermedad de Alzheimer” incluye el retardo, detención, o reversión de la progresión del deterioro cognitivo moderado a la enfermedad de Alzheimer en un paciente.

Tal como se usa en la presente invención, los términos “tratamiento” o “para tratar” incluye la contención, retardo, detención, o reversión de la progresión o severidad de un síntoma o trastorno existente.

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

15 El término “inhibición de la producción de péptido Abeta” se toma para indicar la disminución de los niveles *in vivo* de péptido Abeta en un paciente.

Tal como se usa en la presente invención, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad o dosis de compuesto de la invención, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, la cual, mediante administración de dosis individual o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.

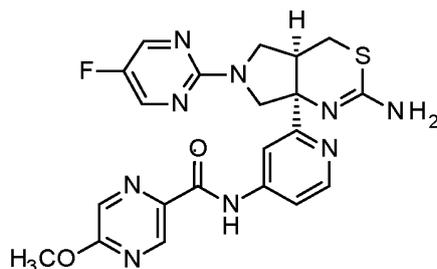
20 Una cantidad eficaz puede ser fácilmente determinada por el diagnosticador que le esté atendiendo, tal como un experto en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas y mediante la observación de resultados obtenidos bajo circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad eficaz para un paciente, se consideran un cierto número de factores por el diagnosticador que le esté atendiendo, incluyendo pero sin limitarse a ellos, la especie de paciente; su tamaño, edad, y salud general; la enfermedad o trastorno específico implicado; el grado de implicación o la severidad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

30 Los compuestos de la presente invención son generalmente eficaces dentro de un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente están comprendidas dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. En algunas circunstancias, niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente mencionado pueden ser más que adecuados, en tanto que en otros casos pueden usarse dosis aún más grandes con efectos secundarios aceptables y, por ello, el intervalo de dosificación anterior no está destinado a limitar de ninguna manera el ámbito de la invención.

35 Los compuestos de la presente invención están preferiblemente formulados como composiciones farmacéuticas administradas por cualquier vía que haga al compuesto biodisponible, incluyendo las vías oral y parenteral. Lo más preferiblemente, dichas composiciones son para administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para la preparación de las mismas son bien conocidas en la técnica. (Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, (2006)).

40 Los compuestos de Fórmula I son particularmente útiles en el tratamiento de los trastornos divulgados en la presente invención, pero ciertos grupos, substituyentes y configuraciones, son preferidos para compuestos de la Fórmula I. Los párrafos siguientes describen dichos grupos, substituyentes y configuraciones preferidos. Se da por entendido que estas preferencias son aplicables tanto a los usos como a los nuevos compuestos de la invención.

El compuesto de la fórmula siguiente en la configuración cis:



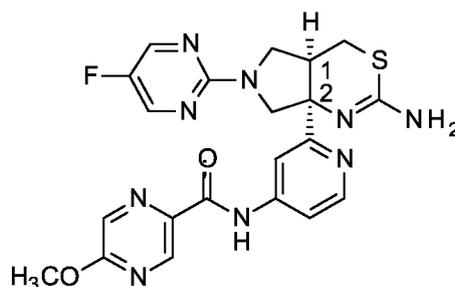
o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, es preferido.

La N-[2-[(4aR,7aR)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-piridil]-5-metoxi-pirazino-2-carboxamida o una sal aceptable farmacéuticamente de la misma es además preferida.

La N-[2-[(4aR,7aR)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-piridil]-5-metoxi-pirazino-2-carboxamida es especialmente preferida.

- 5 Un experto normal en la técnica comprenderá que los compuestos de la invención están comprendidos por un núcleo que contiene dos centros quirales tal como se muestra a continuación en el Esquema A:

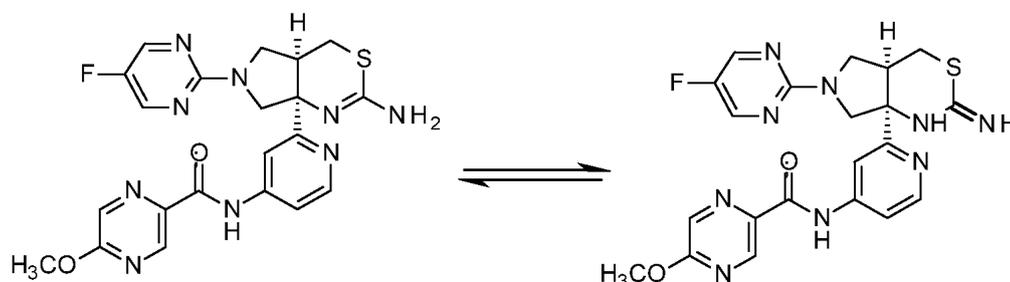
Esquema A



- 10 Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros y diastereómeros individuales, así como mezclas de los enantiómeros de dichos compuestos, incluyendo racematos, los compuestos con la configuración absoluta en los átomos de carbono marcados como 1 y 2, tal como se ilustra en el Esquema A, son compuestos preferidos de la invención.

- 15 Un experto normal en la técnica comprenderá que los compuestos de la invención pueden existir en formas tautoméricas, tal como se representan en el Esquema B. Cuando se da cualquier referencia en la presente solicitud a uno de los tautómeros específicos de los compuestos de la invención, se da por entendido que abarca ambas formas tautoméricas y todas las mezclas de los mismos.

Esquema B



- 20 Ciertos centros estereoquímicos se han dejado sin especificar con fines de claridad y no están destinados de ninguna manera a limitar la enseñanza de las preparaciones y ejemplos. Además, los isómeros, enantiómeros, y diastereómeros individuales pueden separarse o resolverse por un experto normal en la técnica, en cualquier punto conveniente en la síntesis de compuestos de Fórmula I, mediante procedimientos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (Véase, por ejemplo, J. Jacques, y otros, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel y S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Las designaciones "isómero 1" e "isómero 2" se refieren a los compuestos que eluyen a partir de la primera y segunda cromatografía quiral, y si la cromatografía quiral se ha iniciado al comienzo de la síntesis, la misma designación se aplica a los compuestos intermedios y ejemplos subsiguientes.

- 30 Adicionalmente, ciertos compuestos intermedios descritos en las preparaciones siguientes pueden contener uno o más grupos de protección de nitrógeno. El grupo de protección variable puede ser el mismo o diferente en cada caso, dependiendo de las condiciones de reacción particulares y de las transformaciones particulares a realizar. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas para el técnico experto y se encuentran descritas en la literatura (Véase, por ejemplo, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", Fourth Edition, por Peter G.M. Wuts y Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc., 2007).

- 35 Ciertas abreviaturas se definen tal como sigue: "APP" se refiere a proteína precursora de amiloide; "DMEM" se refiere a Medio de Eagle modificado de Dulbecco; "DMSO" se refiere a sulfóxido de dimetilo; "F12" se refiere a medio F12 de Ham; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "FRET" se refiere a transferencia de energía de resonancia por fluorescencia; "HB-PS" se refiere a solución salina fisiológica tamponada de HEPES; "HEK" se refiere a riñón em-

briónico humano; "HEPES" se refiere a ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1il]etanosulfónico; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alta eficacia; "IC<sub>50</sub>" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibitoria máxima posible para dicho agente; "JhonPhos!" se refiere a *di*terc-butil-(2-fenilfenil)fosfano; "min" se refiere a minuto o minutos; "MTBE" se refiere a metil *terc*-butil éter; "PDAPP" se refiere a proteína precursora de amiloide obtenido de plaquetas; "RFU" se refiere a unidad de fluorescencia relativa; "SFC" se refiere a cromatografía fluida supercrítica; y "SEM" se refiere a error típico de la media.

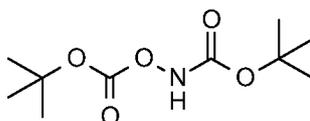
Los compuestos de la presente invención, o las sales de los mismos, pueden prepararse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en las Preparaciones y Ejemplos más adelante. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes maneras para preparar los compuestos de Fórmula I, o sales de los mismos. Los productos de cada etapa en las preparaciones y ejemplos a continuación, pueden recuperarse mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, incluyendo la extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración, y cristalización. Los reactivos y materiales de partida se encuentran fácilmente disponibles para un experto normal en la técnica.

En una etapa opcional, una sal aceptable farmacéuticamente de un compuesto de Fórmula I, tal como una sal hidrocioruro, puede formarse mediante la reacción de una base libre apropiada de Fórmula I con un ácido aceptable farmacéuticamente apropiado en un disolvente adecuado bajo condiciones estándar. Adicionalmente, la formación de dichas sales puede producirse simultáneamente mediante protección de un grupo de protección de nitrógeno. La formación de dichas sales es bien conocida y valorada en la técnica. Véase, por ejemplo, Gould, P.L., "Salt selection for basis drugs", International Journal of Pharmaceutics, vol. 33, págs. 201-217, (1986); Bastin, R.J., y otros "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities", Organic Process Research and Development, vol. 4, págs. 427-435, (2000); y Berge, S.M., y otros, "Pharmaceuticals Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 66, págs. 1-19, (1977).

Las preparaciones y ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención.

#### Preparación 1

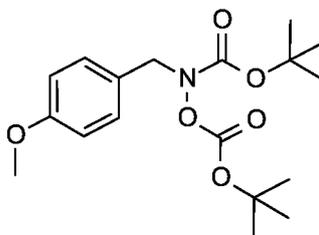
Carbonato de (*terc*-butoxicarbonilamino) *terc*-butilo



Una mezcla de hidrocioruro de hidroxilamina (550,0 mg, 7,9 mol), agua (5,5 l) y una solución de heptano/MTBE (5:1, 5,5 l), se enfrió a -5°C. Durante 2 horas, se agregó lentamente una solución pre-enfriada (-5°C) de di-*t*-butildicarbonato (3,55 kg, 16,3 mol), trietilamina (1,67 kg, 16,5 mol) en forma de una solución en heptano/MTBE (5:1, 1,1 l). La reacción se agitó a -5°C durante 1 hora y, a continuación, se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó dos veces con cloruro amónico acuoso saturado (2 l) y solución de cloruro sódico acuoso saturado (1 l), se secó sobre sulfato sódico, se filtró, y se concentró, proporcionando un aceite, el cual cristalizó en forma de un sólido de color blanco. El sólido se agitó con heptano (1 l) en un baño de agua-hielo y se filtró, proporcionando el producto del epígrafe (1360,2 g, 73%). RMN-<sup>1</sup>H (d<sub>6</sub>-DMSO) δ 10,83-10,58 (m, 1H), 1,43 (d, J= 11,3 Hz, 18H).

#### Preparación 2

Carbonato de [*terc*-butoxicarbonil-(4-metoxifenil)metil]amino] *terc*-butilo

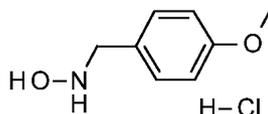


Un reactor de 20 l, bajo nitrógeno, se cargó con carbonato de (*terc*-butoxicarbonilamino) *terc*-butilo (812,9 g, 3,48 mol), dimetilformamida (4,4 l), carbonato potásico (626,5 g, 4,52 mol) y 1-(clorometil)-4-metoxi-benceno (462 ml, 2,56 mol). La mezcla se agitó a 40°C durante una noche. El análisis mediante RMN-<sup>1</sup>H mostró una reacción incompleta. Se agregó carbonato potásico adicional (626,5 g, 4,52 mol) y la mezcla se agitó a 40°C. El análisis mediante RMN-<sup>1</sup>H después de 48 horas mostró que la reacción era aún incompleta. Se agregó carbonato potásico adicional (482 g, 3,49 mol) y la mezcla se agitó a 40°C. El análisis mediante RMN-<sup>1</sup>H después de reacción durante una noche mostró reacción completa sin material de partida remanente. Se agregaron agua (5 l) y MTBE (5 l) y las capas se separa-

ron. La capa orgánica se lavó con agua (2x3 l), se secó sobre sulfato sódico y se concentró, proporcionando el compuesto del epígrafe (1,21 kg, 98%). RMN-<sup>1</sup>H (d<sub>6</sub>-DMSO) δ 7,20 (d, J= 8,3 Hz, 2H), 6,91 (d, J= 8,3 Hz, 2H), 3,73 (s, 2H), 3,35 (s, 3H), 1,41 (s, 18H).

## Preparación 3

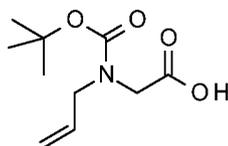
## 5 Hidrocloruro de N-[(4-metoxifenil)metil]hidroxilamina



Se disolvió carbonato de [terc-butoxicarbonil-[(4-metoxifenil)metil]amino] terc-butilo (1,125 kg, 3,1 mol) en 1,4-dioxano (2,8 l) y se agregó, gota a gota durante 1 hora y 30 minutos, una solución de cloruro de hidrógeno (4 M en dioxano, 3,15 l, 12,4 mol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El producto del epígrafe se recogió mediante filtración en forma de un sólido de color blanco (488,0 g, 81%). RMN-<sup>1</sup>H (d<sub>6</sub>-DMSO) δ 11,71 (s, 2H), 10,94 (s, 1H), 7,44 (d, J= 8,8 Hz, 2H), 6,95 (d, J= 8,8 Hz, 2H), 4,22 (s, 2H), 3,75 (s, 3H).

## Preparación 4

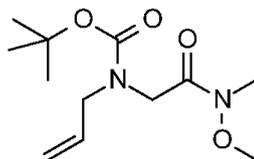
## Acido 2-(alil(terc-butoxicarbonil)amino)acético



15 A un matraz de fondo redondo conteniendo carbonato potásico (100 g, 724 mmol), yoduro sódico (110 g, 727 mmol), dimetilformamida (300 ml), trietilamina (200 ml, 1,44 mol) y 2-propen-1-amina (24 g, 426 mmol) a 0°C, se agregó en forma de gotas una solución de 2-bromoacetato de etilo (60,2 g, 360 mmol) en dimetilformamida (40 ml). La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 14 horas. Los sólidos se separaron mediante filtración y se lavaron con éter dietílico. Se agregó una solución de cloruro sódico acuosa saturada (1 l) al filtrado y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con éter dietílico. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y el disolvente se eliminó mediante presión reducida, proporcionando un residuo. A una solución a 0°C del residuo bruto en etanol (500 ml) y trietilamina (40 g, 395 mmol), se agregó di-t-butildicarbonato (105 g, 467 mmol) en una sola porción. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 14 horas. La reacción se concentró bajo presión reducida y se diluyó con agua (200 ml) y bicarbonato sódico acuoso saturado (200 ml) y se extrajo con éter dietílico. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron, y se concentraron bajo presión reducida, proporcionando un residuo. Este residuo se recogió en metanol (200 ml) y se agregó hidróxido sódico 2 N (500 ml). La solución resultante se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. El volumen se redujo a aproximadamente 200 ml bajo presión reducida y la solución resultante se acidificó a pH 4 usando ácido clorhídrico (12 N). El sólido de color naranja pálido resultante se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó, proporcionando el compuesto del epígrafe (50 g, 65%). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) mezcla de dos rotámeros (50:50) δ 1,43, 1,45 (s, 9H), 3,86-3,89 (m, 4H), 5,10-5,20 (m, 2H), 5,71-5,83 (m, 1H).

## Preparación 5

## N-alil-N-[2-(metoxi(metil)amino)-2-oxo-etil]carbamato de terc-butilo

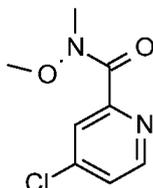


35 Se agregó ácido 2-(alil(terc-butoxicarbonil)amino)acético (49,6 g, 156 mmol) a tetrahydrofurano (600 ml) a 0°C, seguido de la adición de trietilamina (36,3 g, 359 mmol) y cloruro de pivaloilo (31 g, 353 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y, a continuación, se enfrió a 0°C. A continuación, se agregaron hidrocloruro de N,O-dimetilhidroxilamina (28 g, 283 mmol), trietilamina (33 ml, 237 mmol) y tetrahydrofurano (400 ml). El baño de hielo se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se concentró bajo presión reducida. El sólido resultante se disolvió en agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y el disolvente se eliminó mediante presión reducida, proporcionando un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice, eluyéndose con un gradiente de 0-50% de acetona en hexanos, proporcionando el compuesto del epígrafe (32 g, 54%). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) mezcla de

dos rotámetros (60:40)  $\delta$  1,42, 1,44 (s, 9H), 3,16, 3,17 (s, 3H), 3,66, 3,69 (s, 3H), 3,88-3,98 (m, 2H), 4,01-4,11 (s, 2H), 5,10-5,18 (m, 2H), 5,73-5,85 (m, 1H).

## Preparación 6

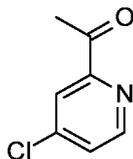
## 4-cloro-N-metoxi-N-metil-piridino-2-carboxamida



5 Se suspendió ácido 4-cloropiridino-2-carboxílico (40,9 g, 259,59 mmol) en diclorometano anhidro (700 ml) con agitación y con exclusión de humedad (se usó tubo de secado de gel de sílice). La solución resultante se enfrió a 0°C y se agregaron N-metilmorfolina (129 ml, 1,17 mol), hidrocloreto de N,O-dimetilhidroxilamina (35,45 g, 363,43 mmol), seguido de adición en porciones de hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (69,67 g, 363,43 mmol). Después de completada esta adición, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó a dicha temperatura durante una noche. Se agregó agua (600 ml) y las capas se separaron. La capa acuosa se volvió a extraer dos veces con diclorometano (300 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (400 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se eliminó bajo presión reducida, proporcionando un aceite de color oscuro. Este se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice, usando un gradiente de acetato de etilo de 0 a 50% en iso-hexano, proporcionando el compuesto del epígrafe (23,7 g, 46%). ES/MS (m/e) 201/203.

## Preparación 7

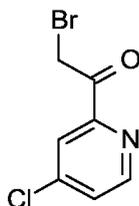
## 1-(4-cloropiridin-2-il)etanona



20 Se agregó bromuro de metil magnesio (3 M en éter dietílico) (59 ml, 177,20 mmol) a tetrahidrofurano anhidro (150 ml) con agitación bajo nitrógeno. La solución resultante se enfrió a -15°C y se agregó una solución de 4-cloro-N-metoxi-N-metil-piridino-2-carboxamida (123,7 g, 118,13 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (150 ml) en forma de gotas durante 20 minutos, manteniendo la temperatura entre 0 y -15°C. Después de completada esta adición, la reacción se agitó a 0°C durante 45 minutos. A continuación, la reacción se enfrió a -15°C y se interrumpió lentamente mediante adición cuidadosa en forma de gotas de agua (250 ml). Se agregaron solución de cloruro amónico acuoso saturado (250 ml) y éter dietílico (200 ml). Las capas se separaron y la capa acuosa se volvió a extraer dos veces con éter dietílico (200 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y el disolvente se eliminó bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un aceite de color amarillo (18,6 g). ES/MS 156/158 (M+1).

## Preparación 8

## 2-bromo-1-(4-cloro-2-piridil)etanona

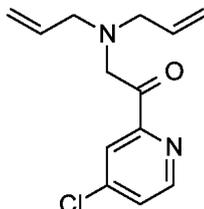


35 Se disolvió 1-(4-cloropiridin-2-il)etanona (24,4 g, 156,83 mmol) en ácido acético glacial (224 ml) con agitación. Se agregó una solución de bromuro de hidrógeno (32% en ácido acético) (34 ml), seguido de adición lenta de bromo (8,2 ml, 159,97 mmol). La solución resultante se calentó a 75°C durante 3,5 horas y, a continuación, se enfrió inmediatamente en un baño de hielo. Se agregó lentamente bicarbonato sódico acuoso saturado (1 l) a la mezcla de reacción enfriada con agitación, seguido de bicarbonato sódico sólido para justar el pH de la solución a 7. A continuación, se agregó acetato de etilo (400 ml) y las capas se separaron. La capa acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (3x400 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida, proporcionando un sólido cristalino de color pardo. El sólido aislado se trituró

con iso-hexano y se secó adicionalmente bajo vacío, proporcionando el compuesto del epígrafe (21 g). El producto remanente en el iso-hexano se recuperó mediante cromatografía de columna de gel de sílice usando un gradiente de 0 a 40% de diclorometano en iso-hexano, proporcionando 5,5 g adicionales del producto del epígrafe, lo cual proporcionó un rendimiento combinado (26,5 g, 72%). ES/MS (m/e) 234/236/238 (M+1).

## 5 Preparación 9

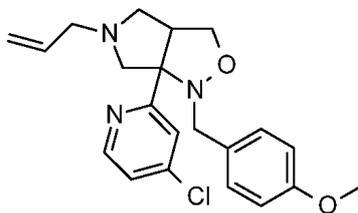
1-(4-cloro-2-piridil)-2-(dialilamino)etanona



Se disolvió N-alilprop-2-en-1-amina (15,8 g, 158,2 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (283 ml) bajo nitrógeno con agitación. Se agregó trietilamina (79 ml) y la solución resultante se enfrió a 0°C. Se agregó una solución de 2-bromo-1-(4-cloro-2-piridil)etanona (26,5 g, 113,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (126 ml) en forma de gotas (durante esta adición el color de la reacción cambió desde incoloro hasta amarillo, a naranja y, a continuación, finalmente a rojo). Después de 1,5 horas, se agregó agua (500 ml) y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. La solución acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo (5x250 ml). A los extractos orgánicos combinados se agregó sulfato sódico anhidro. La suspensión resultante se filtró a través de un lecho fino de gel de sílice y tierra de diatomeas. El lecho se lavó con acetato de etilo (1 l). A continuación, el filtrado se concentró bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del epígrafe (23,6 g). ES/MS (m/e) 252/253 (M+1). Este compuesto intermedio tiene estabilidad limitada, no se almacenó, y se usó directamente sin purificación adicional.

## Preparación 10

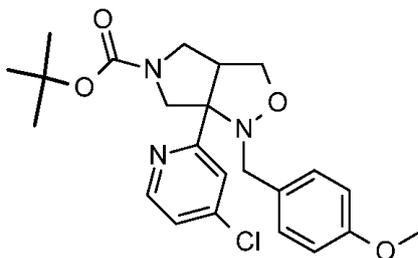
5-alil-6a-(4-cloro-2-piridil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrol[3,4-c]isoxazol



Se disolvió 1-(4-cloro-2-piridil)-2-(dialilamino)etanona (23,6 g, 94,4 mmol) en tolueno anhidro (343 ml) con agitación bajo nitrógeno. Se agregaron secuencialmente hidrócloruro de N-[(4-metoxifenil)metil]hidroxilamina (27,9 g, 146,9 mmol), trietilamina (23,6 ml, 169,5 mmol) y etóxido de titanio(IV) (35,4 ml, 38,7 g, 169,5 mmol). La mezcla de reacción resultante se calentó a 70°C bajo nitrógeno. Después de 8 horas la mezcla de reacción se enfrió y se agitó a temperatura ambiente durante un fin de semana. A continuación, se agregaron éter dietílico (1 l) y agua (500 ml). El sólido precipitado se separó por filtración a través de un lecho de tierra de diatomeas. El lecho se lavó intensamente con éter dietílico (500 ml). Las fases se separaron y la fase acuosa se volvió a extraer con éter dietílico (300 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se filtraron, proporcionando un aceite de color pardo. Este se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice usando un gradiente de 0 a 20% de tetrahidrofurano en cloroformo, proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un aceite de color pardo pálido (17,5 g, 40%). ES/MS (m/e) 386/388.

## Preparación 11

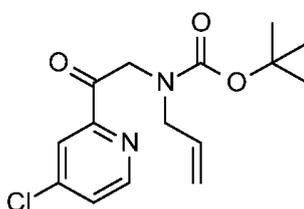
6a-(4-cloro-2-piridil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *tert*-butilo



Se disolvió 5-alil-6a-(4-cloro-2-piridil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrol[3,4-c]isoxazol (17,5 g, 45,35 mmol) en diclorometano anhidro (230 ml) con agitación bajo nitrógeno. Se agregaron ácido N,N-dimetilbarbitúrico (38,24 g, 244,89 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (5,24 g, 4,53 mmol) bajo una corriente de nitrógeno y se borboteó nitrógeno a través de la solución durante varios minutos. A continuación, la solución resultante se calentó a 30°C bajo nitrógeno durante 2 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se agregaron di-*t*-butildicarbonato (10,10 g, 46,26 mmol) y trietilamina (7 ml, 52,15 mmol) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida, proporcionando un semi-sólido de color ambarino, el cual, a continuación, se volvió a disolver en acetato de etilo (500 ml). La solución resultante se lavó con solución de bicarbonato sódico acuoso saturado (2x250 ml). La fase orgánica se secó bajo sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida, proporcionando un aceite de color oscuro. El aceite se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice usando un gradiente de 0 a 70% de acetato de etilo en iso-hexano, proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de una espuma de color amarillo (14,8 g, 73%). ES/MS (m/e) 446 (M+1).

## Preparación 12

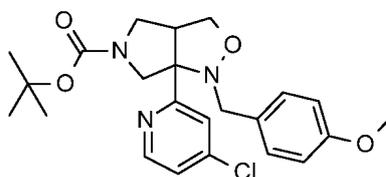
15 N-alil-N-[2-(4-cloro-2-piridil)-2-oxo-etil]carbamato de *terc*-butilo



A una solución agitada de tetrahidrofurano (60 ml) bajo nitrógeno a -10°C (baño de hielo-metanol) se agregó solución de complejo de cloruro de isopropilmagnesio-cloruro de litio (56,84 ml, 73,89 mmol), 1,3 M en tetrahidrofurano). Se agregó una solución de 2-bromo-4-cloropiridina (9,48 g, 49,28 mmol) en tetrahidrofurano (60 ml) en forma de gotas asegurándose que la temperatura no subía por encima de los 0°C durante la adición. Después de 40 minutos, la solución tiene un color naranja claro transparente y se agregó N-alil-N-[2-(metoxi(metil)amino)-2-oxo-etil]carbamato de *terc*-butilo (19,09 g, 73,89 mmol) en tetrahidrofurano (27 ml) asegurándose, nuevamente, que la temperatura no subía por encima de los 0°C. A continuación, después de completarse la adición, la solución de color pardo resultante se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la reacción se interrumpió mediante la adición de solución de cloruro amónico acuoso saturado, seguido de un pequeño volumen de agua. Se agregó acetato de etilo y las capas se separaron. La capa acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (4x). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron, proporcionando un aceite de color pardo. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice, usando un gradiente de 0 a 30% de acetato de etilo en iso-hexano, proporcionando el producto del epígrafe en forma de un aceite de color amarillo pálido transparente (10,1 g, 66%). ES/MS (m/e) 333 (M+23).

## Preparación 13

6a-(4-cloro-2-piridil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo



A una solución agitada de N-alil-N-[2-(4-cloro-2-piridil)-2-oxo-etil]carbamato de *terc*-butilo (10,10 g, 32,50 mmol) en tolueno (230 ml) bajo nitrógeno, se agregó hidrocloreto de N-[(4-metoxifenil)metil]hidroxilamina (6,47 g, 34,12 mmol), trietilamina (4,76 ml, 34,12 mmol) y etóxido de titanio(IV) (14,27 ml, 68,25 mmol). La solución resultante se calentó a 70°C bajo nitrógeno. Después de 3,5 horas la solución se enfrió a temperatura ambiente. Se agregaron agua y acetato de etilo y la suspensión resultante se filtró a través de tierra de diatomeas. El lecho de tierra e diatomeas se lavó bien con acetato de etilo. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró, proporcionando un aceite de color naranja. El aceite se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice, usando un gradiente de 0 a 25% de acetato de etilo en iso-hexano, proporcionando el compuesto del epígrafe (11,72 g, 81%) en forma de un aceite de color amarillo transparente. ES/MS (m/e) 446 (M+1).

## Preparación 14

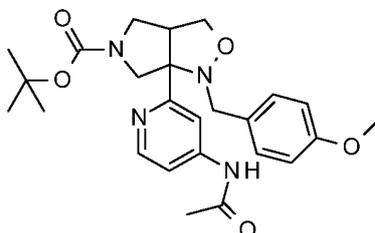
45 6a-(4-amino-2-piridil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo



Se agregaron conjuntamente en tolueno (121 ml) 6a-(4-cloro-2-piridil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo (9,4 g, 21,1 mmol), JohnPhos (2,0 g, 6,3 mmol), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (3,0 g, 3,2 mmol), benzofenona imina (7,4 ml, 42,3 mmol) y *t*-butóxido sódico (6,1 g, 63,4 mmol). La mezcla resultante se desgasificó intensamente mediante congelación con nitrógeno líquido bajo una atmósfera de gas nitrógeno y posteriormente fusión bajo vacío en un baño de agua a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió 4 veces. A continuación, la reacción se calentó a 75°C con agitación bajo nitrógeno durante 1,5 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo. La suspensión resultante se filtró a través de un lecho de diatomeas y el lecho se lavó con acetato de etilo. Los disolventes se evaporaron, proporcionando la imina intermedia. Esta se volvió a disolver en metanol (235 ml) y se agregaron acetato sódico (7,0 g, 84,6 mmol) e hidrocloreuro de hidroxilamina (5,9 g, 84,6 mmol). A continuación, la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La reacción se interrumpió con bicarbonato sódico acuoso y el metanol se eliminó bajo presión reducida. A continuación, la capa acuosa remanente se extrajo con acetato de etilo (2x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida, proporcionando un aceite de color naranja. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice, usando un gradiente de 0 a 10% de solución de amoníaco 2 M en metanol en diclorometano, proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de una goma de color pardo y fracciones conteniendo el producto mezclado. Las fracciones mezcladas se combinaron y purificaron adicionalmente en dos lotes usando cromatografía de columna de gel de sílice usando un gradiente de 0 a 5% de solución de amoníaco 2 M en metanol en diclorometano para proporcionar compuesto adicional, proporcionando un rendimiento combinado del producto del epígrafe (6,72 g, 75%) en forma de un sólido de color pardo claro. ES/MS (m/e) 427 (M+1).

#### Preparación 15

6a-(4-acetamido-2-piridil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo



Se introdujo 6a-(4-amino-2-piridil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo (3,06 g, 7,17 mmol) en un matraz de 250 ml y se agregó acetato de etilo (16 ml) con agitación bajo nitrógeno. A la suspensión resultante se agregó anhídrido cíclico de ácido 1-propanofosfónico (≥50% en peso en acetato de etilo) (11 ml, 17,92 mmol), trietilamina (3,50 ml, 25,09 mmol) y ácido acético (616 µl, 10,75 mmol). La solución resultante se calentó a 75°C bajo nitrógeno. Después de 1 hora, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se agregaron acetato de etilo y solución de bicarbonato sódico acuoso saturado. Las capas se separaron y la fase acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (2x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron, proporcionando el producto del epígrafe en forma de una espuma de color ambarino (3,11 g, 92%). ES/MS (m/e) 469 (M+1).

#### Preparación 16

N-[2-(1,3,3a,4,5,6-hexahidropirrol[3,4-c]isoxazol-6a-il)-4-piridil]acetamida



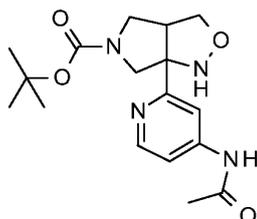
Se recogió 6a-(4-acetamido-2-piridil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-3,3a,4,6-tetrahidropirrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo (3,11 g, 6,64 mmol) en ácido trifluoroacético (10 ml) con agitación y la solución resultante se calentó a

50°C. Después de 1,5 horas la reacción se enfrió y se concentró bajo presión reducida. El aceite de color oscuro resultante se volvió a disolver en solución de diclorometano/metanol y se cargó sobre dos columnas de intercambio de iones (25 g). El material se eluyó con metanol y, a continuación, con solución 2 M de amoníaco en metanol. La fracción básica se concentró bajo presión reducida, proporcionando un aceite de color pardo fuerte (1,71 g, 88%).

5 ES/MS (m/e) 248 (M+1).

#### Preparación 17

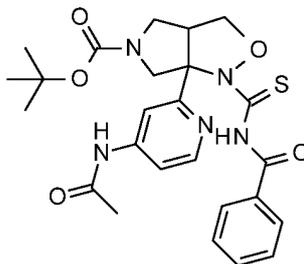
6a-(4-acetamido-2-piridil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrololo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo



10 Se disolvió N-[2-(1,3,3a,4,5,6-hexahidropirrololo[3,4-c]isoxazol-6a-il)-4-piridil]acetamida (1,71 g, 5,85 mmol) en diclorometano (anhidro) (13 ml) con agitación y se agregó di-*t*-butildicarbonato (1,28 g, 5,86 mmol), seguido de trietilamina (810 µl, 5,81 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y 45 minutos. La reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se evaporó bajo presión reducida, proporcionando el producto del epígrafe en forma de una espuma de color amarillo pálido (2,05 g, cuantitativo). ES/MS (m/e) 349 (M+1).

#### 15 Preparación 18

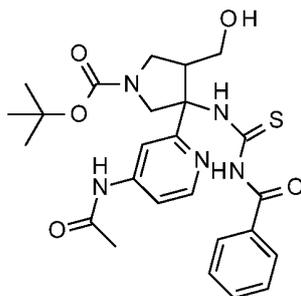
6a-(4-acetamido-2-piridil)-1-(benzoilcarbamoil)-3,3a,4,6-tetrahidropirrololo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo



20 Se recogió 6a-(4-acetamido-2-piridil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrololo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo (2,05 g, 5,88 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (15,0 ml) con agitación bajo nitrógeno. Se agregó isotiocianato de benzoilo (900 µl, 6,54 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de 2 horas, la reacción se concentró bajo presión reducida, proporcionando un aceite de color amarillo pálido. El aceite se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice, usando un gradiente de 20 a 100% de acetato de etilo en ciclohexano, proporcionando el producto del epígrafe en forma de una espuma de color crema (2,14 g, 66%). ES/MS (m/e) 512 (M+1).

#### 25 Preparación 19

3-(4-acetamido-2-piridil)-3-(benzoilcarbamoilamino)-4-(hidroximetil)pirrolidino-1-carboxilato de *terc*-butilo



30 Se disolvió 6a-(4-acetamido-2-piridil)-1-(benzoilcarbamoil)-3,3a,4,6-tetrahidropirrololo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo (2,14 g, 3,86 mmol) en etanol (40 ml) y se introdujo en una botella de hidrogenación Parr grande. Se agregó hidróxido de paladio (20% en peso sobre carbón, 877 mg) bajo una atmósfera de nitrógeno y, a continuación, se depositó sobre un aparato de hidrogenación Parr y se hidrogenó a 345 kPa durante 24 horas. La suspensión de

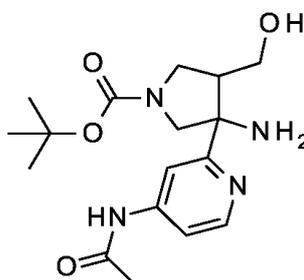
reacción se diluyó con etanol y se filtró a través de tierra de diatomeas. El lecho se lavó con acetato de etilo. Los filtrados combinados se concentraron bajo presión reducida, proporcionando el producto del epígrafe (2,03 g, 96%), el cual se usó sin purificación adicional. ES/MS (m/e) 514 (M+1).

## Preparación alternativa 19

- 5 Se disolvió 3-(4-acetamido-2-piridil)-3-amino-4-(hidroximetil)pirrolidino-1-carboxilato de *terc*-butilo (1,43 g, 4,08 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (27 ml). Se agregó isotiocianato de benzoilo (578,49  $\mu$ l, 4,20 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas bajo nitrógeno. A continuación, se eliminó el disolvente bajo presión reducida, proporcionando una espuma sólida de color amarillo. Este material se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice, usando un gradiente de 0 a 100% de acetato de etilo en ciclohexano, proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color blanco (2,1 g, cuantitativo). ES/MS (m/e) 514 (M+1).

## Preparación 20

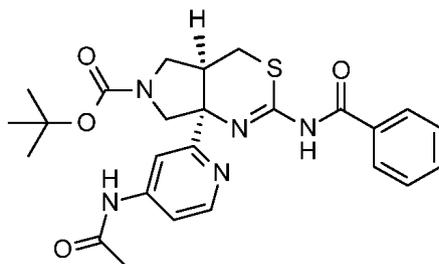
3-(4-acetamido-2-piridil)-3-amino-4-(hidroximetil)pirrolidino-1-carboxilato de *terc*-butilo



- 15 Se disolvió 6a-(4-acetamido-2-piridil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de *terc*-butilo (2,026 g, 5,82 mmol) en etanol (145 ml) con ultrasonidos. La solución resultante se cicló dos veces a través de un hidróxido de paladio (20% en peso soportado sobre cartucho mini de carbón) a 70°C a 3 ml/min sobre un hidrogenador de flujo que trabajaba a una presión de 8500 kPa y 100% de producción de hidrógeno. El etanol se eliminó bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de una espuma de color blanco (1,98 g) con baja proporción de impurezas presentes, el cual se usó sin purificación adicional. ES/MS (m/e) 351 (M+1).

## Preparación 21

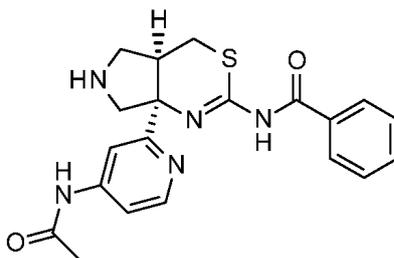
(*cis*)-7a-(4-acetamido-2-piridil)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazino-6-carboxilato de *terc*-butilo racémico



- 25 A una solución agitada de 3-(4-acetamido-2-piridil)-3-(benzoilcarbamoilamino)-4-(hidroximetil)pirrolidino-1-carboxilato de *terc*-butilo (5,16 g, 8,53 mmol) en tetrahidrofurano (80 ml), se agregó 1,1'-carbonildiimidazol (1,84 g, 11,35 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de 4 horas, se agregó 1,1'-carbonildiimidazol adicional (968,52 mg, 5,97 mmol) y la reacción se continuó a temperatura ambiente. Después de 3,5 horas adicionales, se había formado completamente el aducto de imidazol intermedio, ES/MS 608 (M+1). A continuación, la reacción se calentó a 75°C, la humedad se excluyó usando un tubo de secado de gel de sílice, y la mezcla se agitó durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo. La solución resultante se lavó con agua, se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida, proporcionando un aceite de color amarillo. El residuo se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice, usando un gradiente de 0 a 100% de acetato de etilo en iso-hexano, proporcionando el compuesto del epígrafe (3,31 g, 78%) en forma de un sólido de color amarillo claro. ES/MS (m/e) 496 (M+1).

## Preparación 22

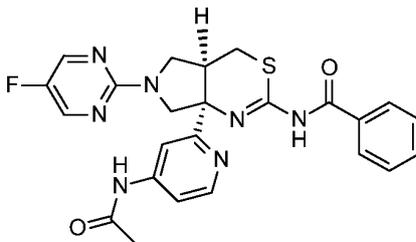
(*cis*)-N-[7a-(4-acetamido-2-piridil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida racémica



5 Se suspendió (cis)-7a-(4-acetamido-2-piridil)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazino-6-carboxilato de *tert*-butilo racémico (3,31 g, 6,67 mmol) en diclorometano (19 ml) con agitación. Se agregó ácido trifluoroacético (9,5 ml) para obtener una solución transparente. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo resultante se volvió a disolver en metanol y esta solución se cargó sobre una columna de intercambio de iones (50 g). La columna se eluyó con metanol (3 volúmenes de columna) y, a continuación, con solución 2 M de amoníaco en metanol (3 volúmenes de columna). Los lavados básicos se combinaron y concentraron bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del epígrafe (2,90 g, cuantitativo), en forma de un sólido de color amarillo. ES/MS (m/e) 396 (M+1).

#### 10 Preparación 23

(cis)-N-[7a-(4-acetamido-2-piridil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida racémica

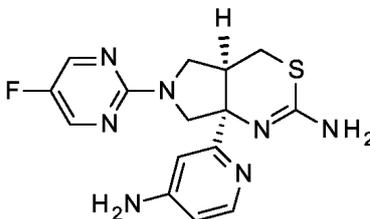


15 A una solución agitada de (cis)-N-[7a-(4-acetamido-2-piridil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida racémica (2,90 g, 6,61 mmol) en 1,4 dioxano (100 ml) se agregó 5-fluoro-2-cloropirimidina (3,15 ml, 33,03 mmol) y diisopropiletilamina (5,8 ml, 33,03 mmol). La solución resultante se agitó a 100°C durante 18 horas con exclusión de la humedad. El disolvente se eliminó bajo presión reducida, proporcionando un aceite de color pardo. El residuo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice, usando un gradiente de 0 a 100% de acetato de etilo en iso-hexano, proporcionando el compuesto del epígrafe (2,60 g, 80%) en forma de un sólido de color amarillo. ES/MS (m/e) 492 (M+1).

20

#### Preparación 24

(cis)-7a-(4-amino-2-piridil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina racémica

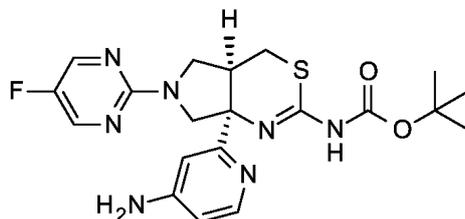


25 A una solución de (cis)-N-[7a-(4-acetamido-2-piridil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4a,5,6,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida racémica (2,6 g, 5,3 mmol) en metanol (100 ml), se agregó hidróxido de litio (1,3 g, 52,8 mmol). La reacción se calentó a 70°C durante 8 horas y, a continuación, a temperatura ambiente durante el resto de la noche. Durante este tiempo se precipitó un sólido de color blanco y se recogió mediante filtración. El sólido filtrado se lavó con una pequeña cantidad de metanol y se secó, proporcionando el compuesto del epígrafe (1,1 g, 59%). ES/MS 346 (M+1). El producto remanente en el filtrado se recuperó usando cromatografía de intercambio de iones.

30 El filtrado de metanol se cargó directamente sobre la columna de intercambio de iones (50 g) y se eluyó con metanol (3 volúmenes de columna), seguido de solución 2 M de amoníaco en metanol (3 volúmenes de columna). El eluyente básico se concentró bajo presión reducida, proporcionando 700 mg adicionales del compuesto del epígrafe de 70% de pureza. ES/MS 346 (M+1).

#### Preparación 25

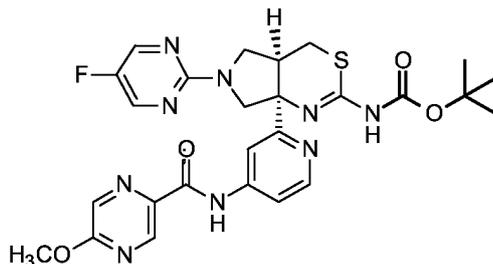
(cis)-N-[7a-(4-amino-2-piridil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo racémico



5 A una suspensión agitada de (cis)-7a-(4-amino-2-piridil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d]-[1,3]tiazin-2-amina racémica (1,08 g, 3,12 mmol) en dimetilformamida (17 ml), se agregó di-*t*-butildicarbonato (1,16 g, 5,30 mmol) en diclorometano (9 ml). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante un fin de semana. La mezcla de reacción se repartió entre diclorometano y solución de salmuera. La fase orgánica se separó y se lavó con más solución de salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida, proporcionando un aceite de color amarillo. El residuo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice, usando un gradiente de 0 a 5% de solución 2 M de amoníaco en metanol en diclorometano, proporcionando el compuesto del epígrafe (racemato, 1,60 g con 20% de dimetilformamida/diclorometano residual) en forma de una goma clara, la cual se usó directamente sin purificación adicional. ES/MS (m/e) 446 (M+1).

#### Preparación 26

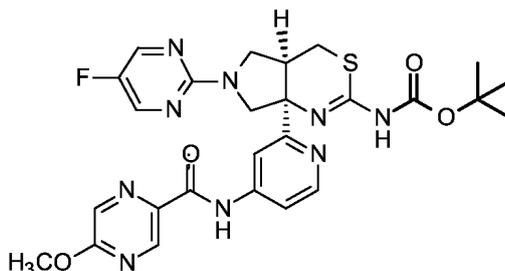
15 (cis)-N-[(4aR,7aR)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-7a-[4-[(5-metoxipirazino-2-carbonil)amino]-2-piridil]-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo racémico



20 Se disolvió (cis)-N-[7a-(4-amino-2-piridil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo racémico (1,01 g, 2,27 mmol) en acetato de etilo (8 ml) con agitación. A continuación, se agregaron anhídrido cíclico de ácido 1-propanofosfónico (≥50% en peso en solución de acetato de etilo) (2,31 ml, 3,63 mmol), trietilamina (948 μl, 6,80 mmol) y ácido 5-metoxipirazino-2-carboxílico (454 mg, 2,95 mmol). La solución resultante se calentó a 80°C bajo nitrógeno durante 1 hora y 20 minutos y, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y solución de bicarbonato sódico acuoso saturado y las capas se separaron. La capa acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida, proporcionando un sólido de color pardo. El residuo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice, usando un gradiente de 0 a 75% de acetato de etilo en iso-hexano, proporcionando el compuesto del epígrafe (576 mg, 44%). ES/MS (m/e) 582 (M+1).

#### Preparación 27

N-[(4aR,7aR)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-7a-[4-[(5-metoxipirazino-2-carbonil)amino]-2-piridil]-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo

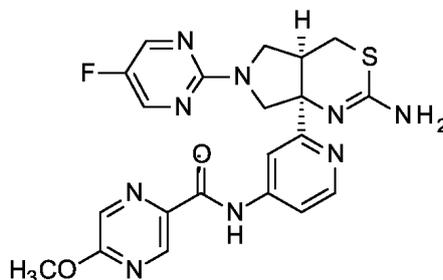


30 Se separó (cis)-N-[(4aR,7aR)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-7a-[4-[(5-metoxipirazino-2-carbonil)amino]-2-piridil]-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo racémico (576 mg, 0,99 mmol) en sus constituyentes racémicos mediante SFC quiral (Columna: OJ-H, 25 cm x 21,2 mm, 5 micrómetros); Fase móvil: 24% de metanol

(0,1% de amoníaco), 76% de CO<sub>2</sub>; Flujo: 70 ml/min a UV 220 nm; 35°C; 12 mg por inyección). El segundo isómero que eluyó (isómero 2) es el compuesto del epígrafe (207 mg, 36%). ES/MS (m/e) 582 (M+1).

### Ejemplo 1

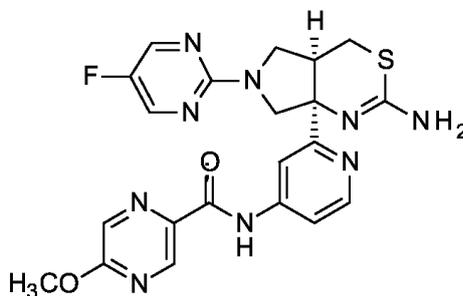
5 (cis)-N-[2-[(4aR,7aR)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-piridil]-5-metoxipirazino-2-carboxamida racémica



10 A una solución de (cis)-N-[6-(5-fluoropirimidin-2-il)-7a-[4-[(5-metoxipirazino-2-carbonil)amino]-2-piridil]-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo racémico (487 mg, 837,30 μmol) en diclorometano (14 ml) se agregó ácido trifluoroacético (1,7 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La reacción se diluyó con diclorometano y se lavó bicarbonato sódico acuoso saturado. Las capas se separaron y la capa acuosa se volvió a extraer con diclorometano. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida, proporcionando un sólido de color blanco. El sólido se purificó mediante cromatografía de gel de sílice, usando un gradiente de 0 a 5% de solución 2 M de amoníaco en metanol en diclorometano, proporcionando el compuesto del epígrafe (126 mg, 31%). ES/MS (m/e) 482 (M+1).

### 15 Ejemplo 2

N-[2-[(4aR,7aR)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-piridil]-5-metoxipirazino-2-carboxamida



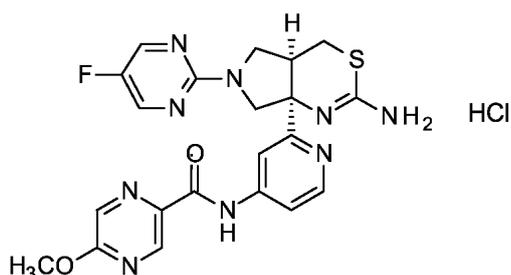
20 A una solución de N-[(4aR,7aR)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-7a-[4-[(5-metoxipirazino-2-carbonil)amino]-2-piridil]-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]carbamato de *tert*-butilo (isómero 2, 207 mg, 355,90 μmol) en diclorometano (6 ml) se agregó ácido trifluoroacético (712 μl, 9,41 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. A continuación, la reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con solución de bicarbonato sódico acuoso saturado. Las capas se separaron y la capa acuosa se volvió a extraer con diclorometano. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida, proporcionando un sólido de color blanco, el cual se secó en estufa de vacío a 35°C durante 5 horas, proporcionando el compuesto del epígrafe (186 mg, cuantitativo). ES/MS (m/e) 482 (M+1).

Preparación alternativa de N-[2-[(4aR,7aR)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-piridil]-5-metoxipirazino-2-carboxamida

30 Se separó (cis)-N-[2-[(4aR,7aR)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-piridil]-5-metoxipirazino-2-carboxamida racémica (126 mg, 0,262 mmol) en sus enantiómeros constituyentes mediante HPLC quiral (Columna: AD-H, 25 cm x 21,2 mm, 5 micrómetros); Fase móvil: relación 1:4 de acetonitrilo a metanol (solución 20 mM de amoníaco en metanol); Flujo: 30 ml/min detección a UV de longitud de onda variable; 8 mg por inyección). El segundo isómero que eluyó es el compuesto del epígrafe (92 mg, 73%). ES/MS (m/e) 482 (M+1).

### Ejemplo 3

35 Hidrocloruro de (cis)-N-[2-[(4aR,7aR)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-piridil]-5-metoxipirazino-2-carboxamida racémico



Se disolvió (cis)-N-[2-[2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-piridil]-5-metoxipirazino-2-carboxamida racémica (56 mg, 0,116 mmol) en acetonitrilo (0,35 ml), seguido de la adición de solución 0,1 M de cloruro de hidrógeno acuoso (1,1 ml). La solución resultante se dispuso sobre un criodeseacador durante una noche, proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color blanco (61 mg, 51%). ES/MS (m/e) 482 (M+1).

#### Procedimientos de ensayo *in vitro*

Para los ensayos enzimático y celular *in vitro*, los compuestos de ensayo se prepararon en DMSO para obtener una solución madre 10 mM. La solución madre se diluyó seriadamente en DMSO para obtener una curva de dilución de diez puntos con concentraciones de compuesto finales que oscilaron desde 10  $\mu$ M hasta 0,05 nM en una placa de fondo redondo de 96 pocillos, antes de llevar a cabo los ensayos enzimático y de célula entera *in vitro*.

#### Ensayos de inhibición de proteasa *in vitro*

Se clonó BACE1 humana (número de acceso: AF 190725) procedente de ADNc de cerebro total mediante RT-PCR. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos #1 a 460 se insertaron dentro del polipéptido IgG<sub>1</sub> humano (Fc) que codifica el ADNc (Vassar y otros, Science, vol. 286, págs. 735-742, (1999)). Esta proteína de fusión de BACE1 (1-460) y el Fc humano, denominado *huBACE1:Fc*, se construyó dentro del vector pJB02. La BACE1(1-460:Fc humana (*huBACE1:Fc*) se expresó transitoriamente en células HEK293. 250  $\mu$ g de ADNc de cada constructo se mezclaron con Eugene 6 y se agregaron a 1 litro de células HEK293. Cuatro días después de la transfección, se recolectaron medios acondicionados para purificación. La *huBACE1:Fc* se purificó mediante cromatografía de Proteína A. La enzima se almacenó a -80°C en pequeñas partes alícuotas. (Véase, Yang y otros, J. Neurochemistry, vol. 91, (nº. 6), págs. 1249-59, (2004)).

#### Ensayo BACE1 FRET

Se prepararon diluciones en serie de los compuestos de ensayo tal como se ha descrito anteriormente. Los compuestos se diluyeron adicionalmente 20x en tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se agregaron 10  $\mu$ l de cada dilución a cada pocillo de las filas A a H de una placa negra de unión de proteína baja correspondiente, conteniendo la mezcla de reacción (25  $\mu$ l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM, pH 4,6, TRITON X-100 1mM, 1mg/ml de albúmina de suero bovino y 15  $\mu$ M de sustrato FRET) (Véase, Yang y otros, J. Neurochemistry, vol. 91, (nº. 6), págs. 1249-59, (2004)). El contenido se mezcló bien sobre un sacudidor de placas durante 10 minutos. Se agregaron 15  $\mu$ l de BACE1(1-460):Fc 200 pM (Véase, Vasser y otros, Science, vol. 286, págs. 735-741, (1999)) en tampón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a la placa que contenía el sustrato y los compuestos de ensayo para iniciar la reacción. Se registró la RFU de la mezcla en el tiempo 0 a la longitud de onda de excitación de 355 nm y la longitud de onda de emisión a 460 nm, después de un breve mezclado sobre un sacudidor de placa. La placa de reacción se recubrió con película de aluminio y se mantuvo en una estufa humidificada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 a 24 horas. Al final de la incubación se registró la RFU con la misma excitación y emisión establecidas usadas en el tiempo 0. La diferencia de la RFU en el tiempo 0 y al final de la incubación es representativa de la actividad de BACE1 bajo el compuesto de tratamiento. Las diferencias de RFU se representaron frente a la concentración del inhibidor y se ajustó una curva con una ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores IC<sub>50</sub>. (Véase Sinha y otros, Nature, vol. 402, págs. 537-540, (2000) y May y otros, Journal of Neuroscience, vol. 31, págs. 16507-16516, (2011)).

El compuesto del Ejemplo 2 se ensayó esencialmente tal como se ha descrito anteriormente y mostró una IC<sub>50</sub> para BACE1 de 0,90 nM ( $\pm$ 0,36, n=10) Media  $\pm$  SEM.

Estos datos demuestran que el compuesto del Ejemplo 2 inhibe la actividad de la enzima BACE1 recombinante purificada *in vitro*.

Ensayo de célula entera para medición de la inhibición del ensayo neuronal primario de PDAPP de la actividad beta-secretasa

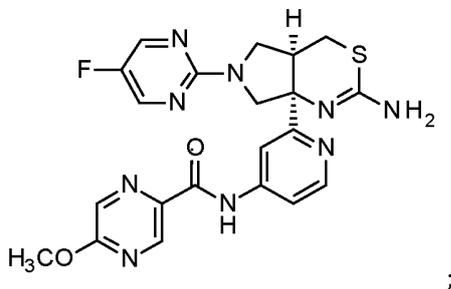
Igualmente, se llevó a cabo un ensayo de célula entera confirmatorio en cultivos neuronales primarios generados a partir de ratones embrionicos transgénicos PDAPP (descritos por Games y otros, en Nature, vol. 373, págs. 523-527, (1995) y May y otros, en Journal of Neuroscience, vol. 31, págs.16507-16516, (2011)). Se prepararon neuronas corticales primarias a partir de embriones PDAPP del Día 16 embrionario y se cultivaron en placas de 96 pocillos (15 x

10<sup>4</sup> células/pocillo en DMEM/F12 (1:1) mas FBS al 10%). Después de 2 días *in vitro*, el medio de cultivo se reemplazó con DMEM/F12 (1:1) libre de suero conteniendo suplemento B27 y 2 μM (final) de Ara-C (Sigma, C1768). Al día 5 *in vitro*, las neuronas se incubaron a 37°C durante 24 horas en la presencia/ausencia de inhibidores (diluidos en DMSO) a la concentración deseada. Al final de la incubación, los medios de acondicionamiento se analizaron para determinar la evidencia de actividad beta-secretasa, por ejemplo, mediante análisis de péptidos Abeta. Los péptidos Abeta totales (Abeta 1-x) se midieron mediante un sandwich ELISA, usando 266 monoclonal como un anticuerpo de captura y 3D6 biotinilada como anticuerpo informador. Como alternativa, se midieron los péptidos Abeta 1-40 y Abeta 1-42 mediante un sandwich ELISA, usando 2G3 monoclonal como un anticuerpo de captura para Abeta 1-40, y 21F12 monoclonal como un anticuerpo de captura para Abeta 1-42. En ambos ELISAs Abeta 1-40 y Abeta 1-42 se usó 3D6 biotinilada como el anticuerpo informador (para la descripción de anticuerpos, véase Johnson-Wood y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, págs1550-1555, (1997)). La concentración de Abeta liberada en los medios acondicionados después del tratamiento del compuesto se corresponde con la actividad de BACE1 bajo dichas condiciones. La curva de inhibición de 10 puntos se representó y ajustó con la ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores IC<sub>50</sub> para el efecto de reducción de Abeta. El compuesto del Ejemplo 2 se ensayó esencialmente tal como se ha descrito anteriormente, mostrando la actividad siguiente. IC<sub>50</sub> para reducción de Abeta<sub>1-40</sub> = 0,65 nM (± 0,11, n=3). IC<sub>50</sub> para reducción de Abeta<sub>1-42</sub> = 0,91 nM (± 0,16, n=3).

Estos datos demuestran que el compuesto del Ejemplo 2 inhibe la producción de Abeta<sub>1-40</sub> y de Abeta<sub>1-42</sub> en células enteras.

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto de fórmula:



o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

- 5
2. El compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es N-[2-[(4aR,7aR)-2-amino-6-(5-fluoropyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrrolo[3,4-d][1,3]-tiazin-7a-yl]-4-piridil]-5-metoxipirazino-2-carboxamida.
- 10
3. El compuesto de acuerdo bien con la reivindicación 1 o bien con la reivindicación 2, el cual es N-[2-[(4aR,7aR)-2-amino-6-(5-fluoropyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydropyrrolo[3,4-d][1,3]-tiazin-7a-yl]-4-piridil]-5-metoxipirazino-2-carboxamida.
4. Un compuesto o sal aceptable farmacéuticamente del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en terapia.
5. Un compuesto o sal aceptable farmacéuticamente del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 15
6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 con uno o más vehículos, diluyentes, o excipientes aceptables farmacéuticamente.