201620918

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201620918 A

(43)公開日： 中華民國 105 (2016) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：104128850 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 09 月 01 日

(51)Int. Cl.： *C07D513/04 (2006.01)* *A61K31/542 (2006.01)*
A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2014/09/15 歐洲專利局 14382347.4

(71)申請人：美國禮來大藥廠 (美國) ELI LILLY AND COMPANY (US)
美國

(72)發明人：寇特 大衛 安德魯 COATES, DAVID ANDREW (US)；羅沙達 巴布羅 葛西亞 LOSADA, PABLO GARCIA (ES)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：0 共 44 頁

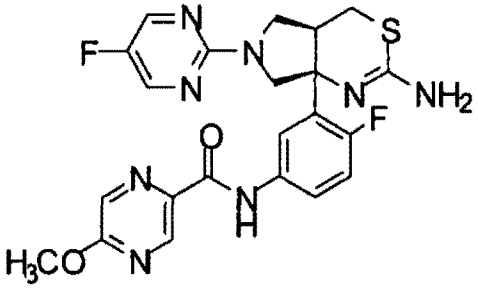
(54)名稱

結晶型ＢＡＣＥ抑制劑

CRYSTALLINE BACE INHIBITORS

(57)摘要

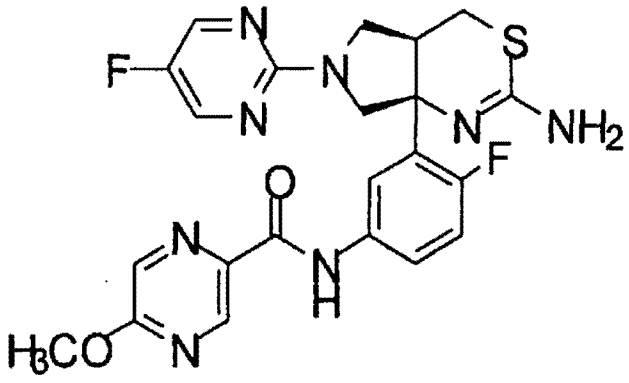
本發明提供一種式Ⅰ化合物：



式Ⅰ

其為結晶型。

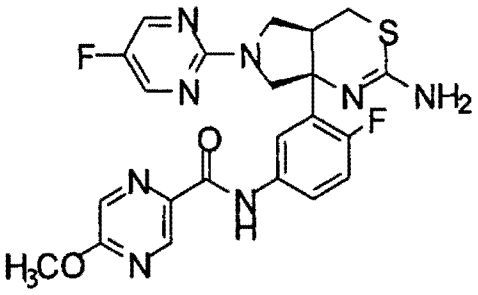
The present invention provides a compound of Formula I:



Formula I

which is crystalline.

特徵化學式：



式I

201620918

發明摘要

※ 申請案號：104128850

※ 申請日：104.9.1

※IPC 分類：C07D513/04 (2006.01)
A61K31/542 (2006.01)
A61P25/28 (2006.01)

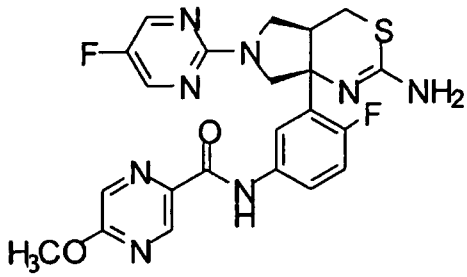
【發明名稱】

結晶型BACE抑制劑

CRYSTALLINE BACE INHIBITORS

【中文】

本發明提供一種式I化合物：

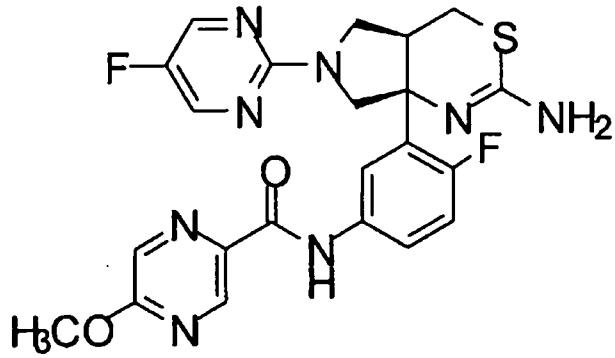


式I

其為結晶型。

【英文】

The present invention provides a compound of Formula I:



Formula I

which is crystalline.

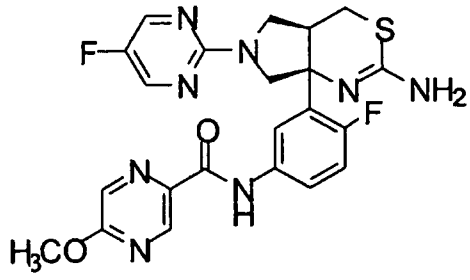
【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



式I

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

結晶型BACE抑制劑

CRYSTALLINE BACE INHIBITORS

本發明係關於新穎結晶型BACE抑制劑，包含該等結晶型BACE抑制劑之醫藥組合物，使用該等結晶型BACE抑制劑治療生理學病症之方法及適用於其合成之中間物及方法。

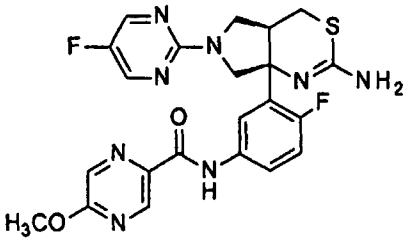
本發明屬於治療阿茲海默氏病及涉及澱粉樣蛋白β (Aβ)肽、澱粉樣蛋白前驅蛋白(APP)之神經毒性及高度凝集肽區段的其他疾病及病症的領域。阿茲海默氏病為影響全世界數百萬患者之破壞性神經退化性病症。鑒於市場上當前批准之藥劑僅向患者提供短暫症狀性利益，治療阿茲海默氏病中存在顯著未滿足之需要。

阿茲海默氏病之特徵為腦中Aβ之產生、凝集及沈積。完全或部分抑制β分泌酶(β位點澱粉樣蛋白前驅蛋白裂解酶；BACE)已展示對小鼠模型中之斑塊相關及斑塊依賴性病變具有重大影響，從而表明即使Aβ肽含量少量降低亦可引起斑塊負荷及突觸缺陷之長期顯著降低，因此提供顯著治療利益，尤其在治療阿茲海默氏病中。

美國專利第8,158,620號揭示稠合之胺基二氫噻嗪衍生物，其具有BACE抑制活性且進一步揭示為由Aβ肽引起之神經退化性疾病(諸如阿爾茨海默型癡呆)的適用治療劑。另外，*J. Neuroscience*, **31**(46), 第16507-16516頁 (2011)揭示(S)-4-(2,4-二氟-5-嘧啶-5-基-苯基)-4-甲基-5,6-二氫-4*H*-[1,3]噻嗪-2-基胺，一種經口投與之CNS活性BACE抑制劑。

需要提供BACE抑制劑之結晶形式以易於製備醫藥調配物及獲得具有改良穩定性之醫藥組合物。

因此，本發明提供一種式I化合物：



式I

其為結晶型。

本發明亦提供一種治療患者之阿茲海默氏病之方法，其包含投與需要此類治療之患者有效量之結晶型式I化合物。本發明進一步提供一種預防患者之輕度認知障礙發展為阿茲海默氏病的方法，其包含投與需要此類治療之患者有效量之結晶型式I化合物。本發明亦提供一種抑制患者之BACE的方法，其包含投與需要此類治療之患者有效量之結晶型式I化合物。本發明亦提供一種抑制BACE介導之澱粉樣蛋白前驅蛋白裂解之方法，其包含投與需要此類治療之患者有效量之結晶型式I化合物。本發明進一步提供一種抑制Aβ肽產生之方法，其包含投與需要此類治療之患者有效量之結晶型式I化合物。

此外，本發明提供一種結晶型式I化合物，其用於療法中，尤其用於治療阿茲海默氏病或預防輕度認知障礙發展為阿茲海默氏病。甚至此外，本發明提供結晶型式I化合物之用途，其用於製造供治療阿茲海默氏病用之藥物或用於預防輕度認知障礙發展為阿茲海默氏病。

本發明進一步提供一種醫藥組合物，其包含結晶型式I化合物以及一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。本發明亦涵蓋用於合成結晶型式I化合物之新穎中間物及方法。

輕度認知障礙基於臨床呈現及展現輕度認知障礙之患者隨時間向阿茲海默氏癡呆之發展定義為與阿茲海默氏病有關之癡呆的可能性

前驅階段。(Morris等人, *Arch. Neurol.*, **58**, 397-405 (2001)；Petersen等人, *Arch. Neurol.*, **56**, 303-308 (1999))。術語「預防輕度認知障礙發展為阿茲海默氏病」包括使患者之輕度認知障礙向阿茲海默氏病之發展減緩、停滯或逆轉。

如本文所用，術語「治療(treating/to treat)」包括抑制、減緩、阻止或逆轉現有症狀或病症之進展或嚴重性。

如本文所用，術語「患者」係指人類。

術語「抑制Aβ肽之產生」意謂減少患者之Aβ肽的活體內含量。

如本文所用，術語「有效量」係指本發明化合物或其醫藥學上可接受之鹽之量或劑量，其在以單次劑量或多次劑量投與診斷或治療下之患者後在患者中提供所要作用。

有效量可由主治診斷醫師(如熟習此項技術者)藉由使用已知技術且藉由觀察在類似情況下所獲得之結果容易地確定。在確定患者之有效量時，主治診斷醫師考慮多個因素，包括(但不限於)：患者之物種；其體型、年齡及一般健康狀況；所涉及之特定疾病或病症；疾病或病症之程度或涉及或嚴重性；個別患者之反應；所投與之特定化合物；投與模式；所投與之製劑之生物可用性特徵；所選擇之給藥方案；伴隨藥療之使用；及其他相關情況。

本發明化合物在寬廣劑量範圍內一般為有效的。舉例而言，每日劑量通常處於約0.01至約20毫克/公斤體重範圍內。在一些情況下，低於前述範圍之下限之劑量可已完全足夠，而在其他情況下，在可接受副作用之情況下可採用更大之劑量，因此以上劑量範圍不欲以任何方式限制本發明之範疇。

本發明化合物較佳調配成醫藥組合物，其藉由使該化合物生物可用之任何路徑投與，包括經口、經皮及非經腸途徑。最佳地，此類組合物用於經口投與或經皮投與，其中經口投與為尤其較佳。此類醫

藥組合物及其製備方法為此項技術中熟知。(參見例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy (編輯D.B. Troy, 第21版, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006)。

結晶型式I化合物尤其適用於本發明之治療方法，但某些形式為較佳。以下段落描述此類形式。應瞭解，此等較佳選擇適用於治療方法與新穎本發明化合物。

較佳為N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之結晶形式1；

N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之結晶形式2；

N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之結晶形式2，其特徵為X射線繞射光譜之繞射角2-θ 11.8°處具有大峰，以及具有一或多個選自由18.6°、19.3°及26.7°組成之群的峰；其中繞射角公差為0.2度；

N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之結晶形式3；及

N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之結晶形式3，其特徵為X射線繞射光譜之繞射角2-θ 15.7°處具有大峰，以及具有一或多個選自由18.1°、27.0°及19.7°組成之群的峰；其中繞射角公差為0.2度。

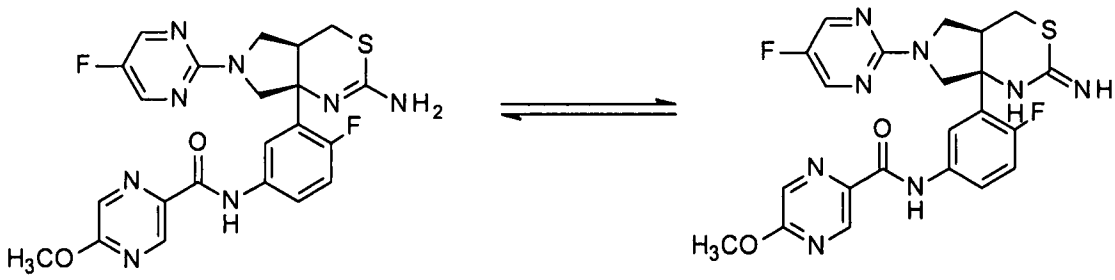
N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并

[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之結晶形式2為尤其較佳。

尤其較佳為N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之結晶形式2，其特徵為X射線繞射光譜之繞射角2-θ 11.8°處具有大峰，以及具有一或多個選自由18.6°、19.3°及26.7°組成之群的峰；其中繞射角公差為0.2度。

一般技術者應瞭解本發明化合物可以互變異構形式存在，如流程A中所描繪。當本申請案中任意提及本發明化合物之特定互變異構體中之一者時，應瞭解涵蓋其互變異構形式與所有混合物。

流程A



另外，以下流程中所述之某些中間物可含有一或多個氮保護基。不同保護基在每次出現時視特定反應條件及欲進行的特定轉化而定可相同或不同。保護及去保護條件為熟習此項技術者所熟知且描述於文獻中(參見例如「*Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*」，第四版，Peter G.M. Wuts及Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007)。

為清楚起見，在以下流程中，未指定某些立體化學中心且已去除某些取代基，且並不意欲以任何方式限制流程之教示。此外，個別異構體、對映異構體及非對映異構體可在合成本發明化合物之任何便利點由一般技術者藉由諸如選擇性結晶技術或對掌性層析之方法分離或解析(參見例如J. Jacques等人，「*Enantiomers, Racemates, and*

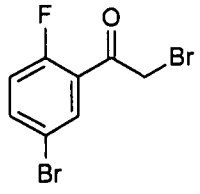
Resolutions」, John Wiley and Sons, Inc., 1981及E.L. Eliel及S.H. Wilen, 「*Stereochemistry of Organic Compounds*」, Wiley-Interscience, 1994)。名稱「異構體1」及「異構體2」係指分別自對掌性層析第一個及第二個溶離之化合物，且若對掌性層析在合成早期開始，則相同名稱施用於後續中間物及實例。

特定縮寫如下定義：「APP」係指澱粉樣蛋白前驅蛋白；「CSF」係指腦脊髓液；「DCM」係指二氯甲烷；「DIPEA」係指二異丙基乙胺或N-乙基-N-異丙基-丙-2-胺；「DMEM」係指杜爾貝科氏改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)；「DMF」係指二甲基甲醯胺；「DMSO」係指二甲亞碸；「EDCI」係指1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽；「ee」係指對映異構體過量；「EtOAc」係指乙酸乙酯；「Ex」係指實例；「F12」係指漢姆氏F12培養基(Ham's F12 medium)；「FBS」係指胎牛血清；「FRET」係指螢光共振能量轉移；「HEK」係指人胚腎；「HOAc」係指乙酸；「HOBt」係指1-羥基苯并三唑水合物；「HPLC」係指高效液相層析；「IC_{50}」係指產生藥劑之最大可能抑制反應之50%的藥劑濃度；「min」係指分鐘；「MTBE」係指甲基第三丁基醚；「PDAPP」係指血小板衍生之澱粉樣蛋白前驅蛋白；「Prep」係指製備；「RFU」係指相對螢光單位；「SCX」係指強陽離子交換；「R_t」係指滯留時間；且「THF」係指四氫呋喃。

本發明之化合物可藉由此項技術中已知之多種程序製備，其中一些在以下製備及實例中說明。各所述途徑之特定合成步驟可以不同方式組合或與不同程序之步驟結合以製備本發明化合物。各步驟之產物可藉由此項技術中熟知之習知方法回收，包括萃取、蒸發、沈澱、層析、過濾、濕磨或結晶。試劑及起始物質為一般技術者容易獲得的。

製備1

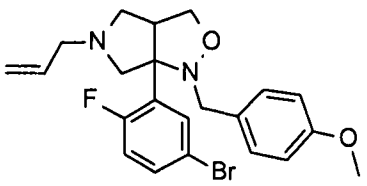
2-溴-1-(5-溴-2-氟苯基)乙-1-酮



在35℃下將N-溴丁二醯亞胺(984 g，5.53 mol)逐份添加至1-(5-溴-2-氟苯基)乙-1-酮(1000 g，4.6 mol)及對甲苯磺酸(1315 g，7.64 mol)於DCM (7 L)中之溶液中。攪拌混合物且加熱至40℃。冷卻混合物至24℃且添加7% $NaHCO_3$ (5 L)。分離各層且用10% Na_2SO_3 (5 L)及水(5 L)洗滌有機層。將有機層濃縮至2-3份體積，得到標題化合物，其不經進一步純化即使用。

製備2

5-烯丙基-6a-(5-溴-2-氟苯基)-1-(4-甲氧基苯甲基)六氫-1H-吡咯并[3,4-c]異噁唑

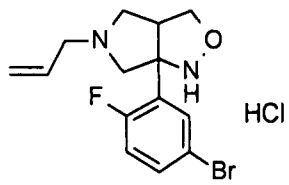


向2-溴-1-(5-溴-2-氟苯基)乙-1-酮(1363 g，4.61 mol)於甲苯(10 L)中之溶液中添加二烯丙胺(537 g，5.53 mol)及dipea (2381 g，18.42 mol)。在40℃下攪拌混合物4小時，得到1-(5-溴-2-氟苯基)-2-(二烯丙基胺基)乙-1-酮，不對其進行分離。將N-(4-甲氧基苯甲基)羥基胺(847 g，5.53 mol)及$Ti(OiPr)_4$ (1965 g，6.91 mol)添加至含有粗1-(5-溴-2-氟苯基)-2-(二烯丙基胺基)乙-1-酮之混合物中。在90℃下攪拌混合物2小時。將混合物冷卻至20℃且添加50%單水合檸檬酸(4 L)及飽和Na_2CO_3 (4 L)。分離各層且用MTBE (5 L)萃取水溶液。用水(5 L)洗滌有機萃取物，經由矽藻土過濾且濃縮至乾。將EtOAc (10 L)及乙二酸(580 g)

添加至殘餘物中，且過濾固體且添加至1 N NaOH (13 L)中。添加MTBE (5 L)且經由矽藻土過濾混合物。分離各相且將有機層濃縮至2份體積。添加庚烷(3 L)且冷卻溶液至10℃。過濾所得固體，得到標題化合物(1330 g，64%)。^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) 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)。

製備3

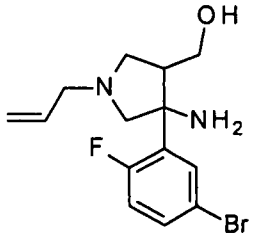
5-烯丙基-6a-(5-溴-2-氟苯基)六氫-1H-吡咯并[3,4-c]異噁唑鹽酸鹽



將三氟乙酸(4 L，52.9 mol)依維持溫度低於35℃之速率逐滴添加至5-烯丙基-6a-(5-溴-2-氟苯基)-1-(4-甲氧基苯甲基)六氫-1H-吡咯并[3,4-c]異噁唑(1990 g，4.45 mol)於DCM (12 L)中之溶液中。添加完成後，將混合物升溫至33-43℃且攪拌6小時。依維持溫度低於35℃之速率添加NaOH (20%，10 L)。分離各層且用水(6 L)洗滌有機層。濃縮溶液，添加乙醇(16 L)且經由矽藻土過濾混合物。濃縮濾液且添加EtOAc (10 L)。添加4 M HCl之EtOAc溶液(8 L)，過濾所得固體且乾燥，得到標題化合物(1385 g，85.6%)。ES m/z 327.1 (M+1)

製備4

(1-烯丙基-4-胺基-4-(5-溴-2-氟苯基)吡咯啶-3-基)甲醇

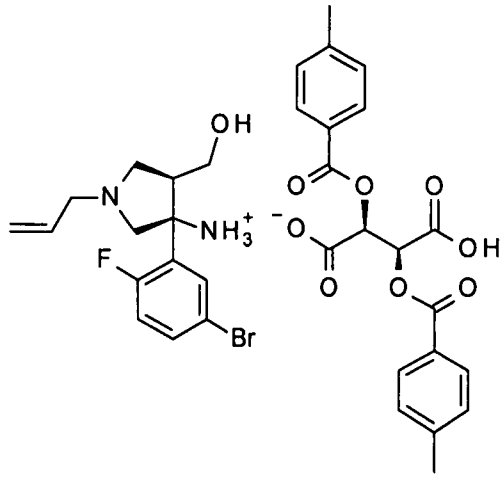


將飽和碳酸鈉水溶液添加至5-烯丙基-6a-(5-溴-2-氟苯基)六氫-

1H-吡咯并[3,4-c]異噁唑鹽酸鹽(1400 g，3.85 mol)於DCM (7 L)中之溶液中以達到pH>9。分離各層且將有機萃取物濃縮至1.5份體積。添加乙酸(1.38 L)且將溶液濃縮至2 L。添加乙酸(7 L)及鋅粉(2.5 kg，38.5 mol)且加熱混合物至40-50℃且攪拌3小時。添加EtOAc (9.8 L)且經由矽藻土過濾混合物。用EtOAc (4 L)洗滌濾餅。分離濾液且將水(7 L)添加至經合併之有機相中。添加氫氧化銨以達到pH值≥9。分離各層且將有機層濃縮至2 L。添加乙醇(2.8 L)且濃縮溶液至2 L。添加乙醇(19 L)且經由矽藻土過濾混合物，得到標題化合物之乙醇溶液，其不經進一步純化即使用。

製備5

(2S,3S)-4-羥基-2,3-雙[(4-甲基苯甲醯基)氧基]-4-側氧基-丁酸[(3S,4R)-1-烯丙基-3-(5-溴-2-氟-苯基)-4-(羥基甲基)吡咯啶-3-基]銨

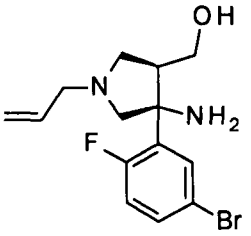


將單水合二對甲苯甲醯基-L-酒石酸(1.04 kg，2.69 mol)添加至(1-烯丙基-4-胺基-4-(5-溴-2-氟苯基)吡咯啶-3-基)甲醇(1264 g，3.85 mmol)於乙醇(21 L)中之溶液中。將混合物加熱至65-75℃且攪拌3小時。冷卻混合物至5-10℃，添加(2S,3S)-4-羥基-2,3-雙[(4-甲基苯甲醯基)氧基]-4-側氧基-丁酸[(3S,4R)-1-烯丙基-3-(5-溴-2-氟-苯基)-4-(羥基甲基)吡咯啶-3-基]銨之晶種(1.0 g)且攪拌混合物3小時。過濾固體且用冷乙醇(1.4 L)洗滌濾餅。乾燥濾餅，得到呈白色固體狀之標題化合

物。第二溶離異構體之對掌性分析(管柱：IC Chiralpak，4.6 mm * 250 mm * 5 μm；溶離劑：90%已烷(0.3%二乙胺):10%乙醇(0.3%二乙胺)；UV 270 nm下，流速1.0 mL/min)確定對映異構性增濃(99% ee)對映異構體(1050 g，38%)，其R_t = 7.4分鐘。^{1}H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ: 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)。

製備6

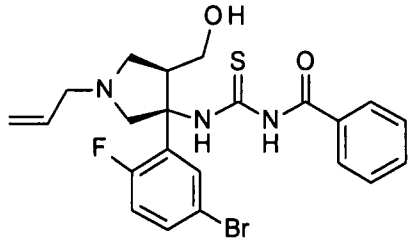
((3R,4S)-1-烯丙基-4-胺基-4-(5-溴-2-氟苯基)吡咯啶-3-基)甲醇



將1 N HCl (500 mL，500 mmol)添加至(2S,3S)-4-羥基-2,3-雙[(4-甲基苯甲醯基)氧基]-4-側氧基-丁酸[(3S,4R)-1-烯丙基-3-(5-溴-2-氟-苯基)-4-(羥基甲基)吡咯啶-3-基]銨(100 g，139.4 mmol)於EtOAc (500 mL)中之0℃溶液中。將混合物攪拌1小時。分離水層且用1 N NaOH調節pH值至8。用EtOAc (350 mL×2)萃取水層。合併有機層，用水(500 mL)洗滌且濃縮，得到標題化合物(40 g，87%)。第二溶離異構體之對掌性分析(管柱：IC Chiralpak，4.6 mm * 250 mm * 5 μm；溶離劑：90%已烷(0.3%二乙胺):10%乙醇(0.3%二乙胺)；在UV 270 nm下，流速1.0 mL/min)確定對映異構性增濃(99.7% ee)對映異構體，其R_t = 7.4分鐘。^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.78-2.70(m, 5H), 3.16-3.00(m, 3H), 3.87-3.75(m, 1H), 3.90-3.84(m, 1H), 5.24-5.11(m, 2H), 5.91-5.87(m, 1H), 6.95-6.91(m, 1H), 7.35-7.32(m, 1H), 7.67-7.65 (m, 1H)。

製備7

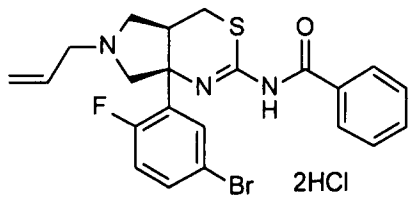
N-(((3S,4R)-1-烯丙基-3-(5-溴-2-氟苯基)-4-(羥基甲基)吡咯啶-3-基)硫代胺甲醯基)苯甲醯胺



將異硫氰酸苯甲醯酯(15.0 g，91.9 mmol)添加至((3R,4S)-1-烯丙基-4-胺基-4-(5-溴-2-氟苯基)吡咯啶-3-基)甲醇(30 g，91.1 mmol)於THF (400 mL)中之0℃溶液中。使溶液升溫至25℃且攪拌1小時，得到標題化合物之THF溶液，其不經進一步純化即使用。

製備8

N-((4aR,7aS)-6-烯丙基-7a-(5-溴-2-氟苯基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺二鹽酸鹽

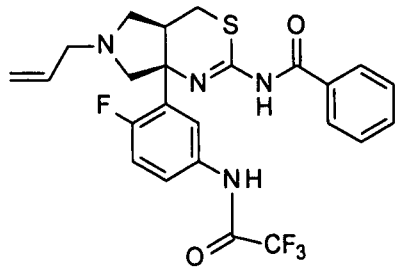


將三苯基膦(36.8 g，140.3 mmol)添加至N-(((3S,4R)-1-烯丙基-3-(5-溴-2-氟苯基)-4-(羥基甲基)吡咯啶-3-基)硫代胺甲醯基)苯甲醯胺(91.1 mmol)之THF (400 mL)溶液中。添加偶氮二甲酸二第三丁酯(31.6 g，137.2 mmol)於THF (100 mL)中之溶液。在20-30℃下攪拌混合物2小時。濃縮混合物且添加MTBE (400 mL)。經由矽藻土過濾溶液且用MTBE (130 mL)洗滌濾餅。合併濾液且添加1 N HCl之EtOAc溶液(200 mL)。攪拌混合物2小時，隨後濃縮至500 mL。添加MTBE (320 mL)，過濾溶液且用庚烷(130 mL)洗滌。將固體於EtOAc (650 mL)中製成漿液且在50-60℃下攪拌2小時。過濾熱漿液且用EtOAc

(130 mL)及庚烷(130 mL)洗滌固體。將固體於EtOAc (650 mL)中再製成漿液且在50-60℃下攪拌2小時。過濾熱漿液且用EtOAc (130 mL)及庚烷(130 mL)洗滌。乾燥固體，得到二鹽酸鹽形式之標題化合物(40 g，80%，99.5% ee)。第一溶離異構體之對掌性分析(管柱：IC Chiralpak，4.6 mm * 250 mm * 5 μm；溶離劑：85%已烷(0.1%二乙胺):15%異丙醇(0.1%二乙胺)；在UV 282 nm下，流速1.0 mL/min)確定對映異構性增濃(99.5% ee)對映異構體，其R_t = 12.5分鐘。

製備9

N-((4aR,7aS)-6-烯丙基-7a-(2-氟-5-(2,2,2-三氟乙醯胺基)苯基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺

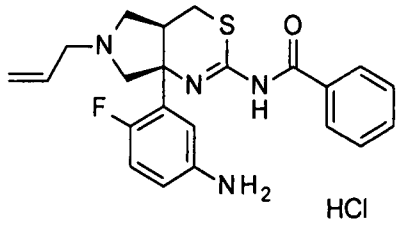


將15%碳酸鈉(440 mL)添加至N-((4aR,7aS)-6-烯丙基-7a-(5-溴-2-氟苯基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺二鹽酸鹽(495 g，717.88 mmol)於EtOAc (3 L)及水 (784 mL)中之溶液中。攪拌混合物1-2小時。分離各層，經由矽膠(40 g)過濾有機層且用EtOAc (600 mL)洗滌。濃縮濾液至乾，得到N-((4aR,7aS)-6-烯丙基-7a-(5-溴-2-氟苯基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺。將三氟乙醯胺(136.7 g，1.21 mol)、NaI (182.5 g，1.22 mol)、4 A分子篩(342 g)及K_2CO_3 (170.9 g，1.24 mol)添加至N-((4aR,7aS)-6-烯丙基-7a-(5-溴-2-氟苯基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺(341 g，494.54 mmol)於DMSO (525 mL)及1,4-二噁烷(1.025 L)中之溶液中。將反-N,N'-二甲基環己烷(81.6 g，573.66 mmol)及碘化銅(27.3 g，143.34 mmol)於DMSO (500 mL)中之

溶液添加至反應混合物中。攪拌混合物5分鐘。使混合物升溫至100℃，攪拌8小時且冷卻至24℃。添加水(5.9 L)及DCM (5.9 l)，過濾混合物且分離各層。用水(5.9 L)洗滌有機層，獲得DCM溶液形式之標題化合物，其不經進一步純化即使用。

製備10

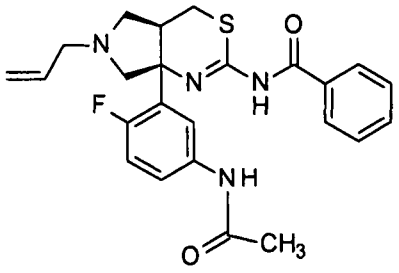
N-((4aR,7aS)-6-烯丙基-7a-(5-胺基-2-氟苯基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺鹽酸鹽



將氫氧化鈉(28.7 g)及水(2.7 L)添加至N-((4aR,7aS)-6-烯丙基-7a-(2-氟-5-(2,2,2-三氟乙醯胺基)苯基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺(250 g，494.4 mmol)之DCM溶液中且在24℃下攪拌混合物68小時。添加1 N HCl (3.5 L)以獲得1-3之pH值。分離各層且用DCM (680 mL)萃取水層。將DCM (4 L)添加至水溶液中，繼而添加21%氫氧化銨，獲得8-10之pH值。分離各層且合併有機萃取物，經由矽膠(170 g)過濾且用DCM (1.4 L)洗滌。濃縮溶劑至乾且用EtOAc (4 L)稀釋。在低於25℃之溫度下添加1 N HCl之EtOAc溶液(700 mL)且攪拌混合物1小時。濃縮混合物至約7-8份體積且添加EtOAc (2.8 L)。過濾所得沈澱且用EtOAc (400 mL)洗滌。乾燥固體，得到標題化合物(246 g，52%)。

製備11

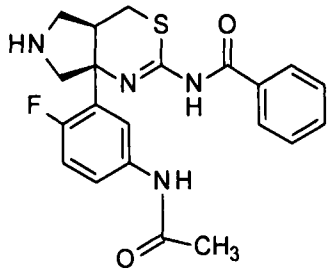
N-((4aR,7aS)-7a-(5-乙醯胺基-2-氟苯基)-6-烯丙基-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺



將乙酸酐(23.5 g，0.23 mol)添加至N-((4aR,7aS)-6-烯丙基-7a-(5-胺基-2-氟苯基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺鹽酸鹽(100 g，0.153 mol)及三乙基胺(54.3 g，0.535 mol)於DCM (800 mL)中之溶液中。在20-25℃下攪拌1小時後，添加飽和$NaHCO_3$ (700 mL)及水(600 mL)。分離各層，得到標題化合物，其不經進一步純化即以DCM溶液形式使用。

製備12

N-((4aR,7aS)-7a-(5-乙醯胺基-2-氟苯基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺

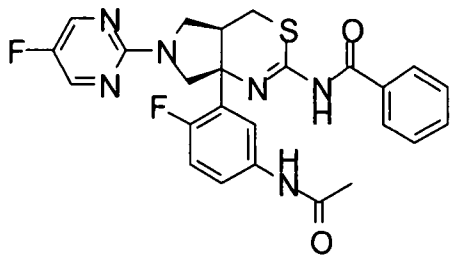


將三苯基膦(4.0g，0.015 mol)及1,3-二甲基巴比妥酸(15.2 g，0.097 mol)添加至N-((4aR,7aS)-7a-(5-乙醯胺基-2-氟苯基)-6-烯丙基-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺(0.153 mol)之DCM溶液中。添加乙酸鈀(1.7 g，7.7 mmol)且在20至30℃下攪拌混合物1小時。添加25%氫氧化銨且分離各相。用HOAc (3.0當量，於500水中)洗滌有機層且用25%氫氧化銨調節pH值至8-9。用DCM (2×500 mL)萃取水層。合併有機萃取物且濃縮至3-4份體積。添加MTBE (1 L)，且過濾混合物。濃縮混合物且添加庚烷(1 L)。過濾所得固體，收集且乾燥，得到標題化合物(48 g，76%)。^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

δ: 2.15 (s, 3H), 2.87-2.83(m, 1H), 3.43-3.23(m, 5H), 3.70-3.67(m, 1H), 7.12-7.07 (m, 1H), 7.28-7.27 (m, 1H), 7.52-7.41(m, 4H), 7.79(m, 1H), 8.18-8.16(m, 2H)。ES m/z 413.1 (M+1)。

製備13

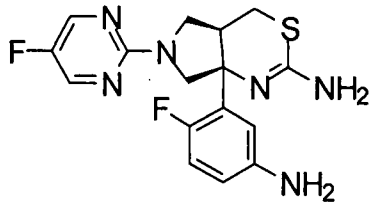
N-((4aR,7aS)-7a-(5-乙醯胺基-2-氟苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺



將2-氯-5-氟嘧啶(28.9 g，218 mmol)及碳酸鉀(33.46 g，242.1 mmol)添加至N-((4aR,7aS)-7a-(5-乙醯胺基-2-氟苯基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺(50 g，121.22 mmol)於DMF (100 mL)中之溶液中。加熱混合物至80-85℃後維持8小時。冷卻混合物至24℃，過濾且用DMF (100 mL)洗滌。將固體於水(2 L)中製成漿液且過濾，獲得標題化合物(68.5 g，98%)。LC-MS: m/z=509.2 (M+1)+, ^{1}H NMR (400 MHz, d_6-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 (br. s., 1 H) 4.16 (br. s., 2 H) 7.23 (br. s., 2 H) 7.35-7.61 (m, 8 H) 7.77 (br. s., 2 H) 7.85-8.18 (m, 4 H) 8.48 (s, 4 H) 10.15 (br. s., 1 H) 10.46-10.59 (m, 1 H)。

製備14

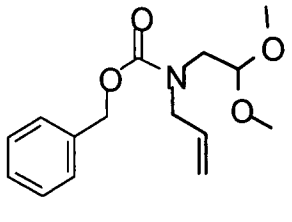
(4aR,7aS)-7a-(5-胺基-2-氟苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-胺



將氫氧化鋰(8.6 g，204.9 mmol)添加至N-((4aR,7aS)-7a-(5-乙醯胺基-2-氟苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,6,7,7a-六氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)苯甲醯胺(80 g，157.3 mmol)於甲醇(400 mL)中之溶液中。加熱混合物至60-70℃後維持4小時。添加濃HCl (132 g)且在55℃下攪拌混合物18小時。冷卻混合物至30℃且濃縮以移除甲醇。添加水且用DCM (3×)萃取水層，獲得920 g水溶液形式之標題化合物，其中總質量之5.6%為標題化合物，其不經進一步純化即使用。

製備15

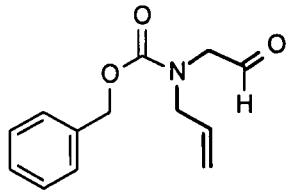
N-烯丙基-N-(2,2-二甲氧基乙基)胺基甲酸苯甲酯



在氮氣下用固體氫氧化鉀(51.6 g，919.69 mmol)處理N-(2,2-二甲氧基乙基)胺基甲酸苯甲酯(50 g，208.9 mmol)於甲苯(180 mL)中之溶液。10分鐘後，添加氯化苯甲基三乙銨(0.8 g，3.1 mmol)。再經10分鐘後，經10分鐘逐滴添加烯丙基溴(33 g，272.8 mmol)於甲苯(50 mL)中之溶液。在50℃下攪拌所得混合物48小時。冷卻混合物至室溫且用水淬滅。分離有機層，用鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥且濃縮至乾，得到標題化合物(44 g，75%)。ES/MS (m/e): 280 (M+H)。

製備16

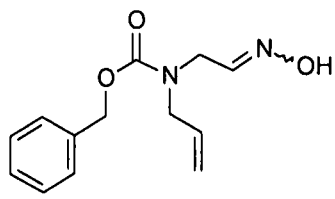
N-烯丙基-N-(2-側氧基乙基)胺基甲酸苯甲酯



在室溫下攪拌N-烯丙基-N-(2,2-二甲氧基乙基)胺基甲酸苯甲酯(30 g，107 mmol)於甲酸(36.8 mL，860 mmol)及水(4.84 mL)中之溶液隔夜。濃縮混合物且用己烷/EtOAc (1:2)及水稀釋。分離有機層，用鹽水溶液洗滌直至pH=6為止且經硫酸鈉乾燥。蒸發溶劑，得到標題化合物(25 g，99%)。ES/MS (m/e): 234 (M+H)。

製備17

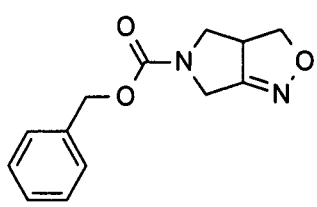
N-烯丙基-N-[2-羥基亞胺基乙基]胺基甲酸苯甲酯



用羥胺鹽酸鹽(9.68 g，139 mmol)及三水合乙酸鈉(16 g，117.9 mmol)於水(75 mL)中之溶液處理N-烯丙基-N-(2-側氧基乙基)胺基甲酸苯甲酯(25 g，107 mmol)於乙腈(150 mL)中之溶液。在室溫下攪拌混合物隔夜。蒸發乙腈且用EtOAc萃取水溶液。分離有機層，經硫酸鎂乾燥且在真空下濃縮，得到標題化合物(24 g，90%)。ES/MS (m/e): 249 (M+H)。

製備18

3,3a,4,6-四氫吡咯并[3,4-c]異噁唑-5-甲酸苯甲酯

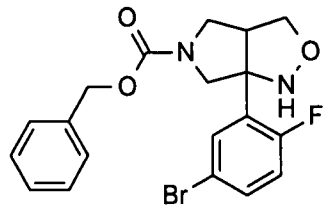


用5% w/w次氯酸鈉水溶液(106.08 mmol，143.06 mL)經10分鐘逐滴處理N-烯丙基-N-[2-羥基亞胺基乙基]胺基甲酸苯甲酯(24 g，96.6

mmol)於DCM (338 mL)中之溶液。在室溫下攪拌所得混合物隔夜。用40%亞硫酸氫鈉水溶液(7 g)淬滅反應物。分離有機層，經硫酸鎂乾燥且在真空下濃縮。經矽膠用5% EtOAc之己烷溶液溶離純化粗產物，得到標題化合物(18 g，75%)。ES/MS (m/e): 247 (M+H)。

製備19

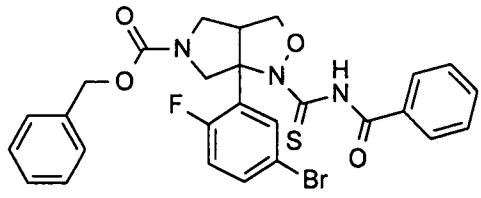
6a-(5-溴-2-氟-苯基)-3,3a,4,6-四氫-1H-吡咯并[3,4-c]異噁唑-5-甲酸苯甲酯



將1.6 M正丁基鋰之己烷溶液(25.4 mL，40.6 mmol)逐滴添加至4-溴-1-氟-2-碘苯(12.22 g，40.6 mmol)於THF (60 mL)中之-78℃溶液，得到黃色溶液，在-78℃下攪拌15分鐘。將三氟化硼醚化物(5.14 mL，40.6 mmol)添加至3,3a,4,6-四氫吡咯并[3,4-c]異噁唑-5-甲酸苯甲酯(5 g，20.3 mmol)於THF (60 mL)中之各別-78℃溶液中且在-78℃下攪拌混合物5分鐘。將此溶液經由導管添加至此前製備之-78℃有機鋰混合物中。在-78℃下攪拌經合併之混合物30分鐘。用飽和氯化銨水溶液淬滅混合物且升溫至室溫。用EtOAc (3×)萃取混合物且合併有機萃取物，經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中移除溶劑。經矽膠以35分鐘5%至100% EtOAc於己烷中的梯度純化粗產物，得到標題化合物(2.27 g，27%)。ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br) 421/423 (M+H)。

製備20

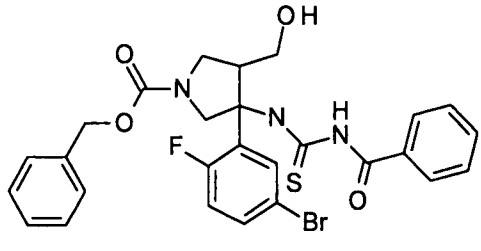
1-(苯甲醯基硫代胺甲醯基)-6a-(5-溴-2-氟-苯基)-3,3a,4,6-四氫吡咯并[3,4-c]異噁唑-5-甲酸苯甲酯



將異硫氰酸苯甲醯酯(2.87 mL，21.28 mmol)逐滴添加至6a-(5-溴-2-氟-苯基)-3,3a,4,6-四氫-1H-吡咯并[3,4-c]異噁唑-5-甲酸苯甲酯(5.977 g，14.2 mmol)於THF (95 mL)中之溶液中且在氮氣下攪拌隔夜。在真空中移除溶劑。經矽膠以30分鐘5%至100% EtOAc於己烷中的梯度純化粗產物，得到標題化合物(6.05 g，73%)。ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br) 584/586 (M+H)。

製備21

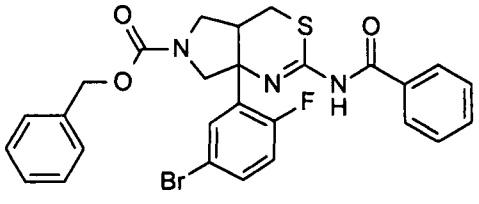
3-(苯甲醯基硫代胺甲醯基胺基)-3-(5-溴-2-氟-苯基)-4-(羥基甲基)吡咯啶-1-甲酸苯甲酯



在室溫下在氮氣下於乙酸(52 mL)中攪拌1-(苯甲醯基硫代胺甲醯基)-6a-(5-溴-2-氟-苯基)-3,3a,4,6-四氫吡咯并[3,4-c]異噁唑-5-甲酸苯甲酯(6.05 g，10.4 mmol)與鋅(粉末，<10微米) (6.77 g，103.5 mmol)之混合物隔夜。用EtOAc稀釋反應物且經由矽藻土過濾。在真空中移除溶劑且用EtOAc、水及飽和碳酸氫鈉水溶液稀釋殘餘物。用EtOAc (3×)萃取混合物，合併經合併之有機層且經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中移除溶劑。經矽膠以30分鐘5%至100% EtOAc於己烷中的梯度純化粗產物，得到標題化合物(5.222 g，86%)。ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br) 586/588 (M+H)。

製備22

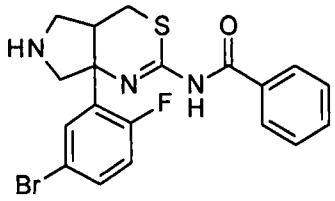
2-苯甲醯胺基-7a-(5-溴-2-氟-苯基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-6-甲酸苯甲酯



將1,1'-羰基二咪唑(2.87 g，17.7 mmol)添加至3-(苯甲醯基硫代胺甲醯基胺基)-3-(5-溴-2-氟-苯基)-4-(羥基甲基)吡咯啶-1-甲酸苯甲酯(5.198 g，8.86 mmol)於THF (52 mL)中之溶液中。在室溫下攪拌混合物1.5小時，隨後在回流下在氮氣下加熱反應物隔夜。冷卻反應物，用水稀釋且用EtOAc (3×)萃取。合併有機層，經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中移除溶劑。經矽膠以30分鐘5%至100% EtOAc於己烷中的梯度純化粗產物，得到標題化合物(2.93 g，58%)。ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br)。568/570 (M+H)

製備23

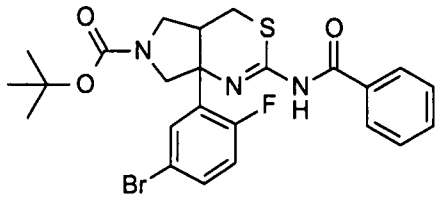
N-[7a-(5-溴-2-氟-苯基)-4a,5,6,7-四氫-4H-吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺



將碘三甲基矽烷(2.21 mL，15.46 mmol)逐滴添加至2-苯甲醯胺基-7a-(5-溴-2-氟-苯基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-6-甲酸苯甲酯(2.93 g，5.15 mmol)於乙腈(44 mL)中之室溫溶液中。在室溫下攪拌反應物2小時且在真空中移除溶劑。用SCX管柱使用3:1 DCM:甲醇隨後2:1 DCM:7 N氨之甲醇溶液純化粗產物，得到標題化合物(2.098 g，94%)。ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br) 434/436 (M+H)。

製備24

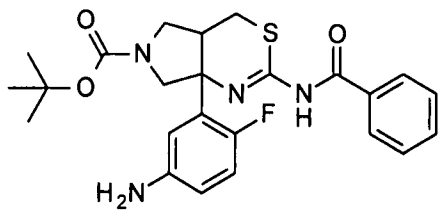
2-苯甲醯胺基-7a-(5-溴-2-氟-苯基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-6-甲酸第三丁酯



將二碳酸二第三丁酯(1.16 g，5.31 mmol)及三乙胺(1.01 mL，7.25 mmol)添加至N-[7a-(5-溴-2-氟-苯基)-4a,5,6,7-四氫-4H-吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺(2.098 g，4.83 mmol)於DCM (48 mL)中之溶液中。在室溫下在氮氣下攪拌反應物1小時。在真空中移除溶劑且經矽膠用30分鐘5%至100% EtOAc之己烷溶液的梯度純化粗產物，得到標題化合物(2.556 g，99%)。ES/MS (m/e): (^{79}Br/^{81}Br) 534/536 (M+H)。

製備25

7a-(5-胺基-2-氟-苯基)-2-苯甲醯胺基-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-6-甲酸第三丁酯

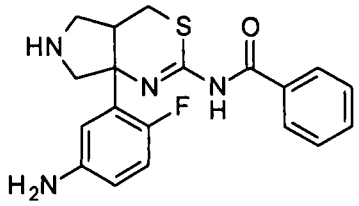


用疊氮化鈉(933 mg，14.3 mmol)處理2-苯甲醯胺基-7a-(5-溴-2-氟-苯基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-6-甲酸第三丁酯(2.556 g，4.8 mmol)及反-N,N'-二甲基-1,2-環己烷二胺(150 mg，1.1 mmol)於乙醇(50 mL)中之溶液。添加L抗壞血酸鈉鹽(0.66 M，3.2 mL，2.1 mmol)及水(1 mL)之水溶液且用氮氣吹掃燒瓶之頂部。用五水合硫酸銅(II)之水溶液(0.33 M，3.2 mL，1.1 mmol)處理混合物且在80℃下在氮氣下於預熱加熱板上立即加熱混合物1.5小時。加熱後獲得均勻混合物。冷卻反應物，用冰水稀釋且用EtOAc (3×)萃取混合物。合併有

機萃取物且經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中移除溶劑，得到粗疊氮產物。將粗疊氮產物與10%鈀/碳(1 g)於冷乙醇(150 mL)中組合且依序使用真空/氮氣及真空/氫氣吹洗混合物。在室溫下在30 psi氫氣下攪拌混合物5小時。排出反應物，經由矽藻土過濾且用DCM沖洗濾餅。在真空中自濾液移除溶劑且經矽膠用50% EtOAc之DCM溶液純化粗產物，得到標題化合物(2.014 g，89%)。ES/MS (m/e): 471 (M+H)。

製備26

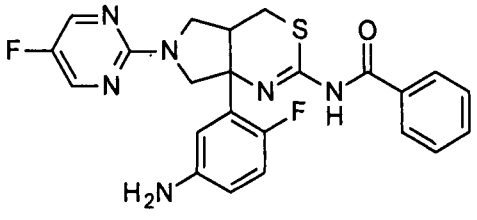
N-[7a-(5-胺基-2-氟-苯基)-4a,5,6,7-四氫-4H-吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺



將三氟乙酸(10 mL)添加至7a-(5-胺基-2-氟-苯基)-2-苯甲醯胺基-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-6-甲酸第三丁酯(2.013 g，4.28 mmol)於DCM (30 mL)中之溶液中且在室溫下在氮氣下攪拌混合物4小時。在真空中移除溶劑且用SCX管柱依序使用3:1 DCM:甲醇及2:1 DCM:7 N氨之甲醇溶液純化粗產物，得到標題化合物(1.555 g，98%)。ES/MS (m/e): 371 (M+H)。

製備27

N-[7a-(5-胺基-2-氟-苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺

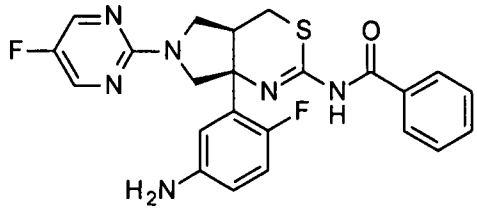


在氮氣下於1,4-二噁烷(20 mL)中加熱N-[7a-(5-胺基-2-氟-苯基)-4a,5,6,7-四氫-4H-吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺(705 mg，1.90

mmol)、5-氟-2-氯嘧啶(1.01 g，7.61 mmol)及DIPEA (1.66 mL, 9.52 mmol)之溶液至回流後維持4小時。冷卻反應物，用水稀釋且用EtOAc (3×)萃取。合併有機層且經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中移除溶劑，得到粗產物。經矽膠以25分鐘5%至100% EtOAc於己烷中的梯度純化粗產物，得到標題化合物(590 mg，66%)。ES/MS (m/e): 467 (M+H)。

製備28

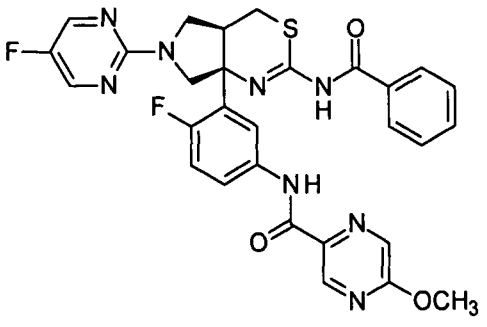
N-[(4aR,7aS)-7a-(5-胺基-2-氟-苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺(異構體1)



藉由對掌性HPLC (管柱：Chiralcel OJ，8 × 35 cm；溶離劑：90%甲醇(0.2%二甲基乙胺)及10%乙腈；在UV 280 nm下，流速400 mL/min)純化外消旋N-[7a-(5-胺基-2-氟-苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺(1.694 g，3.63 mmol)。第一溶離異構體之分析(管柱：Chiralcel OJ-H 0.46×15 cm；溶離劑：10:90乙腈:甲醇(含有0.2%二甲基乙胺)；在UV 280 nm下，流速：0.6 mL/min)確定對映異構性增濃(99% ee)對映異構體(723 mg，43%)，其中R_t = 6.70分鐘。ES/MS (m/e): 467 (M+H)。

製備29

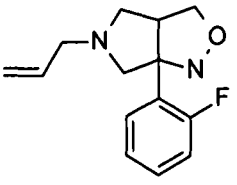
N-[3-[(4aR,7aS)-2-苯甲醯胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺(異構體1)



將N-[(4aR,7aS)-7a-(5-胺基-2-氟-苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺異構體1 (0.361 g，0.77 mmol)溶解於DCM (4 mL)與DMF (0.5 mL)之混合物中。將5-甲氧基吡嗪-2-甲酸(240 mg，1.55 mmol)、HOBT (210 mg，1.55 mmol)及EDCI (300 mg，1.55 mmol)添加至混合物中且在室溫下攪拌混合物隔夜。將反應溶液直接添加於12 g矽膠負載管柱上且使用40 g矽膠管柱及用0-100% EtOAc/己烷梯度溶離純化。將產物溶解於EtOAc (200 mL)中，用1 N NaOH (2×50 mL)及鹽水(1×50 mL)洗滌。如上所述重複矽膠純化，得到標題化合物(350 mg，74%)。ES/MS (m/e): 603 (M+H)。

製備30

5-烯丙基-6a-(2-氟苯基)-3,3a,4,6-四氫-1H-吡咯并[3,4-c]異噁唑

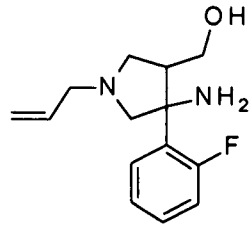


流動化學反應步驟：將343-ml無縫不鏽鋼管狀反應器(O.D=1/8吋)置放在GC烘箱內且在20 mL/min下用甲苯沖洗20分鐘。施加氮氣背壓(720 psig)且將GC之溫度設定為210℃。溫度達到210℃後，使用以連續模式工作之高壓注射器泵對以22.866 mL/min將2-(二烯丙基胺基)-1-(2-氟苯基)乙酮肟(480.51 g，1.74 mol)於甲苯(5.81 L)中之溶液泵送通過反應器，產生15分鐘之滯留時間。所有儲備溶液耗盡後，用甲苯以22.866 mL/min沖洗反應器30分鐘。將GC烘箱之溫度設定為25

℃，收集所有溶液且在真空下濃縮。蒸發溶劑且將殘餘物溶解於二氯甲烷(2.5 L)及水(5 L)中。用鹽酸調節pH值至1，分離水層且用氫氧化鈉中和以調節pH值至10。用MTBE (3×2.5 L)萃取水層。組合有機萃取物，經硫酸鈉乾燥，過濾且蒸發至乾，得到粗標題化合物(248 g，47%)，其不經進一步純化即使用。ES/MS (m/e): 249 (M+1)。

製備31

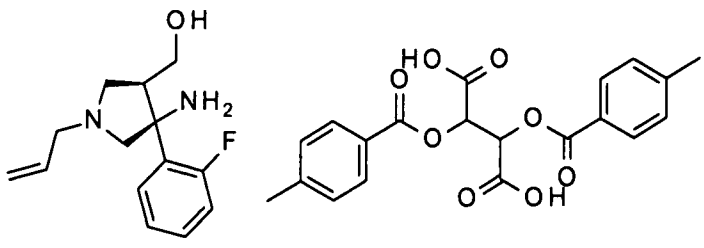
1-烯丙基-4-胺基-4-(2-氟苯基)吡咯啶-3-基]甲醇



將鋅粉(590 g，9 mol)添加至5-烯丙基-6a-(2-氟苯基)-3,3a,4,6-四氫-1H-吡咯并[3,4-c]異噁唑(3559 g，1.29 mol)於甲醇(2.85 L)與氯化銨飽和水溶液(3.56 L)之混合物中之溶液中且在70℃下加熱混合物16小時。冷卻反應物至60℃，用THF (2.85 L)稀釋且趁熱經矽藻土過濾。蒸發濾液以移除有機溶劑且用10% w/w檸檬酸水溶液(4 L)及EtOAc (3.5 L)稀釋水性混合物。分離有機層且用EtOAc (2×2 L)洗滌水層。用氫氧化鈉50% w/w中和水層以調節pH值至10，隨後用EtOAc (2 × 1.5 L)萃取。合併有機萃取物，經硫酸鈉乾燥，過濾且蒸發至乾，得到粗標題化合物(299 g，92%)。ES/MS (m/e): 251 (M+1)。

製備32

[(3R,4S)-1-烯丙基-4-胺基-4-(2-氟苯基)吡咯啶-3-基]甲醇; 2,3-雙[(4-甲基苯甲醯基)氧基]丁二酸

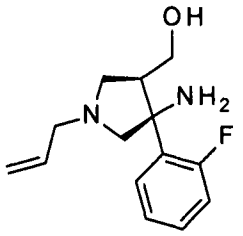


將二對甲苯甲醯基-L-酒石酸(348.6 g，884 mmol)於1-甲氧基-2-丙醇(1.13 L)中之溶液添加至在40℃下預熱之[(3R,4S)-1-烯丙基-4-胺

基-4-(2-氟苯基)吡咯啶-3-基]甲醇(225.9 g，902 mmol)於1-甲氧基-2-丙醇(1.13 L)中之溶液中。冷卻反應物至22℃且攪拌18小時。藉由過濾收集白色固體且用1-甲氧基-2-丙醇(600 ml)洗滌。乾燥所收集之固體，得到標題化合物(183.01 g，31.8%)。ES/MS (m/e): 251 (M+1)。

製備33

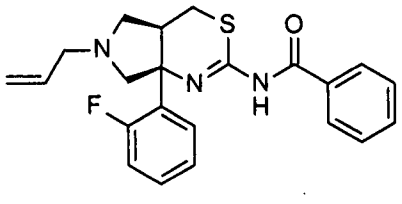
[(3R,4S)-1-烯丙基-4-胺基-4-(2-氟苯基)吡咯啶-3-基]甲醇



將[(3R,4S)-1-烯丙基-4-胺基-4-(2-氟苯基)吡咯啶-3-基]甲醇;2,3-雙[(4-甲基苯甲醯基)氧基]丁二酸(211 g，331 mmol)溶解於水(2.1 L)及EtOAc (2.3 L)中。添加鹽酸35% w/w以調節pH值至1。分離水層且用氫氧化鈉50% w/w調節pH值至10且用EtOAc (2×)萃取。用NaOH水溶液調節水層之pH值至10且用MTBE (3×)萃取，同時亦維持水溶液之pH值在pH=10下。合併有機萃取物，經硫酸鈉乾燥，過濾且濃縮至乾，得到粗標題化合物(73 g，88%，94.8% ee)。藉由對掌性層析(管柱AS-H，溶離劑10%異丙醇，2%異丙胺；在UV 220下，流速3 mL/min；在35℃下，壓力100巴)分析產物，得到標題化合物作為第二溶離異構體，R_f = 2.26分鐘。ES/MS (m/e): 251 (M+1)。

製備34

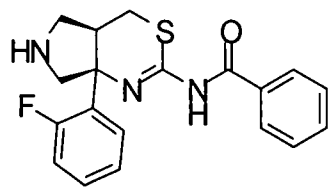
N-[(4aR,7aS)-6-烯丙基-7a-(2-氟苯基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺



在0℃下在氮氣氛圍下冷卻[(3R,4S)-1-烯丙基-4-胺基-4-(2-氟苯基)吡咯啶-3-基]甲醇(129.7 g, 414 mmol)於THF (2.3 L)中之溶液。在保持溫度低於5℃下添加異硫氰酸苯甲醯酯(61.5 mL，456 mmol)。使反應物經3小時升溫至室溫，添加1,1'-羰基二咪唑(87.4 g，538.9 mmol)且在22℃下攪拌反應物1小時，繼而在70℃下加熱16小時。冷卻反應混合物至22℃且蒸發溶劑。使殘餘物分配於EtOAc (1 L)與水(1 L)中。分離有機層且用EtOAc (2×400 mL)萃取水層。合併有機相，經硫酸鈉乾燥，過濾且蒸發至乾，得到粗標題化合物。藉由矽膠層析用0-40% DCM之EtOAc/DCM之梯度溶離純化粗產物，得到呈淡黃色固體狀之標題化合物(170 g，99%)，其含有殘餘溶劑。ES/MS (m/e): 396 (M+1)。

製備35

N-[(4aR,7aS)-7a-(2-氟苯基)-4a,5,6,7-四氫-4H-吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺

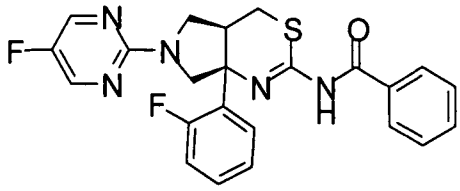


在氮氣氛圍下將2-巰基-苯甲酸(122 g，793 mmol)、雙(二苯亞甲基)鈀(4.15 g，7.21 mmol)及1,4-雙(二苯基膦基)丁烷(3.14 g，7.21 mmol)添加至N-[(4aR,7aS)-6-烯丙基-7a-(2-氟苯基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺(178.21 g，360 mmol)於無水2-甲基四氫呋喃(1.96 L)中之溶液中。將溶液藉由真空/氮氣循環三次脫氣，隨後使氮氣鼓泡通過反應物15分鐘。加熱反應混合物至40℃，同時使氮氣鼓泡通過反應物。當反應物達到40℃時，移除鼓泡且在40℃下在氮氣氛圍下攪拌反應混合物3小時。將反應物22℃且用水(2 L)稀釋。添加HCl (5 M)以調節pH值至1。分離水層且再用EtOAc (2 × 800 mL)

洗滌。用氫氧化鈉50% w/w調節水層之pH值至10，隨後用EtOAc (10 L)萃取。再用EtOAc (2×750 mL)洗滌水層。合併有機萃取物，用鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾且蒸發至乾，得到呈淡黃色固體狀之粗標題化合物(124.7 g，97%)。ES/MS (m/e): 356 (M+1)。

製備36

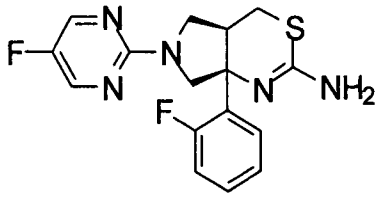
N-[(4aR,7aS)-7a-(2-氟苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺



加熱N-[(4aR,7aS)-7a-(2-氟苯基)-4a,5,6,7-四氫-4H-吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺(124.7 g，256 mmol)、DIPEA (67 mL)、5-氟-2-氯嘧啶(29.3 ml，307 mmol)於N-甲基吡咯啶酮(997 mL)中之溶液至100℃後維持16小時。冷卻反應物至22℃且在保持溫度低於15℃下倒入10℃冷卻水(10 L)中。藉由過濾收集淺奶油色固體且再用水洗滌。將濕固體溶解於EtOAc (2 L)中且轉移至分液漏斗。添加氯化鈉水溶液5% w/w (1 L)且分離有機層，經硫酸鈉乾燥，過濾且將濾液在減壓下蒸發。藉由矽膠層析使用0-40% EtOAc/異己烷之梯度純化產物，得到呈淺黃色固體狀之標題化合物(116 g，70%)。ES/MS (m/e): 452 (M+1)。

製備37

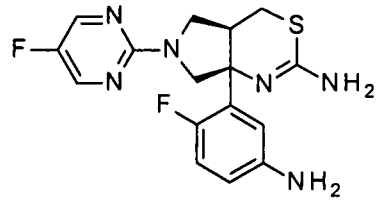
(4aR,7aS)-7a-(2-氟苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-胺



將氫氧化鋰(9.26 g，386 mmol)添加至N-[(4aR,7aS)-7a-(2-氟苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基]苯甲醯胺(158.6 g，351.6 mmol)於甲醇(1.6 L)中之混合物中。在70℃下加熱混合物4小時，隨後冷卻至22℃。在真空下蒸發反應混合物，得到黃色殘餘物。使殘餘物分配於水(1 L)與EtOAc (750 mL)中。添加HCl (5 M水溶液)以調節pH值至1。分離水層且用EtOAc (2×200 mL)萃取有機層。用氫氧化鈉50% w/w水溶液調節水層之pH值至pH=10且用EtOAc (3 × 1 L)萃取。合併有機萃取物，經硫酸鈉乾燥，過濾且在減壓下蒸發，得到呈淺黃色固體狀之粗標題化合物(133.3 g，99%，含有12%殘餘EtOAc)。ES/MS (m/e): 348 (M+1)。

製備38

(4aR,7aS)-7a-(5-胺基-2-氟苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-胺

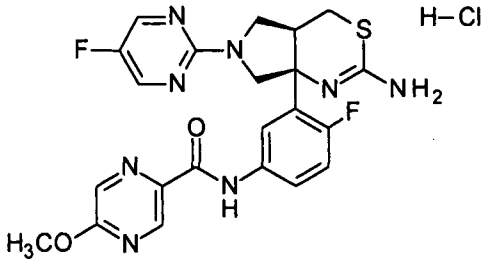


將硫酸(33.4 ml，626.6 mmol)添加至(4aR,7aS)-7a-(2-氟苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d] [1,3]噻嗪-2-胺(45.8 g，125,3 mmol)於三氟乙酸(626 mL)中之溶液中。將混合物冷卻至0℃且攪拌20分鐘。添加發煙硝酸(6.2 mL，144.1 mmol)，使反應混合物升溫至22℃且攪拌3小時。蒸發反應混合物，添加MTBE (250 mL)且蒸發兩次。在真空下乾燥殘餘物至恆重，隨後溶解於水(147 mL)及乙醇(885 mL)中且用鼓泡之氮氣脫氣15分鐘。將溶液轉移至壓力反應器且添加10% Pd/C漿料型87L (6.6 g，6.27 mmol)。再用乙醇(700 mL)稀釋混合物且用氫氣在80 psi下加壓16小時。過濾反應混合物，隨後添加10% Pd/C漿料型87L (6.6 g，6.27 mmol)之第二催化劑饋料，加壓混合

物至80 psi且在壓力反應器中攪拌3天。用氮氣吹掃反應混合物且經矽藻土過濾。蒸發濾液且使殘餘物分配於水(200 mL)與EtOAc (200 mL)之間。分離水層，冷卻至5℃且用氫氧化銨15% w/w中和。用EtOAc (3×150 mL)萃取水層。合併有機相，經硫酸鈉乾燥，過濾且在減壓下蒸發，得到呈淡棕色固體狀之標題化合物(47.7 g，99%，含有殘餘EtOAc)。ES/MS (m/e): 363 (M+1)。

實例1

N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺鹽酸鹽.



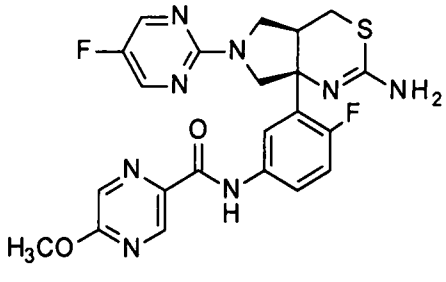
將N-[3-[(4aR,7aS)-2-苯甲醯胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺異構體1 (0.350 g，0.58 mmol)溶解於THF (2 mL)中，隨後添加甲醇(4 mL)及乙醇(4 mL)。將O-甲基羥基胺鹽酸鹽(495 mg，5.81 mmol)及吡啶(470 μL，5.81 mmol)添加至混合物中且使反應物升溫至50℃且攪拌隔夜。將矽膠(約10 g)添加至反應物中且濃縮混合物。將於矽膠上乾燥之樣品裝載於空管柱上且用0-10% 7 N氨之甲醇於DCM中的梯度溶離純化。於SCX管柱上依序使用3:1 DCM:甲醇及2:1 DCM:7 N氨之甲醇溶液第二次純化產物。最後一次經矽膠用0%至10% 7 N氨之甲醇溶液於DCM中的梯度純化產物，得到標題化合物之游離鹼。將此物質溶解於DCM (5 mL)中且添加1 M鹽酸之乙醚溶液(0.20 mL，660 μmol)。在真空中移除溶劑，得到標題化合物(71 mg，23%)。ES/MS (m/e): 498 (M+H)。

X射線粉末繞射(XRD)

在配備有CuKα源(λ=1.54060 Å)及Vantec偵測器且在35 kV及50 mA下操作的Bruker D4 Endeavor X射線粉末繞射儀上獲得結晶固體之XRD圖。樣品以2θ在4°與40°之間掃描，其中2θ之步長為0.009°且掃描速率為0.5秒/步，且發散度為為0.6 mm，固定抗散射性為5.28，且偵測器狹縫為9.5 mm。將乾燥粉末裝填於石英樣品固持器中且使用玻璃載片獲得光滑表面。在環境溫度及相對濕度下收集結晶形式繞射圖。結晶學技術中已熟知，對於任何既定結晶形式，由於由諸如晶體形態及習性之因素所產生之較佳取向，繞射峰之相對強度可能變化。在存在較佳取向之影響的情況下，峰強度改變，但多晶型物之特徵峰位置不變。參見例如The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, 第1843-1844頁, 1995。此外，結晶學技術中亦熟知，對於任何既定結晶形式，角峰位置可略微變化。舉例而言，峰位置可能由於分析樣品時之溫度或濕度變化、樣品移位或內標存在或不存在而偏移。在本發明之情況下，2θ之± 0.2之峰位置變化將考慮此等潛在變化而不妨礙明確鑑別指定結晶形式。結晶形式之確認可基於區別性峰，通常為更顯著之峰(以°2θ為單位)之任何獨特組合來進行。在環境溫度及相對濕度下收集之結晶形式繞射圖基於8.853及26.774 °2θ之NIST 675標準峰調節。

實例1a

結晶形式1 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺



將N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺(201 mg，403.20 μmole)與4 mL乙酸丁酯混合且於120℃攪拌盤上攪拌。約5分鐘後固體溶解，得到透明無色溶液。隨後冷卻樣品至室溫且白色固體自溶液沈澱。隨後在室溫下將樣品製成漿液歷時10分鐘，得到白色固體之濃稠漿液。藉由真空過濾分離白色固體且在空氣流下乾燥5分鐘。將白色固體之所得濾餅置於60℃真空烘箱中之配衡小瓶中度過週末，得到標題化合物(110 mg)。結晶形式1 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺在室溫下為穩定結晶形式且相對濕度小於約15%。

實例1b

結晶形式2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺(水合)

將乙二醯氯(888 μL，10.2 mmol)添加至5-甲氧基吡嗪-2-甲酸(1.6 g，10.2 mmol)於乙腈(53 mL)及DMF (848 μL)中之溶液中。15分鐘後，將新鮮製備之溶液添加至(4aR,7aS)-7a-(5-胺基-2-氟苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-胺(2.65 g，7.3 mmol)於水(53 mL)及乙醇(53 mL)之在50℃下預熱之混合物中之溶液中。在50℃下攪拌反應混合物一小時，冷卻至22℃，隨後在此溫度下攪拌隔夜。在真空下蒸發有機溶劑且用氫氧化鈉50% w/w水溶液處理水性混合物以調節pH=10。分離淺奶油色固體且再用水洗滌。用異丙醇(2×)稀釋固體且蒸發溶劑。藉由矽膠層析使用胺化甲醇(2 N)/二氯甲烷之梯度純化粗物質。合併含有所要產物之溶離份且蒸發溶劑，得到呈灰白色固體狀之標題化合物(1.9 g，52%)。ES/MS (m/e): 499

(M+1)。

結晶形式2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺(水合)之替代性製法

將乙腈(500 mL)添加至DMF(19.2 mL，248.9 mmol)中。依序將乙二醛氯(39.3 g，309.63 mmol)及5-甲氧基吡嗪-2-甲酸(46.0 g，298.4 mmol)添加至DMF/乙腈溶液中。在各別燒瓶中，將(4aR,7aS)-7a-(5-胺基-2-氟苯基)-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-胺(56.8 g，156.75 mmol)之水溶液添加至乙腈(500 mL)中且用氫氧化銨(95 mL)調節pH值至9。隨後將此混合物加熱至50-55℃。逐滴添加乙二醛氯溶液且攪拌混合物3小時。用氫氧化銨調節pH值至8-9。過濾所得沈澱物，用水洗滌且乾燥，獲得標題化合物(123 g)。將固體於丙酮(250 mL)中製成漿液歷時1.5小時且過濾。用丙酮洗滌濕濾餅，獲得標題化合物(110 g，藉由HPLC發現純度為90.5%)。將THF (1 L)及活性碳(9 g)添加至固體中且加熱混合物至回流隔夜。經由矽藻土過濾混合物且用THF (150 mL)洗滌。濃縮有機溶液至10份體積且加熱至60℃。添加水(430 mL)且在60℃下攪拌混合物8小時。冷卻混合物至室溫且攪拌10小時。過濾所得固體，用THF/水(7:6)洗滌且乾燥，得到標題化合物(69 g，88%)，LC-MS：m/z=499 (M+1)，純度：98.3%。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 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)。

製備結晶形式2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺

(水合)之通用程序

在約23℃下以約71 mg/mL溶劑之濃度將N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺於THF中製成漿液。在攪拌下加熱漿液至溶解，其發生在約60℃至約63℃下。向熱溶液添加水以提供約95:5之THF:水溶劑比率。添加形式2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之晶種(約3重量%負載)。將所得稀漿液保持在約60℃至約63℃下約20分鐘，繼而經約2至約4小時添加約5.3至約5.5份體積水，得到約69:31之THF:水溶劑比率。隨後將漿液保持在約60℃至約63℃下約30分鐘，隨後經約1小時冷卻至約23℃，隨後攪拌約8-12小時。隨後過濾漿液，用THF:水(35:65)輕輕沖洗且在約40℃下在減壓真空下乾燥約8-12小時，得到所要結晶形式2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺水合物。

結晶形式2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之製備樣品藉由XRD圖使用CuKa輻射表徵為具有如下表1中所述之繞射峰(2-θ值)。特定言之，圖案含有11.8°處之峰以及一或多個選自由18.6°、19.3°及26.7°組成之群的峰；其中繞射角公差為0.2度。

表1：實例1b之結晶形式2的X射線粉末繞射峰.

峰	角 (2-θ°) +/-0.2°	相對強度 (最強峰之%)
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

結晶形式2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺在室溫下為穩定結晶形式且相對濕度大於約15%。

實例1c

結晶形式3 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺.

將N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺裝載於熱解重量分析盤上，加熱至約170℃且在170℃下保持約5分鐘。冷卻至室溫，得到標題化合物。

結晶形式3 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之替代性製法。

將N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺(121 mg)與乙腈(5 mL)於小瓶中組合且於90℃攪拌盤上加熱。約30分鐘後，大多數固體溶解，得到混濁溶液。添加形式3晶種且在約90℃下攪拌樣品約1小時。移除加熱且攪拌混合物，得到亮白色固體。藉由真空過濾分離固體，在空氣流下乾燥約10分鐘，隨後在約80℃下在減壓之真空下乾燥約8至12小時，得到標題化合物。

結晶形式3 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之製備樣品藉由XRD圖使用CuKa輻射表徵為具有如下表2中所述之繞射峰(2-θ值)。特定言之，圖案含有15.7°處之峰以及一或多個選自由

18.1°、27.0°及19.7°組成之群的峰；其中繞射角公差為0.2度。

表2：實例1c之結晶形式3的X射線粉末繞射峰。

峰	角 (2-θ°) +/-0.2°	相對強度 (最強峰之%)
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

活體外分析程序：

為進行活體外酶學及細胞分析，於DMSO中製備測試化合物以製成10 mM儲備溶液。在進行活體外酶學及全細胞分析前，用DMSO連續稀釋儲備溶液，獲得十點稀釋曲線，其中在96孔圓底盤中最終化合物濃度在10 mM至0.05 nM範圍內。

活體外蛋白酶抑制分析：

人類BACE1之表現

藉由RT-PCR自總腦cDNA選殖人類BACE1（寄存編號：AF190725)。將對應於胺基酸序列#1至460之核苷酸序列插入編碼人類IgG_1 (Fc)多肽之cDNA中(Vasser等人, *Science*, **286**, 735-741 (1999))。將BACE1(1-460)及人類Fc之此融合蛋白(稱為*hu*BACE1:Fc)建構於pJB02載體中。將人類BACE1(1-460):Fc (*hu*BACE1:Fc)短暫表現於HEK293細胞中。將各構築體之250 μg cDNA與Fugene 6混合且添加至1公升HEK293細胞中。轉染後四天，收集條件培養基進行純化。

*hu*BACE1:Fc之純化

藉由蛋白A層析純化*hu*BACE1:Fc。以小等分試樣在-80℃下儲存酶。

BACE1 FRET分析

如上所述製備測試化合物之連續稀釋液。進一步用KH_2PO_4緩衝液20倍稀釋化合物。將10 μL各稀釋液添加至含有反應混合物(25 μL 50 mM KH_2PO_4，pH 4.6，1 mM TRITON® X-100，1 mg/mL牛血清白蛋白及15 μM FRET受質)之相應低蛋白質結合黑色盤之A至H列上的各孔中(參見Yang等人, *J. Neurochemistry*, **91**(6) 1249-59 (2004))。將內含物在盤震盪器上充分混合10分鐘。將15 μL 200 pM人類BACE1(1-460):Fc (參見Vasser等人, *Science*, **286**, 735-741 (1999))於KH_2PO_4緩衝液中之溶液添加至含有受質及測試化合物之盤中以引發反應。在於盤震盪器上短暫混合後，在激發波長355 nm及發射波長460 nm下記錄時間0時混合物之RFU。用鋁箔覆蓋反應盤且在室溫下保持於黑暗潮濕烘箱中16至24小時。在培育結束時記錄RFU，其中激發及發射設定與時間0時所用相同。時間0時與培育結束時之差值表示在化合物處理下BACE1之活性。相對於抑制劑濃度繪製RFU差值，且將曲線擬合四參數對數方程式，獲得EC_{50}及IC_{50}值。(參見Sinha等人, *Nature*, **402**, 537-540 (2000))。

實例1之化合物基本上如上所述進行測試且展現0.615 nM (± 0.101, n=5)之BACE1 IC_{50} [平均值±SEM；SEM=平均值之標準誤差]。此資料展現實例1化合物在活體外抑制經純化重組BACE1酶活性。

PDAPP原代神經元分析

亦在自PDAPP轉殖基因胚胎小鼠產生的原代神經元培養物中進行確認性全細胞分析。自第16天胚胎之PDAPP胚胎製備原代皮層神經元且於96孔盤(15×10^4個細胞/孔，於DMEM/F12 (1:1)加上10% FBS中)中培養。活體外2天後，將培養基用不含血清且含有B27補充劑及2 μM(最終)Ara-C (Sigma，C1768)之DMEM/F12 (1:1)替換。在活體外第5天，在37℃下在所要濃度之抑制劑(用DMSO稀釋)存在/不存在下培

育神經元24小時。在培育結束時，分析條件培養基以證明β-分泌酶活性，例如藉由分析Aβ肽來證明。藉由夾心ELISA使用單株266作為捕捉抗體且使用經生物素標記之3D6作為報導抗體量測總Aβ肽(Aβ 1-x)。或者，藉由夾心ELISA使用單株2G3作為Aβ 1-40之捕捉抗體且使用單株21F12作為Aβ 1-42之捕捉抗體量測Aβ 1-40及Aβ 1-42肽。Aβ 1-40與Aβ 1-42 ELISA均使用經生物素標記之3D6作為報導抗體。化合物處理後條件培養基中所釋放之Aβ之濃度對應於此類條件下BACE1之活性。繪製10點抑制曲線且擬合四參數對數方程式，獲得針對Aβ降低作用之EC_{50}及IC_{50}值。實例1之化合物基本上如上所述測試且對Aβ降低作用展現以下活性：

表3

實例	PDAPP神經元A-β (1-40) ELISA IC_{50} (nM)	PDAPP神經元A-β (1-42) ELISA IC_{50} (nM)
1	0.275 (± 0.176, n=4)	0.228 (± 0.244, n=3)

平均值±SEM；SEM=平均值之標準誤差

此等資料展示實例1之化合物抑制全細胞中之Aβ產生。

活體內抑制β分泌酶

可使用數種動物模型(包括小鼠、天竺鼠、狗及猴)篩檢化合物處理後活體內對β分泌酶活性之抑制。本發明中所用動物可為野生型、轉殖基因或基因剔除動物。舉例而言，如Games等人, *Nature* **373**, 523-527 (1995)中所述製備之PDAPP小鼠模型及其他非轉殖基因或基因剔除動物適用於分析在抑制化合物存在下對Aβ及sAPPβ產生之活體內抑制。一般而言，向2至12個月齡之PDAPP小鼠、基因剔除小鼠或非轉殖基因動物投與在媒劑中調配之化合物，該等媒劑諸如玉米油、環葡聚糖、磷酸鹽緩衝液、PHARMASOLVE®或其他適合媒劑。投與化合物後一至二十四小時，處死動物且移出腦以及腦脊髓液及血漿以供Aβ、C99及sAPP片段分析。(參見May等人, *Journal of Neuroscience*,

31, 16507-16516 (2011))。

為進行標準活體內藥理學研究，給與動物各種濃度之化合物，且與經媒劑處理之同時給與之對照組比較。為進行某段時程研究，自所選動物獲得腦組織、血漿或腦脊髓液，該等研究在時間0時開始以建立基線。投與其他組化合物或適當媒劑且在給藥後之各種時間處死。自所選動物獲得腦組織、血漿或腦脊髓液且例如藉由特定夾心ELISA分析來分析APP裂解產物(包括Aβ肽、sAPPβ及其他APP片段)之存在。在測試階段結束時，處死動物且按需要分析腦組織、血漿或腦脊髓液中Aβ肽、C99及sAPPβ之存在。亦可分析化合物處理後APP轉殖基因動物之腦組織中β澱粉樣斑塊之量。如本文所用之「Aβ 1-x肽」係指以殘基1開始且以大於殘基28之C端封端的Aβ物質之總和。此偵測大部分Aβ物質且通常稱為「總Aβ」。

相較於媒劑處理之對照或時間零時對照，投與抑制性化合物之動物(PDAPP或其他APP轉殖基因或非轉殖基因小鼠)可展示腦組織、血漿或腦脊髓液中Aβ或sAPPβ減少及腦組織中β澱粉樣斑塊減少。對於實例1，投與0.3、1或3 mg/kg經口劑量之化合物後3小時，相較於媒劑處理小鼠，分別地，Aβ 1-x肽含量在腦海馬區中降低約31%、39%及61%，且在腦皮質中降低約28%、42%及64%。

給定活體外實例1對BACE酶之活性的情況下，此等Aβ降低作用與活體內BACE抑制一致，且進一步展示N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺之CNS滲透。

此等研究展示本發明化合物抑制BACE，因此適用於降低Aβ含量。

【圖式簡單說明】

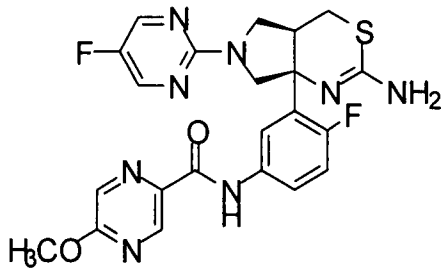
無

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種下式之化合物，



其為結晶型。

2. 如請求項1之結晶型化合物，其為形式2 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺。

3. 如請求項1或2之結晶型化合物，其特徵為在X射線繞射光譜之繞射角2-θ 11.8°處具有大峰，以及具有一或多個選自由18.6°、19.3°及26.7°組成之群的峰；其中繞射角公差為0.2度。

4. 如請求項1之結晶型化合物，其為形式1 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺。

5. 如請求項1之結晶型化合物，其為形式3 N-[3-[(4aR,7aS)-2-胺基-6-(5-氟嘧啶-2-基)-4,4a,5,7-四氫吡咯并[3,4-d][1,3]噻嗪-7a-基]-4-氟-苯基]-5-甲氧基-吡嗪-2-甲醯胺。

6. 如請求項1或5之結晶型化合物，其特徵為在X射線繞射光譜之繞射角2-θ 15.7°處具有大峰，以及具有一或多個選自由18.1°、27.0°及19.7°組成之群的峰；其中繞射角公差為0.2度。

7. 如請求項1、2、4及5中任一項之化合物，其用於療法中。

8. 如請求項1、2、4及5中任一項之化合物，其用於治療阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)。

9. 如請求項1、2、4及5中任一項之化合物，其用於預防輕度認知障礙發展為阿茲海默氏病。

10. 一種如請求項1至6中任一項之化合物的用途，其用於製造供治療阿茲海默氏病之藥物。

11. 一種如請求項1至6中任一項之化合物的用途，其用於製造供預防輕度認知障礙發展為阿茲海默氏病的藥物。

12. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至6中任一項之化合物以及一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。