

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 326**

51 Int. Cl.:

**C07D 513/04** (2006.01)

**A61K 31/547** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2015 PCT/US2015/048788**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016 WO16043996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2015 E 15763800 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3194408**

54 Título: **Un derivado de tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazina como inhibidor de BACE**

30 Prioridad:

**15.09.2014 EP 14382347**

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

**28.11.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COATES, DAVID ANDREW y  
LOSADA, PABLO GARCIA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 733 326 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

Un derivado de tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazina como inhibidor de BACE

La presente invención se refiere a novedosos inhibidores BACE cristalinos, a composiciones farmacéuticas que comprenden los inhibidores BACE cristalinos, a inhibidores BACE cristalinos para usar en el tratamiento de trastornos fisiológicos, y a procesos útiles en la síntesis de los mismos.

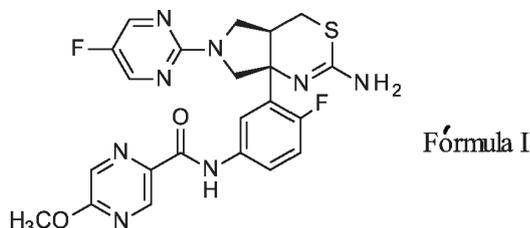
La presente invención está en el campo de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades y trastornos que implican el péptido  $\beta$  amiloide (Abeta), un segmento peptídico neurotóxico y muy agregador de la proteína precursora de amiloide (APP). La enfermedad de Alzheimer es un trastorno degenerativo devastador que afecta a millones de pacientes en todo el mundo. A la vista de los agentes actualmente homologados en el mercado que dan como resultado beneficios solo sintomáticos al paciente, existe una significativa necesidad sin cumplir en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

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

La patente de Estados Unidos n.º 8.158.620 desvela derivados de aminodihidrotiazina fusionados que poseen actividad inhibidora BACE y se divulga además como agentes terapéuticos útiles para una enfermedad neurodegenerativa producida por el péptido  $A\beta$ , tal como demencia de tipo Alzheimer. Además, J. Neuroscience, 31(46), páginas 16507-16516 (2011) desvela (S)-4-(2,4-difluoro-5-pirimidin-5-il-fenil)-4-metil-5,6-dihidro-4H-[1,3]tiazin-2-ilamina, un inhibidor de BACE activo en el SNC administrado por vía oral.

Se desean las formas cristalinas de los inhibidores BACE para proporcionar para facilitar la preparación de formulaciones farmacéuticas y para composiciones farmacéuticas con estabilidad mejorada.

En consecuencia, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:



que es cristalino.

La presente descripción proporciona también un procedimiento para tratar la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula I que es cristalino. La presente descripción también proporciona un procedimiento evitar la progresión del deterioro cognitivo leve debido a la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula I que es cristalino. La presente descripción también proporciona un procedimiento para inhibir BACE en un paciente, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula I que es cristalino. La presente descripción también proporciona un procedimiento inhibir la escisión mediada por BACE de la proteína precursora de amiloide, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula I que es cristalino. La descripción también proporciona un procedimiento para inhibir la producción del péptido Abeta, que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula I que es cristalino.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I que es cristalino para su uso en terapia, en particular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o para evitar la progresión del deterioro cognitivo leve en la enfermedad de Alzheimer. Incluso además, la presente invención proporciona el uso del compuesto de Fórmula I que es cristalino, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o para la prevención de la progresión del deterioro cognitivo leve en la enfermedad de Alzheimer.

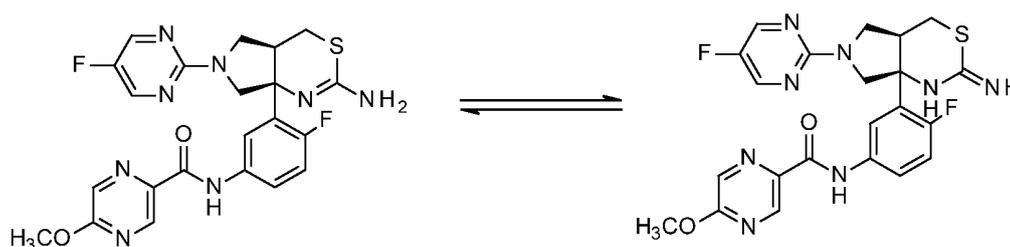
La invención también proporciona una composición farmacéutica, que comprende el compuesto de Fórmula I que es cristalino con uno o más transportadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables. Se describen intermedios y procesos para la síntesis del compuesto de Fórmula I que es cristalino.

- El deterioro cognitivo leve se ha definido como una fase prodrómica potencial de la demencia asociada con la enfermedad de Alzheimer basada en la presentación clínica y en la progresión de pacientes que presentan deterioro cognitivo leve en la demencia por Alzheimer en el tiempo. (Morris, y col., Arch. Neurol., 58, 397-405 (2001); Petersen, y col., Arch. Neurol., 56, 303-308 (1999)). La expresión "prevención de la progresión del deterioro cognitivo leve en la enfermedad de Alzheimer incluye retrasar, detener, o invertir la progresión del deterioro cognitivo leve en la enfermedad de Alzheimer en un paciente.
- Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "que trata" incluyen restringir, retrasar, detener, o invertir la progresión o la gravedad de un síntoma o trastorno existente.
- Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un ser humano.
- El término "inhibición de la producción de péptido Abeta" se entiende que significa disminuir los niveles *in vivo* de péptido Abeta en un paciente.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que, tras la administración de una dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.
- Puede determinarse fácilmente una cantidad eficaz por el especialista a cargo del tratamiento, como un experto en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad eficaz para un paciente, el especialista a cargo del tratamiento considera numerosos factores, incluyendo, aunque no de forma limitativa: la especie del paciente; su tamaño, edad, y salud general; la enfermedad específica o trastorno implicado; el grado de implicación o la gravedad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto concreto 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 pertinentes.
- Los compuestos de la presente invención son generalmente eficaces sobre un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones diarias normalmente se encuentran en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. En algunos casos pueden ser más que adecuados niveles de dosificación por debajo del límite inferior del anteriormente reseñado, aunque en otros casos se pueden emplear dosis aún más grandes con efectos secundarios aceptables, y por tanto, no se pretende que el intervalo de dosificación anterior limite el ámbito de la invención en cualquier manera.
- Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas mediante cualquier ruta que haga al compuesto biodisponible, incluyendo las vías oral, transdérmica y parenteral. Más preferentemente, dichas composiciones son para la administración oral o transdérmica, siendo especialmente preferida la administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procesos para preparar algunas son bien conocidas en la técnica. (Véanse, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21<sup>a</sup> Edición, Lippincott, Williams y Wilkins, 2006).
- Los compuestos cristalinos de Fórmula I son particularmente útiles en los procedimientos de tratamiento de la descripción pero se prefieren determinadas formas. Los siguientes párrafos describen dichas formas. se entenderá que estas preferencias son aplicables a los procedimientos de tratamiento y a los nuevos compuestos de la invención.
- La Forma cristalina 1 de N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil] -5 -metoxi-pirazina-2-carboxamida;
- La Forma cristalina 2 de N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil] -5 -metoxi-pirazina-2-carboxamida;
- La Forma cristalina 2 de N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida que se caracteriza por un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, en un ángulo de difracción 2-theta de 11,8°, junto con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 18,6°, 19,3°, y 26,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados;
- La Forma cristalina 3 de N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil] -5 -metoxi-pirazina-2-carboxamida; y
- La Forma cristalina 3 de N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil] -5 -metoxi-pirazina-2-carboxamida que se caracteriza por un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, a un ángulo de difracción 2-theta de 15,7° junto con uno o más de los picos seleccionados entre el grupo que consiste en 18,1°, 27,0°, y 19,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados, se prefieren.
- La Forma cristalina 2 de N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil] -5 -metoxi-pirazina-2-carboxamida, es particularmente preferida.

La Forma cristalina 2 de N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil] -5 -metoxi-pirazina-2-carboxamida, que se caracteriza por un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, en un ángulo de difracción 2-theta de 11,8°, junto con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 18,6°, 19,3°, y 26,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados, se prefiere especialmente.

una persona normalmente experta en la técnica apreciará que los compuestos de la invención pueden existir en formas tautómeras, como se representa gráficamente en el Esquema A. Cuando se proporciona cualquier referencia en la presente solicitud a uno de los tautómeros de los compuestos de la invención, se entiende que abarca ambas formas tautómeras y todas las mezclas de las mismas.

Esquema A



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

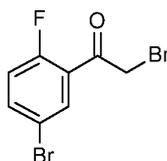
Algunos centros estereoquímicos se han dejado sin especificar y algunos sustituyentes se han eliminado de los esquemas finales por claridad y no se pretende que limiten de forma alguna las enseñanzas de los esquemas. Adicionalmente, el experto en la materia puede separar o resolver los isómeros, enantiómeros y diastereómeros individuales en cualquier punto conveniente de la síntesis de compuestos de la invención, por procedimientos tales como técnicas de cristalización selectivas o cromatografía quiral (véase por ejemplo, J. Jacques, y col., "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 se eluyen de la cromatografía quiral primera y segunda, respectivamente, y si la cromatografía quiral se inició en un momento anterior de la síntesis, se aplica la misma designación a los intermedios y ejemplos posteriores.

Algunas abreviaturas se definen del siguiente modo: "APP" se refiere a proteína del precursor amiloide; "LCR" se refiere a líquido cefalorraquídeo; "DCM" se refiere a diclorometano; "DIPEA" se refiere a diisopropiletamina o N-etil-N-isopropil-propan-2-amina; "DMEM" se refiere a medio Eagle modificado por Dulbecco; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "DMSO" (se refiere a dimetilsulfóxido); "EDCI" se refiere a clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; "ee" se refiere a exceso enantiomérico; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "Ej" se refiere a ejemplo; "F12" se refiere a medio F12 de Ham; "FBS" se refiere a suero fetal bovino; "FRET" se refiere a transferencia de energía de resonancia de fluorescencia; "HEK" se refiere a riñón embrionario humano; "HOAc" se refiere a ácido acético; "HOBt" se refiere a 1-hidroxilbenzotriazol hidrato; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; "Cl<sub>50</sub>" se refiere a la concentración de un agente que produce un 50% de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente; "min" se refiere a minuto o minutos; "MTBE" se refiere a metil *tert*-butil éter; "PDAPP" se refiere a proteína del precursor amiloide derivada de plaquetas; "Prep" se refiere a preparación; "URF" se refiere a unidades relativas de fluorescencia; "SCX" se refiere a intercambio de cationes fuertes; "T<sub>r</sub>" se refiere al tiempo de retención; y "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en las preparaciones y ejemplos siguientes. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las rutas descritas se pueden combinar de diferentes formas, o junto con etapas de preparaciones diferentes, para preparar los compuestos de la invención. Los productos de cada etapa se pueden recuperar por procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, incluyendo extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración o cristalización. Los reactivos y los materiales de partida están fácilmente disponibles para una persona normalmente experta en la materia.

Preparación 1:

2-Bromo-1-(5 -bromo-2-fluorofenil)etan-1-ona



5 N-bromosuccinimida (984 g, 5,53 mol) se añadió en porciones a una solución de 1-(5-bromo-2-fluorofenil)etan-1-ona (1000 g, 4,6 mol) y ácido p-toluenosulfónico (1315 g, 7,64 mol) en DCM (7 l) a 35 °C. La mezcla se agitó y se calentó a 40 °C. La mezcla se enfrió a 24 °C, y se añadió NaHCO<sub>3</sub> (5 l) al 7 %. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 10 % (5 l) y agua (5 l). La capa orgánica se concentró a 2-3 volúmenes para dar el compuesto del título que se usó sin purificación adicional.

Preparación 2:

5-Alil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-1-(4-metoxibencil)hexahidro-1H-pirrol[3,4-c]isoxazol



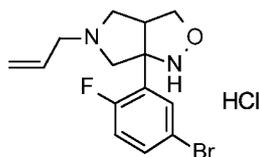
10 A una solución de 2-bromo-1-(5-bromo-2-fluorofenil)etan-1-ona (1363 g, 4,61 mol) en tolueno (10 l) se añadieron dialilamina (537 g, 5,53 mol) y dipea (2381 g, 18,42 mol). La mezcla se agitó durante 4 horas a 40 °C para dar 1-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(dialilamino)etan-1-ona, que no se aisló. Se añadieron N-(4-metoxibencil)hidroxilamina (847 g, 5,53 mol) y Ti(OiPr)<sub>4</sub> (1965 g, 6,91 mol) a la mezcla que contenía 1-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(dialilamino)etan-1-ona en bruto. La mezcla se agitó a 90 °C durante 2 horas. La mezcla se enfrió a 20 °C, y se añadieron ácido cítrico monohidrato al 50 % (4 l) y una solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 l). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con MTBE (5 l). El extracto orgánico se lavó con agua (5 l), y se filtró a través de tierra de diatomeas y se concentró a sequedad. Se añadieron EtOAc (10 l) y ácido oxálico (580 g) al residuo y se filtró un sólido al que se añadió NaOH 1 N (13 l). Se añadió MTBE (5 l) y la mezcla se filtró a través de tierra de diatomeas. Las capas se separaron y la capa orgánica se concentró a 2 volúmenes. se añadió heptano (3 l) y la solución se enfrió a 10 °C. El sólido resultante se filtró para dar el compuesto del título (1330 g, 64%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,51-2,49 (m, 3H), 3,09-3,04 (m, 3H), 3,78-3,41 (m, 6H), 4,01 (m, 1H), 5,24-5,01 (m, 2H), 5,89-5,85 (m, 1H), 6,82-6,80 (m, 2H), 7,51-7,13 (m, 3H), 7,63-7,62 (m, 1H), 7,65-7,64 (m, 1H).

15

20

Preparación 3:

Clorhidrato de 5-alil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)hexahidro-1H-pirrol[3,4-c]isoxazol

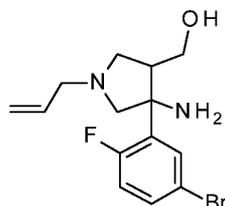


25 Ácido trifluoroacético (4 l, 52,9 mol) se añadió gota a gota a una solución de 5-alil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-1-(4-metoxibencil)hexahidro-1H-pirrol[3,4-c]isoxazol (1990 g, 4,45 mol) en DCM (12 l) a una velocidad que mantuviera la temperatura por debajo de 35 °C. Después de completarse la adición, la mezcla se calentó a 33-43 °C y se agitó durante 6 horas. Se añadió NaOH (20%, 10 l) a una velocidad que mantuviera la temperatura por debajo de 35 °C. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua (6 l). La solución se concentró, se añadió etanol (16 l) y la mezcla se filtró a través de tierra de diatomeas. El filtrado se concentró y se añadió EtOAc (10 l). Se añadió HCl 4 M en EtOAc (8 l) y el sólido resultante se filtró y se secó para dar el compuesto del título (1385 g, 85,6%). EN m/z 327,1 (M+1)

30

Preparación 4:

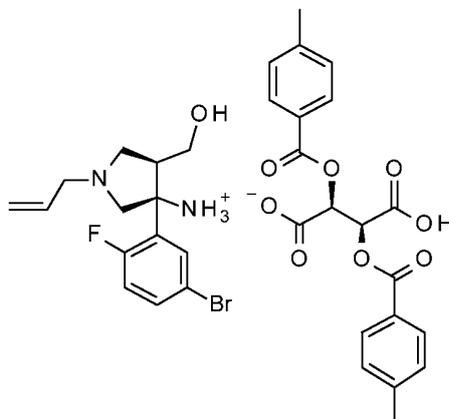
35 (1-Alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)pirrolidin-3-il)metanol



Una solución acuosa saturada de carbonato sódico se añadió a una solución de clorhidrato de 5-alil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)hexahidro-1H-pirrolo[3,4-c]isoxazol (1400 g, 3,85 mol) en DCM (7 l) para alcanzar un pH>9. Las capas se separaron y el extracto orgánico se concentró a 1,5 volúmenes. Se añadió ácido acético (1,38 l) y la solución se concentró a 2 l. Se añadieron ácido acético (7 l) y polvo de cinc (2,5 kg, 38,5 mol) y la mezcla se calentó a 40-50 °C y se agitó durante 3 horas. Se añadió EtOAc (9,8 l) y la mezcla se filtró a través de tierra de diatomeas. La torta de filtro se lavó con EtOAc (4 l). El filtrado se separó y se añadió agua (7 l) a la combinación de extractos orgánicos. Se añadió hidróxido de amonio para alcanzar un pH ≥9. Las capas se separaron y la capa orgánica se concentró a 2 l. Se añadió etanol (2,8 l) y la solución se concentró a 2 l. Se añadió etanol (19 l) y la mezcla se filtró a través de tierra de diatomeas para dar una solución etanólica del compuesto del título, que se usó sin purificación adicional.

## 10 Preparación 5:

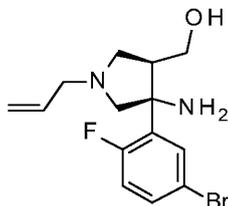
[(3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il]amonio;(2S,3S)-4-hidroxi-2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]-4-oxo-butanoato



Se añadió ácido di-p-toluilo-L-tartárico monohidrato (1,04 kg, 2,69 mol) a una solución de (1-alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)pirrolidin-3-il)metanol (1264 g, 3,85 mmol) en etanol (21 l). La mezcla se calentó a 65-75 °C y se agitó durante 3 horas. La mezcla se enfrió a 5-10 °C, se añadió un cristal semilla de [(3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il]amonio;(2S,3S)-4-hidroxi-2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]-4-oxo-butanoato (1,0 g), y la mezcla se agitó durante 3 horas. El sólido se filtró y la torta de filtro se lavó con etanol frío (1,4 l). La torta de filtro se secó para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco. Análisis quiral del segundo isómero que eluye: Columna: IC Chiralpak, 4,6 mm \* 250 mm \* 5 µm; eluyente: 90% hexano (dietilamina al 0,3 %): 10 % etanol (dietilamina al 0,3 %); caudal de 1,0 ml/min a UV 270 nm confirma el enantiómero enantioméricamente enriquecido (99% ee) con  $R_t = 7,4$  minutos, (1050 g, 38 %). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  2,40 (s, 6H), 3,05-3,04 (m, 1H), 3,57-3,31 (m, 3H), 3,66-3,58 (m, 4H), 3,75-3,74 (m, 2H), 5,38-5,36 (m, 1H), 5,50-5,46 (m, 1H), 5,88 (s, 2H), 5,97-5,91 (m, 1H), 7,10-7,05 (m, 1H), 7,29 (d,  $J = 8,0$  Hz, 4H), 7,53-7,51 (m, 1H), 7,80-7,78 (m, 1H), 8,01 (d,  $J = 8,0$  Hz, 4H).

## 25 Preparación 6:

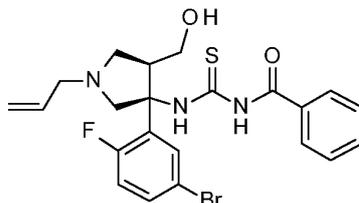
((3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)pirrolidin-3-il)metanol



Se añadió HCl 1 N (500 ml, 500 mmol) a una solución a 0 °C de [(3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il]amonio;(2S,3S)-4-hidroxi-2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]-4-oxo-butanoato (100 g, 139,4 mmol) en EtOAc (500 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora. La capa acuosa se separó y el pH se ajustó a 8 con NaOH 1 N. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (350 ml x 2). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con agua (500 ml) y se concentraron para dar el compuesto del título (40 g, 87%). Análisis quiral del segundo isómero que eluye: Columna: IC Chiralpak, 4,6 mm \* 250 mm \* 5 µm; eluyente: 90% hexano (dietilamina al 0,3 %): 10 % etanol (dietilamina al 0,3 %); caudal de 1,0 ml/min a UV 270 nm confirma el enantiómero enantioméricamente enriquecido (99,7 % ee) con  $R_t = 7,4$ . RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,78-2,70 (m, 5H), 3,16-3,00 (m, 3H), 3,87-3,75 (m, 1H), 3,90-3,84 (m, 1H), 5,24-5,11 (m, 2H), 5,91-5,87 (m, 1H), 6,95-6,91 (m, 1H), 7,35-7,32 (m, 1H), 7,67-7,65 (m, 1H).

## Preparación 7:

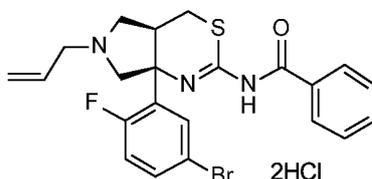
N-(((3S,4R)-1-Alil-3-(5-bromo-2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il)carbamotioil)benzamida



- 5 Se añadió isotiocianato de benzoilo (15,0 g, 91,9 mmol) a una solución a 0 °C de ((3R,4S)-1-alil-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)pirrolidin-3-il)metanol (30 g, 91,1 mmol) en THF (400 ml). La solución se calentó a 25 °C y se agitó durante 1 hora para dar una solución en THF del compuesto del título, que se usó sin purificación adicional.

Preparación 8:

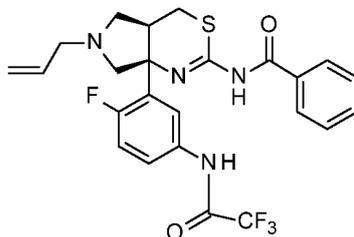
N-((4aR,7aS)-6-Alil-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida, diclorhidrato



- 10 Se añadió trifetilfosfina (36,8 g, 140,3 mmol) a una solución en THF (400 ml) de N-(((3S,4R)-1-alil-3-(5-bromo-2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)pirrolidin-3-il)carbamotioil)benzamida (91,1 mmol). Se añadió azodicarboxilato de di-f-butilo (31,6 g, 137,2 mmol) en THF (100 ml). La mezcla se agitó a 20-30 °C durante 2 horas. La mezcla se concentró y se añadió MTBE (400 ml). La solución se filtró a través de tierra de diatomeas y la torta se lavó con MTBE (130 ml). Los filtrados se combinaron y se añadió HCl 1 N en EtOAc (200 ml). La mezcla se agitó durante 2 horas y después se concentró a 500 ml. Se añadió MTBE (320 ml) y la solución se filtró y se lavó con heptano (130 ml). El sólido se suspendió en EtOAc (650 ml) y se agitó a 50-60 °C durante 2 horas. La suspensión caliente se filtró y el sólido se lavó con EtOAc (130 ml) y heptano (130 ml). El sólido se resuspendió en EtOAc (650 ml) y se agitó durante 2 horas a 50-60 °C. La suspensión caliente se filtró y se lavó con EtOAc (130 ml) y heptano (130 ml). El sólido se secó para dar el compuesto del título como la sal de di-HCl (40 g, 80%, 99,5% ee). Análisis quiral del primer isómero que eluye: Columna: IC Chiralpak, 4,6 mm \* 250 mm \* 5 µm; eluyente: 85 % hexano (dietilamina al 0,1 %): alcohol isopropílico al 15 % (0,1% dietilamina); caudal de 1,0 ml/min a UV 282 nm confirma el enantiómero enantioméricamente enriquecido (99,5 % ee) con  $R_t = 12,5$ .

Preparación 9:

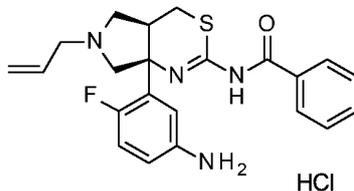
- 25 N-((4aR,7aS)-6-Alil-7a-(2-fluoro-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)fenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida



- 30 Se añadió carbonato de sodio al 15 % (440 ml) a una solución de diclorhidrato de N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (495 g, 717,88 mmol) en EtOAc (3 l) y agua (784 ml). La mezcla se agitó durante 1-2 horas. Las capas se separaron y la capa orgánica se filtró a través de gel de sílice (40 g) y se lavó con EtOAc (600 ml). El filtrado se concentró a sequedad para dar N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida. Trifluoroacetamida (136,7 g, 1,21 mol), NaI (182,5 g, 1,22 mol), tamices moleculares 4 A (342 g), y  $K_2CO_3$  (170,9 g, 1,24 mol) se añadieron a una solución de N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (341 g, 494,54 mmol) en DMSO (525 ml) y 1,4-dioxano (1,025 l). Se añadieron trans-N,N'-dimetilciclohexano (81,6 g, 573,66 mmol) y yoduro de cobre (27,3 g, 143,34 mmol) en DMSO (500 ml) a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó durante 5 minutos. La mezcla se calentó a 100 °C y se agitó durante 8 horas y se enfrió a 24 °C. Se añadieron agua (5,9 l) y DCM (5,9 l), la mezcla se filtró, y las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con agua (5,9 l) para obtener el compuesto del título en una solución de DCM, que se usó sin purificación adicional.

## Preparación 10:

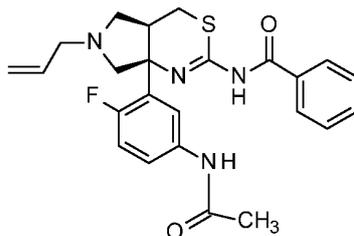
N-((4aR,7aS)-6-Alil-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida, clorhidrato



- 5 Se añadieron hidróxido de sodio (28,7 g) y agua (2,7 l) a una solución en DCM de N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(2-fluoro-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)fenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (250 g, 494,4 mmol) y la mezcla se agitó a 24 °C durante 68 horas. Se añadió HCl 1 N (3,5 l) para obtener a pH of 1-3. Las capas se separaron y la capa acuosa se lavó con DCM (680 ml). Se añadió DCM (4 l) a la solución acuosa, seguido de hidróxido de amonio al 21 % para obtener un pH de 8-10. Las capas se separaron y los extractos orgánicos se combinaron, se filtraron a través de gel de sílice (170 g) y se lavaron con DCM (1,4 l). El disolvente se concentró a sequedad y se diluyó con EtOAc (4 l). Se añadió HCl 1 N en EtOAc (700 ml) a una temperatura menor de 25 °C y la mezcla se agitó durante 1 hora. La mezcla se concentró a aproximadamente 7-8 volúmenes y se añadió EtOAc (2,8 l). El precipitado resultante se filtró y se lavó con EtOAc (400 ml). El sólido se secó para dar el compuesto del título. (246 g, 52 %).

## Preparación 11:

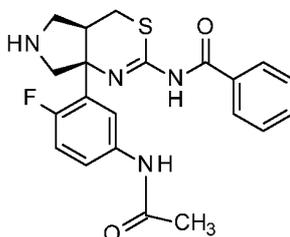
- 15 N-((4aR,7aS)-7a-(5-Acetamido-2-fluorofenil)-6-alil-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo [3,4-d] [1,3]tiazin-2-il)benzamida



- 20 Se añadió anhídrido acético (23,5 g, 0,23 mol) a una solución de clorhidrato de N-((4aR,7aS)-6-alil-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (100 g, 0,153 mol) y trietilamina (54,3 g, 0,535 mol) en DCM (800 ml). Después de agitar durante 1 hora a 20 - 25 °C, se añadieron una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (700 ml) y agua (600 ml). Las capas se separaron para dar el compuesto del título, que se usó sin purificación adicional como solución en DCM.

## Preparación 12:

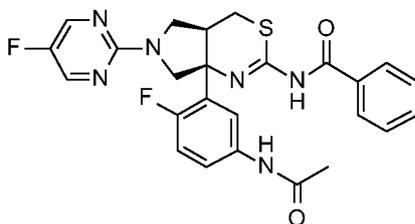
N-((4aR,7aS)-7a-(5-Acetamido-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d] [1,3]tiazin-2-il)benzamida



- 25 Se añadieron trifenilfosfina (4,0 g, 0,015 mol) y ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (15,2 g, 0,097 mol) a una solución en DCM de N-((4aR,7aS)-7a-(5-acetamido-2-fluorofenil)-6-alil-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirrolo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (0,153 mol). Se añadió acetato de paladio (1,7 g, 7,7 mmol) y la mezcla se agitó de 20 a 30 °C durante 1 hora. Se añadió hidróxido de amonio al 25 % y la capa se separaron. La capa orgánica se lavó con HOAc (3,0 equiv en 500 ml de agua) y el pH se ajustó a 8-9 con 25% hidróxido de amonio. La capa acuosa se extrajo con DCM (2 x 500 ml).  
30 Los extractos orgánicos se combinaron y se concentraron a 3-4 volúmenes. Se añadió MTBE (1 l) y la mezcla se filtró. La mezcla se concentró y se añadió heptano (1 l). El sólido resultante se filtró, se recogió y se secó para dar el compuesto del título (48 g, 76%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,15 (s, 3H), 2,87-2,83 (m, 1H), 3,43-3,23 (m, 5H), 3,70-3,67 (m, 1H), 7,12-7,07 (m, 1H), 7,28-7,27 (m, 1H), 7,52-7,41 (m, 4H), 7,79 (m, 1H), 8,18-8,16 (m, 2H). EN m/z 413,1 (M+1).

- 35 Preparación 13:

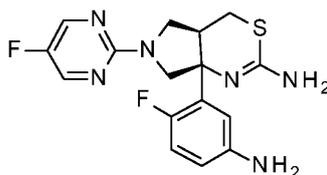
N-((4aR,7aS)-7a-(5-Acetamido-2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirroló [3,4-d] [1,3]tiazin-2-il)benzamida



5 2-Cloro-5-fluoropirimidina (28,9 g, 218 mmol) y carbonato potásico (33,46 g, 242,1 mmol) se añadieron a una solución de N-((4aR,7aS)-7a-(5-acetamido-2-fluorofenil)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (50 g, 121,22 mmol) en DMF (100 ml). La mezcla se calentó a 80-85 °C durante 8 horas. La mezcla se enfrió a 24 °C, se filtró y se lavó con DMF (100 ml). Los sólidos se suspendieron en agua (2 l) y se filtraron para obtener el compuesto del título (68,5 g, 98%). CL-EM: m/z=509,2 (M+1)<sup>+</sup>, RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ ppm 1,22 (t, J = 7,28 Hz, 2 H) 1,92 - 2,07 (m, 6 H) 2,89 - 3,20 (m, 2 H) 3,36 - 3,44 (m, 1 H) 3,67 (t, J = 9,54 Hz, 1 H) 3,84 (s a, 1 H) 4,16 (s a, 2 H) 7,23 (s a, 2 H) 7,35 - 7,61 (m, 8 H) 7,77 (s a, 2 H) 7,85 - 8,18 (m, 4 H) 8,48 (s, 4 H) 10,15 (s a, 1 H) 10,46 - 10,59 (m, 1 H).

Preparación 14:

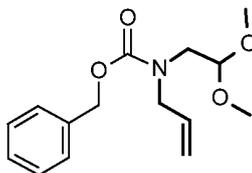
(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirroló [3,4-d] [1,3]tiazin-2-amina



15 Se añadió hidróxido de litio (8,6 g, 204,9 mmol) a una solución de N-((4aR,7aS)-7a-(5-acetamido-2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,6,7,7a-hexahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-2-il)benzamida (80 g, 157,3 mmol) en metanol (400 ml). La mezcla se calentó a 60-70 °C durante 4 horas. Se añadió HCl concentrado (132 g) y la mezcla se agitó a 55 °C durante 18 horas. La mezcla se enfrió a 30 °C y se concentró para retirar el metanol. Se añadió agua y la capa acuosa se extrajo con DCM (3 x) para obtener el compuesto del título como una solución acuosa de 920 g de la que un 5,6 % de la masa total es el compuesto del título que se usó sin purificación adicional.

Preparación 15:

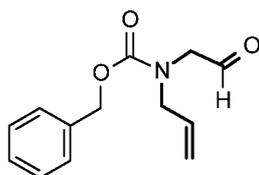
N-Alil-N-(2,2-dimetoxietil)carbamato de bencilo



25 Una solución de N-(2,2-dimetoxietil)carbamato de bencilo (50 g, 208,9 mmol) en tolueno (180 ml) se trató con hidróxido de potasio sólido (51,6 g, 919,69 mmol) en una atmósfera de nitrógeno. Después de 10 minutos, se añadió cloruro de benciltrietilamonio (0,8 g, 3,1 mmol). Después de otros 10 minutos una solución de bromuro de alilo (33 g, 272,8 mmol) en tolueno (50 ml) se añadió gota a gota durante 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 48 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó con agua. La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó con sulfato de magnesio, y se concentró a sequedad para dar el compuesto del título (44 g, 75%). EN/EM (m/e): 280 (M+H).

Preparación 16:

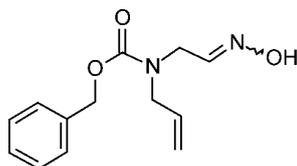
N-Alil-N-(2-oxoetil)carbamato de bencilo



- 5 Una solución de N-allyl-N-(2,2-dimetoilet)carbamato de bencilo (30 g, 107 mmol) en ácido fórmico (36,8 ml, 860 mmol) y agua (4,84 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se concentró y se diluyó con hexanos/EtOAc (1:2) y agua. La capa orgánica se separó, se lavó con solución de salmuera hasta pH=6, y se secó con sulfato sódico. El disolvente se evaporó para dar el compuesto del título (25 g, 99%). EN/EM (m/e): 234 (M+H).

Preparación 17:

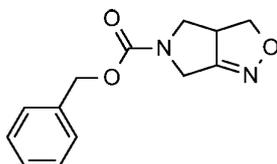
N-allyl-N-[2-hidroxiiminoetil]carbamato de bencilo



- 10 Una solución de N-allyl-N-(2-oxoetil)carbamato de bencilo (25 g, 107 mmol) en acetonitrilo (150 ml) se trató con clorhidrato de hidroxilamina (9,68 g, 139 mmol) y una solución de acetato sódico trihidrato (16 g, 117,9 mmol) en agua (75 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El acetonitrilo se evaporó y la solución acuosa se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó con sulfato de magnesio, y se concentró al vacío para dar el compuesto del título (24 g, 90%). EN/EM (m/e): 249 (M+H).

Preparación 18:

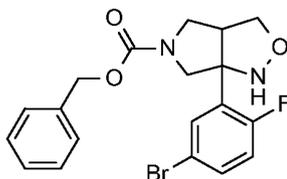
- 15 3,3a,4,6-Tetrahidropirrolo [3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo



- 20 Una solución de N-allyl-N-[2-hidroxiiminoetil]carbamato de bencilo (24 g, 96,6 mmol) en DCM (338 ml) se trató gota a gota durante 10 minutos con una solución acuosa de hipoclorito sódico al 5% p/p (106,08 mmol, 143,06 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se interrumpió con una solución acuosa de bisulfito sódico al 40% (7 g). La capa orgánica se separó, se secó con sulfato de magnesio, y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc al 5 % en hexanos para dar el compuesto del título (18 g, 75%). EN/EM (m/e): 247 (M+H).

Preparación 19:

6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo



- 25 Una solución en hexanos 1,6 M de n-butilitio (25,4 ml, 40,6 mmol) se añadió gota a gota a una solución a -78 °C de 4-bromo-1-fluoro-2-yodobenceno (12,22 g, 40,6 mmol) en THF (60 ml) para dar una solución de color amarillo que se agitó a -78 °C durante 15 minutos.
- 30 Se añadió eterato de trifluoruro de boro (5,14 ml, 40,6 mmol) a una solución separada a -78 °C de 3,3a,4,6-tetrahidropirrol[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo (5 g, 20,3 mmol) en THF (60 ml) y la mezcla se agitó a -78 °C durante 5 minutos. Esta solución se añadió a la mezcla de organolitio a -78 °C anteriormente preparada mediante una cánula. La mezcla combinada se agitó durante 30 minutos a -78 °C. La mezcla se inactivó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y se calentó a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x) y los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y el disolvente se retiró al vacío. El

producto en bruto se purificó sobre gel de sílice con a 35 minutos de ETOAc 5 % al 100 % en hexanos como gradiente para dar el compuesto del título (2,27 g, 27%). EN/EM (m/e): (<sup>79</sup>Br/<sup>81</sup>Br) 421/423 (M+H).

Preparación 20:

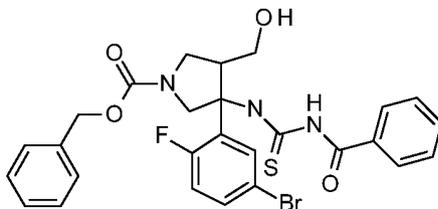
1-(Benzoilcarbamoil)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidropirrollo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo



5 Isotiocianato de benzoilo (2,87 ml, 21,28 mmol) se añadió gota a gota a una solución de 6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrollo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo (5,977 g, 14,2 mmol) en THF (95 ml) y se agitó durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. El disolvente se retiró al vacío. El producto en bruto se purificó sobre gel de sílice con a 30 minutos de ETOAc 5 % al 100 % en hexanos como gradiente para dar el compuesto del título (6,05 g, 73 %). EN/EM (m/e): (<sup>79</sup>Br/<sup>81</sup>Br) 584/586 (M+H).

Preparación 21:

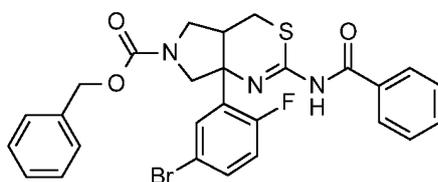
3-(Benzoilcarbamoilamino)-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo



15 Una mezcla de 1-(benzoilcarbamoil)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidropirrollo[3,4-c]isoxazol-5-carboxilato de bencilo (6,05 g 10,4 mmol) y cinc (polvo, <10 micrómetros) (6,77 g, 103,5 mmol) se agitó en ácido acético (52 ml) a temperatura ambiente durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se diluye con EtOAc y se filtró a través de tierra de diatomeas. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se diluyó con EtOAc, agua, y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x), las capas orgánicas combinadas se combinaron y se secaron con sulfato sódico, se filtraron, y el disolvente se retiró al vacío. El producto en bruto se purificó sobre gel de sílice con a 30 minutos de ETOAc 5 % al 100 % en hexanos como gradiente para dar el compuesto del título (5,222 g, 86 %). EN/EM (m/e): (<sup>79</sup>Br/<sup>81</sup>Br) 586/588 (M+H).

Preparación 22:

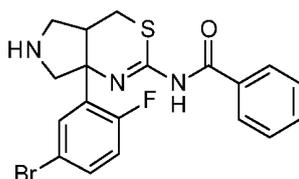
2-Benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de bencilo



25 Se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (2,87 g, 17,7 mmol) a una solución de 3-(benzoilcarbamoilamino)-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (5,198 g, 8,86 mmol) en THF (52 ml). La mezcla se agitó durante 1,5 horas a temperatura ambiente y después la reacción se calentó a reflujo durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se enfrió, se diluyó con agua, y se extrajo con EtOAc (3 x). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron, y el disolvente se retiró al vacío. El producto en bruto se purificó sobre gel de sílice con a 30 minutos de ETOAc 5 % al 100 % en hexanos como gradiente para dar el compuesto del título (2,93 g, 58 %). EN/EM (m/e): (<sup>79</sup>Br/<sup>81</sup>Br) 568/570 (M+H)

Preparación 23:

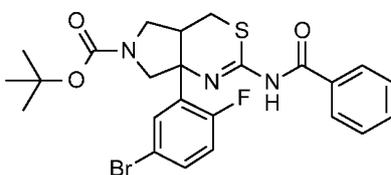
N-[7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrollo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



5 Se añadió yodotrimetilsilano (2,21 ml, 15,46 mmol) gota a gota a una solución a temperatura ambiente de 2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolro[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de bencilo (2,93 g, 5,15 mmol) en acetonitrilo (44 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante dos horas y el disolvente se retiró al vacío. El producto en bruto se purificó con una columna SCX usando DCM:metanol 3:1y después DCM:amoniaco 7 N en metanol 2:1 para dar el compuesto del título (2,098 g, 94%). EN/EM (m/e): (<sup>79</sup>Br/<sup>81</sup>Br) 434/436 (M+H).

Preparación 24:

2-Benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolro[3,4-d] [1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo



10 Dicarbonato de di-*t*-butilo (1,16 g, 5,31 mmol) y trietilamina (1,01 ml, 7,25 mmol) se añadieron a una solución de N-[7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (2,098 g, 4,83 mmol) en DCM (48 ml). La reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. El disolvente se retiró al vacío y el producto en bruto se purificó sobre gel de sílice con a 30 minutos de ETOAc 5 % al 100 % en hexanos como gradiente para dar el compuesto del título (2,556 g, 99 %). EN/EM (m/e): (<sup>79</sup>Br/<sup>81</sup>Br) 534/536 (M+H).

Preparación 25:

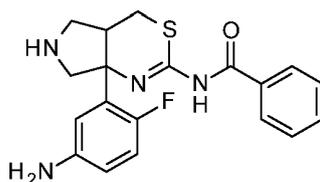
7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahidropirrolro[3,4-d] [1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo



20 Una solución de 2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrolro[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *terc*-butilo (2,556 g, 4,8 mmol) y *trans*-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexanodiamina (150 mg, 1,1 mmol) en etanol (50 ml) se trató con azida sódica (933 mg, 14,3 mmol). Una solución acuosa de la sal sódica de ácido L-ascórbico (0,66 M, 3,2 ml, 2,1 mmol) y agua (1 ml) se añadió a lo anterior, y la parte superior del matraz se purgó con nitrógeno. La mezcla se trató con una solución acuosa de sulfato de cobre(II) pentahidrato (0,33 M, 3,2 ml, 1,1 mmol) y la mezcla se calentó inmediatamente sobre una placa caliente a 80 °C durante 1,5 h en una atmósfera de nitrógeno. Se obtuvo una mezcla homogénea tras el calentamiento. La reacción se enfrió, se diluyó con agua enfriada con hielo, y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x). Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron con sulfato sódico, se filtraron y el disolvente se retiró al vacío para dar el producto de azida en bruto. El producto de azida en bruto se combinó con paladio al 10 % sobre carbono (1 g) en etanol frío (150 ml) y la mezcla se purgó usando vacío/nitrógeno y después vacío/hidrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente con 30 psi de hidrógeno durante 5 horas. La reacción se venteeó, se filtró a través de tierra de diatomeas, y la torta de filtro se enjuagó con DCM. El disolvente se retiró del filtrado al vacío y el producto en bruto se purificó sobre gel de sílice con EtOAc al 50 % en DCM para dar el compuesto del título (2,014 g, 89%). EN/EM (m/e): 471 (M+H).

Preparación 26:

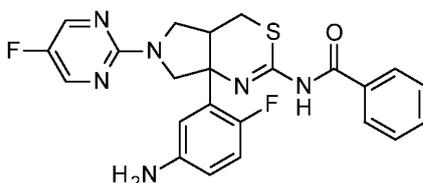
N-[7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrolro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida



- 5 Se añadió ácido trifluoroacético (10 ml) a una solución de 7a-(5-amino-2-fluoro-phenil)-2-benzamido-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d][1,3]tiazina-6-carboxilato de *tert*-butilo (2,013 g, 4,28 mmol) en DCM (30 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 4 horas. El disolvente se retiró al vacío y el producto en bruto se purificó con una columna SCX usando DCM:metanol 3:1 y después DCM:amoníaco 7 N 2:1 en metanol para dar el compuesto del título (1,555 g, 98%). EN/EM (m/e): 371 (M+H).

Preparación 27:

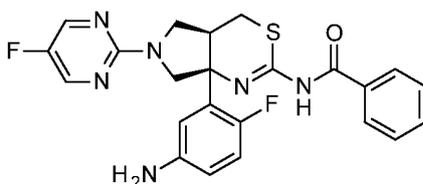
N-[7a-(5-Amino-2-fluoro-phenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d] [1,3]tiazin-2-il]benzamida



- 10 Una solución de N-[7a-(5-amino-2-fluoro-phenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirrollo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (705 mg, 1,90 mmol), 5-fluoro-2-cloropirimidina (1,01 g, 7,61 mmol) y DIPEA (1,66 ml, 9,52 mmol) se calentó en 1,4-dioxano (20 ml) a reflujo durante 4 horas en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se enfrió, se diluyó con agua, y se extrajo con EtOAc (3 x). Los capas orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y el disolvente se retiró al vacío para dar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó sobre gel de sílice con a 25 minutos de ETOAc 5 % al 100 % en hexanos como gradiente para dar el compuesto del título (590 mg, 66 %). EN/EM (m/e): 467 (M+H).

Preparación 28:

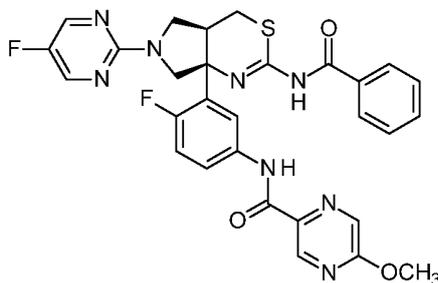
N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluoro-phenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida, (isómero 1)



- 20 La N-[7a-(5-amino-2-fluoro-phenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida racémica (1,694 g, 3,63 mmol) se purificó mediante HPLC quiral (Columna: Chiralcel OJ, 8 x 35 cm; eluyente: metanol al 90 % (dimetilamina al 0,2 %) y acetonitrilo al 10 %; caudal 400 ml/min a UV 280 nm). El análisis del primer isómero que eluye (Columna: Chiralcel OJ-H 0,46 x 15 cm; eluyente: acetonitrilo:metanol 10:90 (con dimetilamina al 0,2 %); caudal: 0,6 ml/min a UV 280 nm) confirma el enantiómero enantioméricamente enriquecido (99% ee) con  $R_t = 6,70$  minutos, (723 mg, 43 %). EN/EM (m/e): 467 (M+H).

Preparación 29:

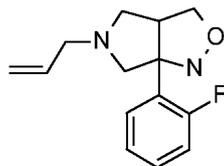
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrollo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida, (isómero 1)



- 5 N-[(4aR,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida, El isómero 1 (0,361 g, 0,77 mmol) se disolvió en una mezcla de DCM (4 ml) y DMF (0,5 ml). Ácido 5-metoxipirazina-2-carboxílico (240 mg, 1,55 mmol), HOBT (210 mg, 1,55 mmol) y EDCI (300 mg, 1,55 mmol) se añadieron a la mezcla y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La solución de reacción se añadió directamente a una columna de carga de gel de sílice de 12 g y se purificaron usando una columna de gel de sílice de 40 g y eluyendo con un gradiente de EtOAc 0-100 % en hexanos. El producto se disolvió en EtOAc (200 ml), se lavó con NaOH 1 N (2 x 50 ml), y con salmuera (1 x 50 ml). La purificación con gel de sílice se repitió como se ha descrito anteriormente para dar el compuesto del título (350 mg, 74%). EN/EM (m/e): 603 (M+H).

Preparación 30:

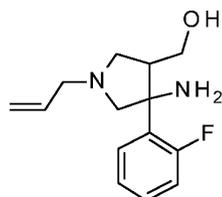
- 10 5-Alil-6a-(2-fluorofenil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrol[3,4-c]isoxazol



- 15 Flujo de la reacción química de la etapa: Un reactor tubular de acero inoxidable de 343 ml sin soldadura (D.O=1/8 pulgada, 0,32 cm) se introdujo en un horno de CG y se lavó abundantemente con tolueno a 20 ml/min durante 20 minutos. Aplicar contrapresión de nitrógeno (720 psig) y configurar la temperatura del CG a 210 °C. Una vez que la temperatura hubo alcanzado 210 °C, una solución de 2-(dialilamino)-1-(2-fluorofenil)etanona oxima (480,51 g, 1,74 mol) en tolueno (5,81 l) se bombeó a través del reactor a 22,866 ml/min usando un par de bombas de jeringa de alta presión que funcionaban en modo continuo para dar in tiempo de residencia de 15 minutos. Una vez que toda la solución madre se hubo consumido, el reactor se purgó con tolueno a 22,866 ml/min durante 30 minutos. La temperatura del horno de CG se configuró a 25 °C y la solución completa se recogió y se concentró al vacío. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en cloruro de metileno (2,5 l) y agua (5 l). El pH se ajustó a 1 con ácido clorhídrico y la capa acuosa se separó y se neutralizó con hidróxido sódico para ajustar el pH a 10. La capa acuosa se extrajo con MTBE (3 x 2,5 l). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron a sequedad para dar el compuesto del título en bruto (248 g, 47%) que se usó sin purificación adicional. EN/EM (m/e): 249 (M+1).

- 25 Preparación 31:

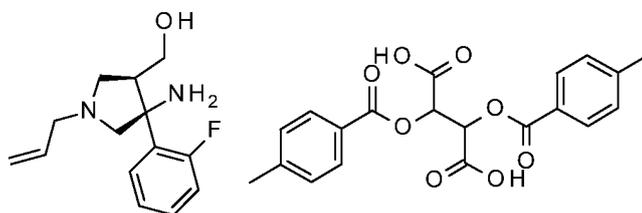
1-Alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol



- 30 Se añadió polvo de cinc (590 g, 9 mol) a una solución de 5-alil-6a-(2-fluorofenil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-pirrol[3,4-c]isoxazol (3559 g, 1,29 mol) en una mezcla de metanol (2,85 l) y solución acuosa saturada de cloruro de amonio (3,56 l) y la mezcla se calentó durante 16 horas a 70 °C. La reacción se enfrió a 60 °C, se diluyó con THF (2,85 l), y después se filtró en caliente sobre tierra de diatomeas. El filtrado se evaporó para retirar el disolvente orgánico, y la acuosa se diluyó con una solución acuosa de ácido cítrico al 10% p/p (4 l) y EtOAc (3,5 l). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se lavó con EtOAc (2 x 2 l). La capa acuosa se neutralizó con hidróxido sódico al 50 % p/p para ajustar el pH a 10, y después se extrajo con EtOAc (2 x 1,5 l). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron a sequedad para dar el compuesto del título en bruto (299 g, 92 %). EN/EM (m/e): 251 (M+1).

Preparación 32:

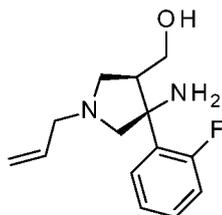
[(3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol; Ácido 2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]butanodioico



Una solución de ácido di-p-toluoil-L-tartárico (348,6 g, 884 mmol) en 1-metoxi-2-propanol (1,13 l) se añadió a una solución de [(3R,4S)-1-alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol (225,9 g, 902 mmol), en 1-metoxi-2-propanol (1,13 l) previamente calentado a 40 °C. La reacción se enfrió a 22 °C y se agitó durante 18 horas. Un sólido de color blanco se recogió por filtración y se lavó con 1-metoxi-2-propanol (600 ml). El sólido recogido se secó para dar el compuesto del título (183,01 g, 31,8%). EN/EM (m/e): 251 (M+1).

Preparación 33:

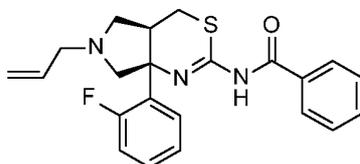
[(3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol



El ácido [(3R,4S)-1-Alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol;2,3-bis[(4-metilbenzoil)oxi]butanodioico (211 g, 331 mmol) se disolvió en agua (2,1 l) y EtOAc (2,3 l). Se añadió ácido clorhídrico al 35 % p/p para ajustar el pH a 1. La capa acuosa se separó y el pH se ajustó a 10 con hidróxido sódico al 50 % p/p y se extrajo con EtOAc (2x). El pH de la capa acuosa se ajustó a 10 con una solución acuosa de NaOH, y se extrajo con MTBE (3x) manteniendo al mismo tiempo el pH de la solución acuosa a pH=10. Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a sequedad para dar el compuesto del título en bruto, (73 g, 88%, 94,8% ee). El producto se analizó por cromatografía quiral: Columna AS-H, eluyente alcohol isopropílico al 10 %, isopropilamina al 2 %; caudal de 3 ml/min a UV 220; presión de 100 bar a 35 °C para dar el compuesto del título como el isómero que eluye en segundo lugar.  $R_f$  = 2,26 minutos. EN/EM (m/e): 251 (M+1).

Preparación 34:

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



Una solución de [(3R,4S)-1-alil-4-amino-4-(2-fluorofenil)pirrolidin-3-il]metanol (129,7 g, 414 mmol) en THF (2,3 l) se enfrió a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió isotiocianato de bencilo (61,5 ml, 456 mmol) manteniendo la temperatura por debajo de 5 °C. La reacción se calentó a temperatura ambiente durante 3 horas y se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (87,4 g, 538,9 mmol) y la reacción se agitó a 22 °C durante 1 hora seguido de calentamiento a 70 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 22 °C y el disolvente se evaporó. El residuo se repartió entre EtOAc (1 l) y agua (1 l). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 400 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron a sequedad para dar el compuesto del título en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de EtOAc / DCM del 0-40% DCM para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (170 g, 99%) que contenía disolvente residual. EN/EM (m/e): 396 (M+1).

Preparación 35:

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



Ácido benzoico, 2-mercapto-(122 g, 793 mmol), bis(dibencilidenoacetona)paladio (4,15 g, 7,21 mmol) y 1,4-bis(difenilfosfino)butano (3,14 g, 7,21 mmol) se añadieron a una solución de N-[(4aR,7aS)-6-alil-7a-(2-fluorofenil)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (178,21 g, 360 mmol) en 2-metiltetrahidrofurano anhidro (1,96 l) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se desgasificó mediante ciclos de vacío y atmósfera de nitrógeno tres veces, y a continuación se hizo burbujear nitrógeno a través de la reacción durante 15 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C con el burbujeo de nitrógeno a través de la reacción. Cuando la reacción alcanzó los

40 °C, el burbujeo se retiró, y la mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 3 horas en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se enfrió a 22 °C y se diluyó con agua (2 l). Se añadió una solución de HCl (5 M) para ajustar el pH a 1. La capa acuosa se separó y se lavó con más cantidad de EtOAc (2 x 800 ml). El pH de la capa acuosa se ajustó a 10 con hidróxido sódico 50 % p/p y después se extrajo con EtOAc (10 l). La capa acuosa se lavó con más cantidad de EtOAc (2 x 750 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron a sequedad para dar el compuesto del título en bruto en forma de un sólido de color amarillo pálido (124,7 g, 97%). EN/EM (m/e): 356 (M+1).

Preparación 36:

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



Una solución de N-[(4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-4a,5,6,7-tetrahidro-4H-pirroló[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (124,7 g, 256 mmol), DIPEA (67 ml), 5-fluoro-2-cloropirimidina (29,3 ml, 307 mmol) en N-metilpirrolidona (997 ml) se calentó a 100 °C durante 16 horas. La reacción se enfrió a 22 °C y se vertió sobre agua enfriada a 10 °C (10 l) manteniendo la temperatura por debajo de 15 °C. Se recogió un sólido de color crema claro por filtración y se lavó con más agua. El sólido húmedo se disolvió en EtOAc (2 l) y se transfirió a un embudo de separación. Se añadió una solución acuosa de cloruro de sodio al 5% p/p (1 l) y la capa orgánica se separó, se secó con sulfato sódico, se filtró, y el filtrado se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc 0-40% en isohexano para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (116 g, 70%). EN/EM (m/e): 452 (M+1).

Preparación 37:

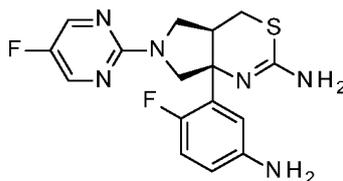
(4aR,7aS)-7a-(2-Fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló [3,4-d][1,3]tiazin-2-amina



Se añadió hidróxido de litio (9,26 g, 386 mmol) a una mezcla de N-[(4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamida (158,6 g, 351,6 mmol), en metanol (1,6 l). La mezcla se calentó a 70 °C durante 4 horas y después se enfrió a 22 °C. La mezcla de reacción se evaporó al vacío para obtener un residuo de color amarillo. El residuo se repartió entre agua (1 l) y EtOAc (750 ml). Se añadió HCl (solución acuosa 5 M) para ajustar el pH a 1. La capa acuosa se separó y la capa orgánica se lavó con EtOAc (2 x 200 ml). El pH de la capa acuosa se ajustó con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 50 % a pH=10 y se extrajo con EtOAc (3 x 1 l). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron a presión reducida para dar el compuesto del título en bruto en forma de un sólido de color amarillo pálido (133,3 g, 99%, que contenía un 12 % de EtOAc residual). EN/EM (m/e): 348 (M+1).

Preparación 38:

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

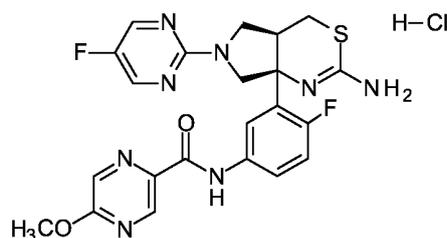


Se añadió una solución de ácido sulfúrico (33,4 ml, 626,6 mmol) a una solución de (4aR,7aS)-7a-(2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (45,8 g, 125,3 mmol) en ácido trifluoroacético (626 ml). La mezcla se enfrió a 0 °C y se agitó durante 20 minutos. Se añadió ácido nítrico fumante (6,2 ml, 144,1 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 22 °C y se agitó a durante 3 horas. La mezcla de reacción se evaporó y se añadió MTBE (250 ml) y se evaporó dos veces. El residuo se secó al vacío hasta un peso constante y después se disolvió en agua (147 ml) y etanol (885 ml) y se desgasificó con burbujeo de nitrógeno durante 15 minutos. La solución se transfirió

a un reactor de presión y se añadió Pd al 10%/C en una pasta tipo 87L (6,6 g, 6,27 mmol). La mezcla se diluyó con más cantidad de etanol (700 ml) y se presurizó con hidrógeno a 80 psi durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtró y después se añadió una segunda carga de catalizadora de Pd al 10%/C en una pasta tipo 87L (6,6 g, 6,27 mmol) y la mezcla se presurizó a 80 psi y se agitó durante 3 días en el reactor presurizado. La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno y se filtró sobre tierra de diatomeas. El filtrado se evaporó y el residuo se repartió entre agua (200 ml) y EtOAc (200 ml). La capa acuosa se separó, se enfrió a 5 °C, y se neutralizó con hidróxido de amonio 15% p/p. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron a presión reducida para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color marrón claro (47,7 g, 99% que contenía EtOAc residual). EN/EM (m/e): 363 (M+1).

#### 10 Ejemplo 1

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



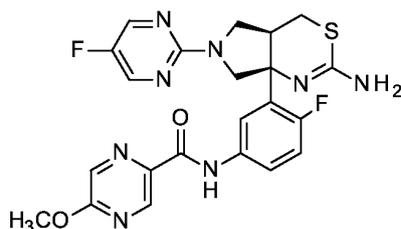
N-[3-[(4aR,7aS)-2-Benzamido-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol [3,4-d] [1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida, El isómero 1 (0,350 g, 0,58 mmol) se disolvió en THF (2 ml) y después se añadieron metanol (4 ml) y etanol (4 ml). Clorhidrato de O-metilhidroxilamina (495 mg, 5,81 mmol) y piridina (470 µl, 5,81 mmol) se añadieron a la mezcla y la reacción se calentó a 50 °C y se agitó durante una noche. Se añadió gel de Sílice (~10 g) a la reacción y la mezcla se concentró. La muestra, secada sobre gel de sílice, se cargó en un cartucho vacío y se purificó eluyendo con un gradiente de amoniaco 7 N en metanol 0-10% en DCM. El producto se purificó por segunda vez en una columna SCX usando DCM:metanol 3:1 y después DCM:amoniaco 7 N en metanol 2:1. El producto se purificó una vez final sobre gel de sílice con un gradiente de amoniaco 7 N en metanol 0% al 10% en DCM para dar la base libre del compuesto del título. Este material se disolvió en DCM (5 ml) y se añadió cloruro de hidrógeno 1 M en éter dietílico (0,20 ml, 660 µmol). El disolvente se retiró al vacío para dar el compuesto del título (71 mg, 23%). EN/EM (m/e): 498 (M+H).

#### 25 Difracción de rayos X en polvo (XRD)

Los patrones XRD de los sólidos cristalinos se obtuvieron en un difractor de rayos X en polvo Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente CuKα λ = 1,54060 Å) y un detector Vantec, funcionando a 35 kV y 50 mA. La muestra se exploró entre 4 y 40° en 2θ, con un tamaño de paso de 0,009° en 2θ y una velocidad de barrido de 0,5 segundos/paso, y con una divergencia de 0,6 mm, 5,28 de fijación antidispersión, ranuras del detector de 9,5 mm. El polvo seco se empaquetó en un portamuestras de cuarzo y se obtuvo una superficie lisa usando un porta de vidrio. Los patrones de difracción de la forma cristalina se recogieron a temperatura y humedad relativa ambiente. Es bien conocido en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma cristalina dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a una orientación preferida resultado de factores tales como la morfología del cristal y el hábito cristalino. Cuando están presentes efectos de orientación, las intensidades de los picos están alteradas, pero las posiciones características de los picos del polimorfo se mantienen inalteradas. Véanse, por ejemplo, The United States Pharmacopeia n.º 23, National Formulary n.º 18, páginas 1843-1844, 1995. Adicionalmente, Es también bien conocido en la técnica de la cristalografía que para cualquier forma cristalina dada, las posiciones de los picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos se pueden desplazar debido a una variación en la temperatura o la humedad a la que se analiza la muestra, desplazamiento de la muestra, o la presencia o ausencia de un patrón interno. En este caso, una variabilidad en la posición del pico de ± 0,2 en 2θ tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin impedir la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalinas se puede hacer basándose en cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de ° 2θ), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de una forma cristalina, recogidos a una temperatura y humedad ambiente, se ajustan basándose en los picos patrón de NIST 675 a 8,853 y 26,774 grados 2-theta.

#### Ejemplo 1a

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



5 N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (201 mg, 403,20  $\mu$ moles) se mezcló con 4 ml de acetato de butilo y se agitó en una placa de agitación a 120 °C. El sólido se disolvió después de aproximadamente 5 minutos, proporcionando una solución incolora transparente. A continuación, la muestra se enfrió a temperatura ambiente y un sólido de color blanco precipitó de la solución. A continuación, la muestra se suspendió a temperatura ambiente durante 10 minutos, proporcionando una suspensión espesa de un sólido de color blanco. El sólido de color blanco se aisló por filtración al vacío y se secó con una corriente de aire durante 5 minutos. La torta resultante de color blanco se introdujo en un vial tarado en el horno de vacío a 60 °C durante el fin de semana para proporcionar el compuesto del título (110 mg).  
10 Forma cristalina 1 N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida es la forma cristalina estable a temperatura ambiente y una humedad relativa menor de aproximadamente un 15%.

### Ejemplo 1b

15 Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (hidratada)

Se añadió cloruro de oxalilo (888  $\mu$ l, 10,2 mmol) a una solución de ácido 5-metoxipirazina-2-carboxílico (1,6 g, 10,2 mmol) en acetonitrilo (53 ml) y DMF (848  $\mu$ l). Después de 15 minutos, la solución recientemente preparada se añadió a una solución de (4aR,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (2,65 g, 7,3 mmol) en una mezcla de agua (53 ml) y etanol (53 ml) previamente calentada a 50 °C. La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante una hora, se enfrió a 22 °C, y después se agitó durante una noche a esta temperatura. El disolvente orgánico se evaporó al vacío y la mezcla acuosa se trató con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 50% p/p para ajustar el pH= 10. Se aisló un sólido de color crema pálido que se lavó con más agua. El sólido se diluyó con alcohol isopropílico (2x) y el disolvente se evaporó. El material en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de metanol amoniado (2N) / cloruro de metileno. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y el disolvente se evaporó para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (1,9 g, 52%). EN/EM (m/e): 499 (M+1).

Preparación alternativa de la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (hidratada)

30 Se añadió acetonitrilo (500 ml) a DMF (19,2 ml, 248,9 mmol). Se añadió cloruro de oxalilo (39,3 g, 309,63 mmol) seguido de ácido 5-metoxipirazina-2-carboxílico (46,0 g, 298,4 mmol) a la solución de DMF/acetonitrilo. En un matraz separado, la solución acuosa de (4aR,7aS)-7a-(5-amino-2-fluorofenil)-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-2-amina (56,8 g, 156,75 mmol) se añadió a acetonitrilo (500 ml) y el pH se ajustó a 9 con hidróxido de amonio (95 ml). Esta mezcla se calentó después a 50 -55 °C. La solución de cloruro de oxalilo se añadió gota a gota y la mezcla se agitó durante 3 horas. El pH se ajustó a 8-9 con hidróxido de amonio. El precipitado resultante se filtró, se lavó con agua, y se secó para obtener el compuesto del título (123 g). El sólido se suspendió en acetona (250 ml) durante 1,5 horas y se filtró. La torta húmeda se lavó con acetona para obtener el compuesto del título (110 g con 90,5% de pureza según el HPLC). THF (1 l) y carbón activo (9 g) se añadieron al sólido y la mezcla se calentó a reflujo durante una noche. La mezcla se filtró a través de tierra de diatomeas y se lavó con THF (150 ml). La solución orgánica se concentró a 10 volúmenes y se calentó a 60 °C. Se añadió agua (430 ml) y la mezcla se agitó a 60 °C durante 8 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 10 horas. El sólido resultante se filtró, se lavó con THF/agua (7:6) y se secó para dar el compuesto del título (69 g, 88%) CL-EM: m/z=499 (M+1), pureza: 98,3 %. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 2,99 - 3,07 (m, 2 H) 3,07 - 3,14 (m, 1 H) 3,58 - 3,67 (m, 1 H) 3,68 - 3,76 (m, 1 H) 3,76 - 3,84 (m, 1 H) 4,02 (s, 3 H) 4,07 (d, J = 10,92 Hz, 1 H) 6,08 (s, 2 H) 7,19 (dd, J = 11,98, 8,72 Hz, 1 H) 7,78 - 7,89 (m, 2 H) 8,41 (s, 1 H) 8,44 (s, 2 H) 8,88 (s, 1 H) 10,60 (s, 1 H).

45 Procedimiento general para la preparación de la Forma cristalina 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-Amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (hidratada)

50 Suspender la N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida en THF a aproximadamente 23 °C a una concentración de aproximadamente 71 mg/ml de disolvente. Calentar la suspensión con agitación para disolver, lo que se produce de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 63 °C. Añadir agua a la solución caliente para proporcionar una relación de THF:agua disolvente de aproximadamente 95:5. Se añadieron cristales semilla de la Forma 2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirroló[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-

carboxamida (carga de aproximadamente 3 % en peso). La suspensión fina resultante se mantuvo de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 63 °C durante aproximadamente 20 minutos, seguido de la adición de aproximadamente 5,3 a aproximadamente 5,5 volúmenes de agua durante de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 horas dando como resultado una relación THF:agua disolvente de aproximadamente 69:31. La suspensión se mantuvo después de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 63 °C durante aproximadamente 30 minutos y después se enfrió a aproximadamente 23 °C durante aproximadamente 1 hora, y después se agitó durante aproximadamente 8-12 horas. La suspensión se filtró a continuación, se enjuagó ligeramente con THF:agua (35:65), y se secó durante aproximadamente 8-12 horas con vacío reducido a aproximadamente 40 °C para proporcionar la Forma 2 cristalina deseada N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida que está hidratada.

Una muestra preparada de la Forma 2 cristalina N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida se caracterizó mediante un patrón XRD usando radiación CuK $\alpha$  por tener los picos de difracción (valores 2-theta) que se describen en la Tabla 1 siguiente. Específicamente, el patrón contiene un pico a 11,8° junto con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 18,6°, 19,3°, y 26,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

**Tabla 1:** Picos de difracción de rayos X en polvo de la Forma cristalina 2 del Ejemplo 1b.

Pico	Ángulo (2-Theta °) +/- 0,2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	11,8	100,0
2	18,6	71,4
3	19,3	45,5
4	26,7	41,9
5	20,6	27,3
6	9,0	19,0
7	24,8	18,5
8	22,4	15,5
9	31,9	14,3
10	10,6	11,2

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

### 20 Ejemplo 1c

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

Cargar una cesta de análisis termogravimétrico con N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida y calentar a aproximadamente 170 °C y mantener a 170 °C durante aproximadamente 5 minutos. Enfriar a temperatura ambiente para proporcionar el compuesto del título.

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

Combinar N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida (121 mg) con acetonitrilo (5 ml) en un vial, y calentar a 90 °C en una placa de agitación. Después de aproximadamente 30 minutos, la mayoría de los sólidos se han disueltos, proporcionando una solución turbia. Se añadieron semillas de la Forma 3 y la mezcla se agitó durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 90 °C. El calentamiento se retiró y la mezcla se agitó para proporcionar a un sólido de color blanco brillante. El sólido se aisló por filtración al vacío, se secó bajo una corriente de aire durante aproximadamente 10 minutos, y después bajo presión reducida a aproximadamente 80 °C durante aproximadamente 8 a 12 horas para proporcionar el compuesto del título.

Una muestra preparada de la Forma 3 cristalina N-[3-[(4aR,7aS)-2-amino-6-(5-fluoropirimidin-2-il)-4,4a,5,7-tetrahidropirrol[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-pirazina-2-carboxamida se caracterizó mediante un patrón XRD usando radiación CuK $\alpha$  por tener los picos de difracción (valores 2-theta) que se describen en la Tabla 2 siguiente. Específicamente, el patrón contiene un pico a 15,7° junto con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 18,1°, 27,0°, y 19,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

**Tabla 2:** Picos de difracción de rayos X en polvo de la Forma cristalina 3 del Ejemplo 1c.

Pico	Ángulo (2-Theta °) +/- 0,2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	15,7	100,0
2	18,1	98,5
3	27,0	80,2
4	19,7	75,4
5	25,3	75,2
6	18,7	50,0
7	17,3	49,7
8	5,2	44,0
9	10,4	41,7
10	11,9	37,7

#### Procedimientos de ensayo *in vitro*:

Para los ensayos enzimáticos y celulares *in vitro*, se prepararon compuestos de ensayo en DMSO para fabricar una solución madre 10 mM. La solución madre se diluyó en serie en DMSO para obtener una curva de dilución de diez puntos con concentraciones finales del compuesto que variaban desde 10 mM a 0,05 nM en una placa de fondo redondeado de 96 pocillos antes de llevar a cabo los ensayos enzimáticos y de células completas *in vitro*.

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

##### Expresión de BACE1 humana

BACE1 humana (número de referencia: AF190725) se clonó a partir de ADNc total de cerebro mediante la RT-PCR. Las secuencias de nucleótidos que corresponden a las secuencias de aminoácidos n.º 1 a 460 se insertaron en el ADNc que codificaba el polipéptido (Fc) de la IgG<sub>1</sub> humana (Vasser, y col., Science, 286, 735-741 (1999)). Esta proteína de fusión de BACE1(1-460) y Fc humana, denominada huBACE1:Fc, se construyó en el vector pJB02. BACE1(1-460):Fc humana (huBACE1:Fc) se expresó transitoriamente en células HEK293. 250 µg de ADNc de cada construcción se mezclaron con Fugene 6 y se añadieron a 1 litro de células HEK293. Cuatro días después de la transfección, se recogieron los medios acondicionados para la purificación.

##### Purificación de huBACE1:Fc.

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

##### Ensayo BACE1 FRET

Se prepararon diluciones en serie de los compuestos de ensayo como se ha descrito anteriormente. Los compuestos se diluyeron además 20x en tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se añadieron diez µl de cada dilución a cada pocillo en la hilera A H de una placa negra de unión baja a proteína correspondiente que contenía la mezcla de reacción (25 µl de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 4,6, TRITON® X-100, 1 mM, 1 mg/ml de albúmina de suero de bovino, y 15 µM de sustrato FRET) (Véase Yang, y col., J. Neurochemistry, 91(6) 1249-59 (2004)). El contenido se mezcló bien en un agitador de placas durante 10 minutos. Quince µl de BACE1 humana doscientos pM (1-460):Fc (Véase Vasser, y col., Science, 286, 735-741 (1999)) en el tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> se añadieron a la placa que contenía el sustrato y a los compuestos de ensayo para iniciar la reacción. Se registraron las URF de la mezcla en el tiempo 0 a una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm, tras una breve mezcla sobre un agitador de placas. La placa de reacción se cubrió con una hoja de aluminio y se mantuvo en un horno humidificado en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 a 24 h. Se registraron las URF al final de la incubación con los mismos escenarios de excitación y emisión usados en el tiempo 0. La diferencia de las URF en el tiempo 0 y al final de la incubación es representativa de la actividad de BACE1 en el tratamiento del compuesto. Las diferencias de las URF se representaron gráficamente frente a la concentración del inhibidor y se ajustó la curva con una ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores de la CE<sub>50</sub> y la CI<sub>50</sub>. (Véase Sinha, y col., Nature, 402, 537-540 (2000)).

El compuesto del Ejemplo 1 se ensayó esencialmente como se ha descrito anteriormente y presentó una CI<sub>50</sub> de BACE1 de 0,615 nM (± 0,101, n=5) [Media + SEM; SEM = error estándar de la media]. Estos datos demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la actividad de la enzima BACE1 recombinante purificada *in vitro*.

##### Ensayo neuronal primario PDAPP

Se llevó a cabo también el ensayo confirmatorio de células completas en cultivos neuronales primarios generados a partir de ratones procedentes de embriones transgénicos PDAPP. Se prepararon neuronas corticales primarias a partir de embriones PDAPP el Día 16 y se cultivaron en placas de 96 pocillos (15 x 10<sup>4</sup> células/pocillos en DMEM/F12 (1:1) más FBS 10%). Después de 2 días, el medio de cultivo *in vitro*, se sustituyó con DMEM/F12 (1:1) exento de suero que contenía suplemento B27 y 2 µM (final) de Ara-C (Sigma, C1768). en el día 5, se incubaron las neuronas *in vitro*, a 37 °C durante 24 h en presencia/ausencia de inhibidores (diluidos en DMSO) a la concentración deseada. Al final de

la incubación, se analizaron los medios acondicionados para la evidencia de la actividad beta-secretasa, por ejemplo, mediante el análisis de péptidos Abeta. Se midieron los péptidos Abeta totales (Abeta 1-x) mediante el ELISA de tipo sándwich, usando el anticuerpo monoclonal 266 como anticuerpo de captura y anticuerpo 3D6 biotinilado como anticuerpo indicador. Como alternativa, se midieron los péptidos Abeta 1-40 y Abeta 1-42 mediante un ELISA de tipo sándwich, usando anticuerpos monoclonal 2G3 como un anticuerpo de captura para Abeta 1-40, y anticuerpo monoclonal 21F12 como un anticuerpo de captura para Abeta 1-42. Los ELISA de Abeta 1-40 y Abeta 1-42 usan el anticuerpo biotinilado 3D6 como el anticuerpo indicador. La concentración de Abeta liberado en medio acondicionado tras el tratamiento del compuesto corresponde a la actividad de BACE1 en dichas condiciones. La curva de inhibición de 10 puntos se representó gráficamente y se ajustó y se ajustó con la ecuación logística de cuatro parámetros para obtener los valores de la  $CE_{50}$  y la  $CI_{50}$  para el efecto de disminución de Abeta. El compuesto del Ejemplo 1 se ensayó esencialmente como se ha descrito anteriormente y presentó la siguiente actividad para el efecto de disminución de Abeta:

Tabla 3

Ejemplo	PDAPP Neurona A-beta (1-40) ELISA $CI_{50}$ (nM)	PDAPP Neurona A-beta (1-42) ELISA $CI_{50}$ (nM)
1	0,275 ( $\pm$ 0,176, n=4)	0,228 ( $\pm$ 0,244, n=3)

Media  $\pm$  SEM; SEM = error estándar de la media

Estos datos demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la producción de Abeta en células completas.

#### Inhibición *in vivo* de la Beta-Secretasa

Algunos modelos animales, incluyendo el de ratón, cobaya, perro, y mono, se pueden usar para cribar la inhibición de la actividad beta-secretasa *in vivo* tras el tratamiento del compuesto. Los animales utilizados en la presente invención pueden ser animales silvestres, transgénicos, o inactivados génicamente. Por ejemplo, el modelo de ratón PDAPP, preparado como se describe en Games y col., Nature 373, 523-527 (1995), y otros animales no transgénicos o inactivados génicamente son útiles para analizar la inhibición *in vivo* de la producción de Abeta y sAPPbeta en presencia de compuestos inhibidores. Generalmente, se administró a ratones PDAPP de 2 a 12 meses de edad, ratones inactivados génicamente o animales no transgénicos el compuesto formulado en vehículos, tales como aceite de maíz, ciclodextrano, tampones fosfato, PHARMASOLVE®, u otros vehículos adecuados. Una a veinticuatro horas después de la administración del compuesto, se sacrificaron los animales, y se retiraron los cerebros, así como el líquido cefalorraquídeo y el plasma para el análisis de Abetas, C99, y fragmentos de sAPP. (Véase May, y col., Journal of Neuroscience, 31, 16507-16516 (2011)).

Para los estudios normalizados de farmacología *in vivo*, se dosificaron los animales con diversas concentraciones de compuesto y se compararon con un grupo control tratado con vehículo dosificado al mismo tiempo. Para algunos estudios de curso temporal, se obtuvieron tejido cerebral, plasma, o líquido cefalorraquídeo de animales seleccionados, comenzando en el tiempo 0 para establecer un valor inicial. Se administró compuesto o vehículo adecuado a otros grupos y se sacrificaron en diversos momentos tras la dosificación. Se obtuvieron tejido cerebral, plasma, o líquido cefalorraquídeo de animales seleccionados y se analizaron para la presencia de productos de escisión de APP, incluyendo péptidos Abeta, sAPPbeta, y otros fragmentos de APP, por ejemplo, mediante ensayos ELISA de tipo sándwich. Al final del periodo de ensayo, se sacrificaron los animales y los tejidos cerebrales, el plasma, o el líquido cefalorraquídeo se analizaron para la presencia de péptidos Abeta, C99, y sAPPbeta, según sea adecuado. Los tejidos cerebrales de los animales transgénicos APP pueden también analizarse para la cantidad de placas de beta-amiloide tras el tratamiento del compuesto. "péptido Abeta 1-x", como se usa en el presente documento, se refiere a la suma de especies Abeta que comienzan con el resto 1 y finalizan con un extremo C mayor que el resto 28. este detecta la mayoría de especies Abeta y se denomina a menudo "Abeta total".

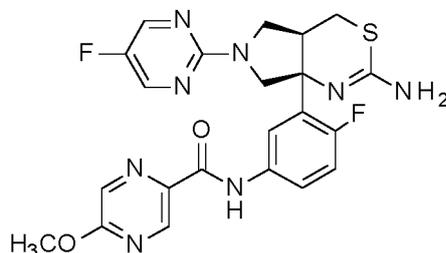
Los animales (PDAPP u otros ratones transgénicos o no transgénicos APP) a los que se administró un compuesto inhibidor, pueden demostrar la reducción de Abeta o sAPPbeta en tejidos cerebrales, plasma o líquidos cefalorraquídeos y disminuye las placas de beta amiloide en el tejido cerebral, en comparación con los controles tratados con vehículo o los controles de tiempo cero. Para el Ejemplo 1, tres horas después de la administración de 0,3, 1, o 3 mg/kg de dosis oral del compuesto, los niveles del péptido Abeta 1-x se redujeron aproximadamente un 31%, 39%, y 61% en el hipocampo del cerebro, y aproximadamente un 28%, 42%, y 64% en la corteza del cerebro, respectivamente en comparación con los ratones tratados con vehículo.

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

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

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



que es cristalino.

- 5 2. El compuesto cristalino de acuerdo con la reivindicación 1 que se **caracteriza por** un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, en un ángulo de difracción 2-theta de 11,8°, junto con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 18,6°, 19,3°, y 26,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.
- 10 3. El compuesto cristalino de acuerdo con la reivindicación 1 que se **caracteriza por** un pico sustancial en el espectro de difracción de rayos X, a un ángulo de difracción 2-theta de 15,7° junto con uno o más de los picos seleccionados entre el grupo que consiste en 18,1°, 27,0°, y 19,7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.
4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en terapia.
5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 15 6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en prevenir la progresión del deterioro cognitivo leve hasta la enfermedad de Alzheimer.
7. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con uno o más transportadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables.