



MD/EP 3288949 T2 2020.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3288949 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07D 513/04 (2006.01.01)
A61K 31/542 (2006.01.01)
A61P 25/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0225 (22) Data de depozit: 2016.04.22 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16719728.4, 2016.04.22 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3288949, 2019.11.06 (31) Numărul cererii prioritare: 201562154242 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.04.29 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2020, 2020.03.31 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 45/2019, 2019.11.06 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2018, 2018.04.30
(71) Solicitant: Eli Lilly and Company, US (72) Inventatori: REMICK David Michael, US; RICHARDS Simon James, US; SANDERSON Adam Jan, US (73) Titular: Eli Lilly and Company, US (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Derivați de aminohidrothiazină fuzionați cu tetrahidrofuran utili în tratamentul bolii Alzheimer

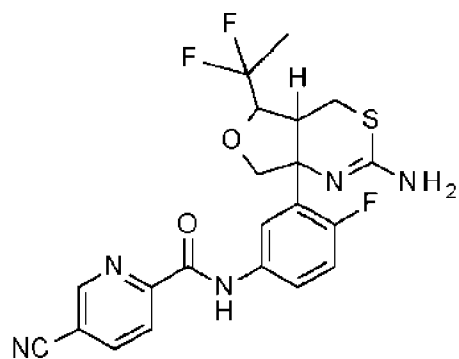
(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I: sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

2

MD/EP 3288949 T2 2020.03.31



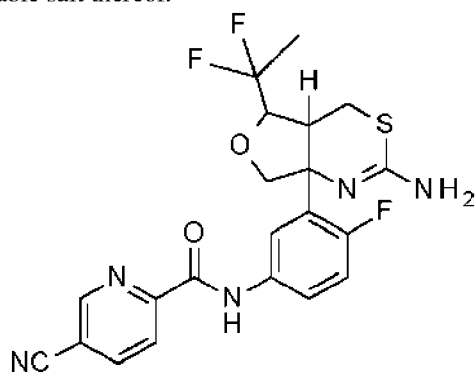
Formula 1

Revendicări: 17

(54) Tetrahydrofurane-fused aminohydrothiazine derivatives which are useful in the treatment of Alzheimer's disease

(57) Abstract:

The present invention provides a compound of Formula I: or a pharmaceutically acceptable salt thereof.



Formula 1

Claims: 17

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

Prezenta invenție se referă la noi inhibitori selectivi ai BACE1, la compoziții farmaceutice cuprinzând compuși, la compuși pentru utilizare în tratamentul tulburărilor fiziologice, și la intermediari și procedee utile în sinteza compușilor.

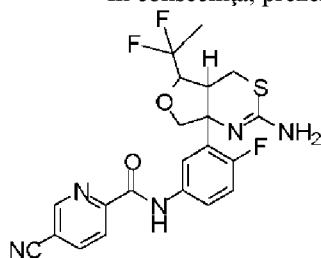
Prezenta invenție este în domeniul tratamentului bolii Alzheimer și al altor boli și tulburări care implică peptida amiloid β (Abeta), un segment peptidic neurotoxic și foarte agregant al proteinei precursora a amiloidului (APP). Boala Alzheimer este o tulburare neurodegenerativă devastatoare care afectează milioane de pacienți în întreaga lume. Având în vedere agenții aprobați în prezent pe piață care oferă pacientului numai beneficii tranzitorii, simptomatice, mai degrabă decât oprirea, încetinirea, sau inversarea bolii, există o necesitate semnificativă nesatisfăcută în tratamentul bolii Alzheimer.

Boala Alzheimer este caracterizată de generarea, agregarea, și depunerea de Abeta în creier. S-a arătat că inhibarea completă sau parțială a β -secretazei (enzima de clivare a proteinei precursora a amiloidului la situsul β ; BACE) are un efect semnificativ asupra patologiilor legate de placă și dependente de placă în modelele la șoarece sugerând că chiar și reduceri mici ale nivelurilor de peptidă Abeta ar putea conduce la o reducere semnificativă pe termen lung a poverii plăcii și a deficitelor sinaptice, furnizând astfel beneficii terapeutice semnificative, în special în tratamentul bolii Alzheimer. În plus, au fost identificate două omoloage ale BACE care sunt menționate ca BACE1 și BACE2, și se crede că BACE1 este cea mai importantă clinic în dezvoltarea bolii Alzheimer. BACE1 este exprimată în principal în neuroni în timp ce BACE2 s-a arătat că este exprimată în primul rând la periferie (Vezi D. Oehlrich, Bioorg. Med. Chem. Lett., 24, 2033-2045 (2014)). În plus, BACE2 poate fi importantă în pigmentare deoarece a fost identificată ca jucând un rol în procesarea proteinei melanocitare specifice celulelor pigmentare (Vezi L. Rochin, și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. SUA, 110(26), 10658-10663 (2013)). Inhibitorii BACE care penetrează sistemul nervos central (SNC), în special inhibitorii care sunt selectivi pentru BACE1 față de BACE2, sunt doriți în furnizarea tratamentelor pentru tulburările mediate de peptida Abeta, cum ar fi boala Alzheimer.

Brevetul Statelor Unite nr. 8.158.620 divulgă derivați de aminodihidrotiazină fuzionată care posedă activitate inhibitoare a BACE1 și sunt divulgați mai departe ca agenți terapeutici utili pentru o boală neurodegenerativă cauzată de peptida Abeta, cum ar fi demența de tip Alzheimer. În plus, Brevetul Statelor Unite nr. 8.338.407 divulgă anumiți derivați de aminodihidrotiazină fuzionată având efect inhibitor al BACE1 utili în tratarea anumitor boli neurodegenerative, cum ar fi demența de tip Alzheimer. JP 2014/101354 A divulgă compuși având acțiune inhibitoare a producției de Abeta și activitate inhibitoare a BACE1.

Prezenta invenție furnizează anumiți compuși noi care sunt inhibitori ai BACE. În plus, prezenta invenție furnizează anumiți compuși noi care sunt inhibitori selectivi ai BACE1 față de BACE2. Mai mult, prezenta invenție furnizează anumiți compuși noi care penetrează SNC. Prezenta invenție furnizează de asemenea anumiți compuși noi care au potențialul pentru un profil îmbunătățit al efectului secundar, de exemplu, prin inhibarea selectivă a BACE1 față de BACE2.

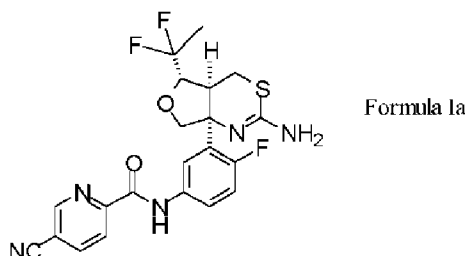
În consecință, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I:



Formula I

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

În plus, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula Ia:



Formula Ia

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I sau Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în inhibarea BACE la un pacient. Prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I sau Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în inhibarea clivării mediate de BACE a proteinei precursora a amiloidului. Invenția furnizează un compus cu Formula I sau Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în inhibarea producției de peptidă Abeta.

Prezenta invenție furnizează de asemenea un compus cu Formula I sau Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia pentru utilizare în terapie, în particular pentru tratamentul bolii Alzheimer sau pentru prevenirea progresului deprecierei cognitive ușoare către boala Alzheimer. Chiar mai mult, această invenție furnizează utilizarea unui compus cu Formula I sau Ia, sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acestuia, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul bolii Alzheimer.

Invenția mai furnizează o compoziție farmaceutică, cuprinzând un compus cu Formula I sau Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic. Invenția mai furnizează un procedeu pentru prepararea unei compoziții farmaceutice, cuprinzând amestecarea unui compus cu Formula I sau Ia, sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acestuia, cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic. Această invenție de asemenea cuprinde noi intermediari și procedee pentru sinteza compușilor cu Formulele I și Ia.

Deprecierea cognitivă ușoară a fost definită ca o potențială fază prodromală a demenței asociate cu boala Alzheimer pe baza prezentării clinice și a progresului pacienților care prezintă deprecierea cognitivă ușoară către demența Alzheimer în timp. (Morris, și colab., Arch. Neurol., 58, 397-405 (2001); Petersen, și colab., Arch. Neurol., 56, 303-308 (1999)). Termenul „prevenirea progresului deprecierei cognitive ușoare către boala Alzheimer” include restricționarea, încetinirea, oprirea, sau inversarea progresului deprecierei cognitive ușoare către boala Alzheimer la un pacient.

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenii „tratare” sau „a trata” includ restricționarea, încetinirea, oprirea, sau inversarea progresului sau severității unui simptom existent sau tulburări.

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „pacient” se referă la un om.

Termenul „inhibarea producției de peptidă Abeta” este menit să însemne scăderea nivelurilor *in vivo* ale peptidei Abeta la un pacient.

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „cantitate eficientă” se referă la cantitatea sau doza de compus al invenției, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care, după administrarea unei singure doze sau a mai multora la pacient, furnizează efectul dorit la pacientul aflat sub diagnostic sau tratament.

O cantitate eficientă poate fi determinată cu ușurință de diagnostician, ca o persoană calificată în domeniu, prin utilizarea tehnicilor cunoscute și prin observarea rezultatelor obținute în circumstanțe analoge. În determinarea cantității eficiente pentru un pacient, sunt luați în considerație un număr de factori de către diagnostician, incluzând, dar fără limitare la: specia pacientului; dimensiunea sa, vârsta, și sănătatea generală; boala sau tulburarea specifică implicată; gradul sau implicarea sau severitatea bolii sau tulburării; răspunsul pacientului individual; compusul particular administrat; modul de administrare; caracteristicile de biodisponibilitate ale preparatului administrat; regimul de dozare selectat; utilizarea medicației concomitente; și alte circumstanțe relevante.

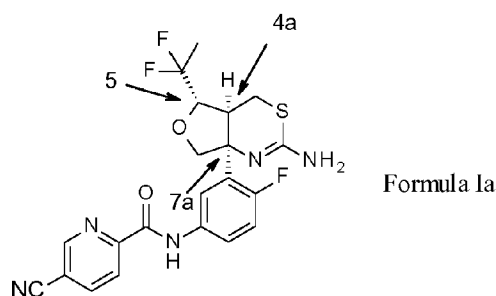
Compușii prezentei invenții sunt în general eficienți într-un interval larg de dozare. De exemplu, dozajele pe zi cad în mod normal în intervalul de aproximativ 0,01 până la aproximativ 20 mg/kg din greutatea corporală. În unele cazuri nivelurile dozajului sub limita inferioară a intervalului menționat mai sus pot fi mai mult decât adecvate, în timp ce în alte cazuri pot fi utilizate doze încă mai mari cu efecte secundare acceptabile, și prin urmare intervalul de dozare de mai sus nu este intenționat să limiteze scopul invenției în nici un fel.

Compușii prezentei invenții sunt formulați preferabil precum compoziții farmaceutice administrate pe orice cale care face compusul biodisponibil, incluzând căile orală și transdermală. Cel mai preferabil, astfel de compoziții sunt pentru administrare orală. Astfel de compoziții farmaceutice și procedee pentru prepararea lor sunt bine cunoscute în domeniu. (Vezi, de exemplu, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, L.V. Allen, Editor, ediția a 22-a, Pharmaceutical Press, 2012).

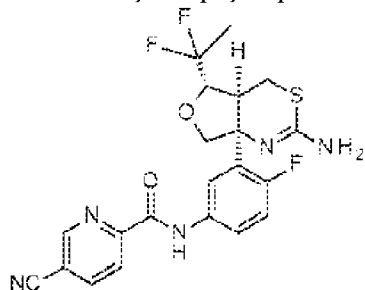
Compușii cu Formulele I și Ia, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora sunt utili în special în utilizările terapeutice ale invenției, dar sunt preferate anumite grupări, substituenți, și configurații. Următoarele paragrafe descriu astfel de grupări, substituenți, și configurații preferate. Se va înțelege că aceste preferințe sunt aplicabile atât utilizărilor terapeutice cât și compușilor noi ai invenției.

Astfel, compusul cu Formula I în care inelul biciclic fuzionat este în configurația *cis*, sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia, este preferat. De exemplu, cineva având calificare obișnuită în domeniu va aprecia că compusul cu Formula Ia este în configurația relativă de *cis* pentru centrele etichetate 4a și 7a așa cum se arată în Schema A mai jos. În plus, configurația relativă preferată pentru cei trei centri chirali ai Formulei Ia este prezentată în Schema A în care substituentul difluoroetil de la poziția 5 este în configurația *cis* față de hidrogenul de la poziția 4a și substituentul de fenil substituit de la poziția 7a:

Schema A



Alți compuși ai prezentei invenții includ:



și săruri acceptabile farmaceutic ale acestuia.

Deși prezenta invenție are în vedere toți enantiomerii și diasteromerii individuali, precum și amestecuri ale enantiomerilor compușilor menționați, incluzând racemații, sunt preferați în mod special compușii cu configurația absolută stabilită mai jos:

N-[3-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă, și sărurile acceptabile farmaceutic ale acesteia.

În plus, N-[3-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă;

metansulfonat de N-[3-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă;

4-metilbenzensulfonat de N-[3-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă; și

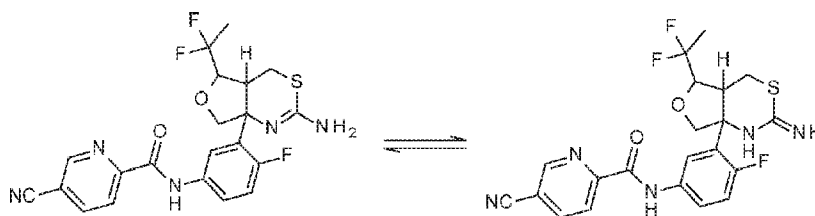
4-metilbenzensulfonat hemihidrat de N-[3-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă, sunt preferate în mod special.

4-metilbenzensulfonat de N-[3-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă; și

4-metilbenzensulfonat hemihidrat de N-[3-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă sunt în mod special cele mai preferate.

Cineva având calificare obișnuită în domeniu va aprecia că compușii invenției pot exista sub forme tautomerice, așa cum s-a reprezentat mai jos în Schema B. Atunci când se face referire în această cerere la unul dintre tautomerii specifici ai compușilor invenției, se înțelege că cuprinde atât formele tautomerice cât și toate amestecurile acestora.

Schema B



5

Suplimentar, anumiți intermediari descriși în preparările următoare pot conține una sau mai multe grupări de protecție ale azotului. Se înțelege că grupările de protecție pot fi variate după cum se apreciază de către o persoană calificată în domeniu în funcție de condițiile de reacție particulare și transformările particulare care trebuie efectuate. Condițiile protejării și deprotejării sunt bine cunoscute specialistului calificat și sunt descrise în literatură (Vezi de exemplu „Greene's Protective Groups in Organic Synthesis”, ediția a patra, de Peter G.M. Wuts și Theodora W. Greene, John Wiley & Sons, Inc. 2007).

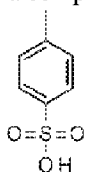
Izomerii, enantiomerii, și diastereomerii individuali pot fi separați sau reduși de cineva având calificare obișnuită în domeniu la orice punct convenabil din sinteza compușilor invenției, prin metode cum ar fi tehnicile de cristalizare selectivă sau cromatografia chirală (Vezi de exemplu, J. Jacques, și colab., „Enantiomers, Racemates, and Resolutions”, John Wiley & Sons, Inc., 1981, și E.L. Eliel și S.H. Wilen, „Stereochemistry of Organic Compounds”, Wiley-Interscience, 1994).

O sare acceptabilă farmaceutic a compușilor invenției, cum ar fi o sare de clorhidrat, poate fi formată, de exemplu, prin reacția unei baze libere adecvate a unui compus al invenției, cu un acid acceptabil farmaceutic adecvat cum ar fi acid clorhidric într-un solvent adecvat cum ar fi dietil eter în condiții standard bine cunoscute în domeniu. Suplimentar, formarea unor astfel de săruri poate avea loc simultan după deprotejarea unei grupări de protecție a azotului. Formarea unor astfel de săruri este bine cunoscută și apreciată în domeniu. Vezi, de exemplu, Gould, P.L., „Salt selection for basic drugs”, International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., și colab. „Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities”, Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000); și Berge, S.M., și colab., „Pharmaceutical Salts”, Journal of Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19, (1977).

Anumite abrevieri sunt definite după cum urmează: „APP” se referă la proteina precursoră a amiloidului; „BSA” se referă la Albumină din ser bovin; „CDI” se referă la 1,1'-carbonildiimidazol; „ADNc” se referă la acid dezoxiribonucleic complementar; „DAST” se referă la trifluorură de dietilaminosulf; „DCC” se referă la 1,3-diciclohexilcarbodiimidă; „DIC” se referă la 1,3-diizopropilcarbodiimidă; „DIPEA” se referă la N,N-diizopropiletilamină; „DMAP” se referă la 4-dimetilaminopiridină; „DMSO” se referă la dimetil sulfoxid; „EBSS” se referă la Soluție salină echilibrată Earle; „EDCI” se referă la clorhidrat de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimidă; „ELISA” se referă la testul cu imunosorbent legat de enzimă; „F12” se referă la mediul F12 al lui Ham; „FBS” se referă la Ser fetal bovin; „Fc” se referă la fragment cristalizabil; „FLUOLEAD™” se referă la trifluorură de 4-terț-butil-2,6-dimetilfenilsulf; „FRET” se referă la transferul de energie prin rezonanță fluorescentă; „HATU” se referă la hexafluorofosfat de (dimetilamino)-N,N-dimetil(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]-piridin-3-iloxi)metaniminiu; „HBTU” se referă la hexafluorofosfat de (1H-benzotriazol-1-iloxi)(dimetilamino)-N,N-dimetilmetaniminiu; „HEK” se referă la rinichi embrionar uman; „HF-piridină” se referă la fluorură acidă de piridină sau reactiv Olah sau poli(fluorură de piridină); „HOBT” se referă la hidrat de 1-hidroxilbenzotriazol; „IC₅₀” se referă la concentrația unui agent care produce 50% din răspunsul inhibitor maxim posibil pentru acel agent; „HRP” se referă la peroxidază din hrean; „IgG₁” se referă la receptorul gama al domeniului Fc asemeni imunoglobulinei; „MBP” se referă la proteină cu legare la maltoză; „MEM” se referă la Mediu esențial minim; „PBS” se referă la soluție salină tamponată cu fosfat; „PDAPP” se referă la proteină precursoră a amiloidului derivată din trombocite; „PyBOP” se referă la (hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-oxitripirolidinofosfoniu); „PyBrop” se referă la bromo(tri-pirolidinil)fosfonihexafluorofosfat; „RFU” se referă la unitatea de fluorescență relativă; „RT-PCR” se referă la reacția în lanț mediată de polimerază cu transcripție

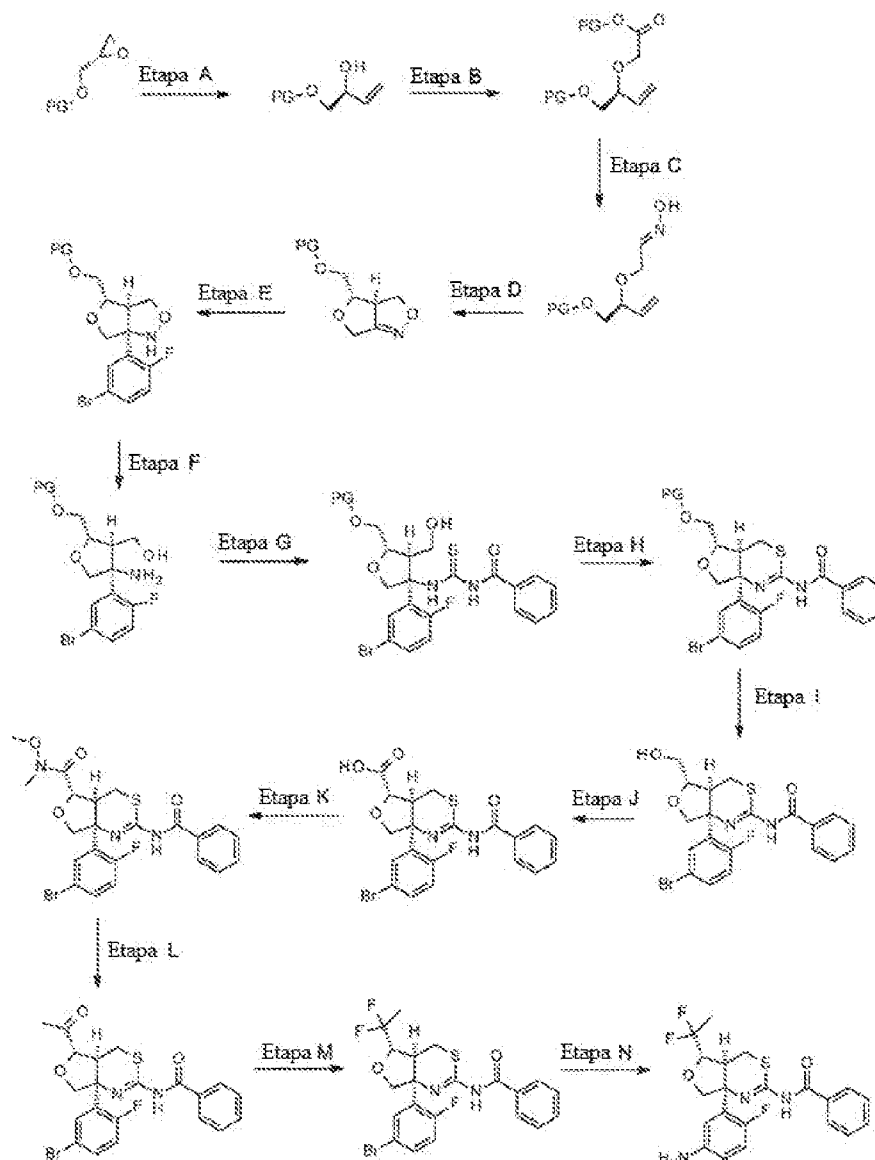
inversă; „SDS-PAGE” se referă la electroforeza în gel de poliacrilamidă cu dodecil sulfat de sodiu; „THF” se referă la tetrahidrofuran; „TMB” se referă la tetrametilbenzidină; „TMEM” se referă la proteina transmembranară; „Tris” se referă la tris(hidroximetil)aminometan; „tritol” se referă la o grupare cu formula „(Ph)₃C-”; „XRD” se referă la Difrakția în pulbere cu raze X; „XtalFluor-E®” sau sare de difluorosulfiniu DAST” se referă la tetrafluoroborat de (dietilamino)difluorosulfoniu sau tetrafluoroborat de *N,N*-dietil-*S,S*-difluorosulfiliminiu; și „XtalFluor-M®” sau sare de difluorosulfiniu morfo-DAST” se referă la tetrafluoroborat de difluoro(morfolino)sulfo-niu sau tetrafluoroborat de difluoro-4-morfolinilsulfoniu.

Se înțelege de către o persoană având calificare obișnuită în domeniu că termenii „tosilat”, „acid toluensulfonic”, „acid p-toluensulfonic”, și „acid 4-metilbenzen sulfonic” se referă la compusul cu următoarea structură:



Compușii prezentei invenții, sau sărurile acestora, pot fi preparați printr-o varietate de proceduri cunoscute cuiva având calificare obișnuită în domeniu, unele dintre acestea fiind ilustrate în schemele, preparările, și exemplele de mai jos. O persoană având calificare obișnuită în domeniu recunoaște că etapele de sinteză specifice pentru fiecare dintre căile descrise pot fi combinate în diferite moduri, sau în conjuncție cu etape din diferite scheme, pentru a prepara compușii invenției, sau sărurile acestora. Producția fiecărei etape din schemele de mai jos pot fi recuperați prin metode convenționale bine cunoscute în domeniu, incluzând extragerea, evaporarea, precipitarea, cromatografia, filtrarea, triturarea, și cristalizarea. În schemele de mai jos, toți substituenții dacă nu este indicat altfel, sunt așa cum s-a definit anterior. Reactivii și materiile prime sunt disponibile cu ușurință cuiva având calificare obișnuită în domeniu. Fără limitarea domeniului invenției, următoarele scheme, preparări, și exemple sunt furnizate pentru a ilustra mai departe invenția.

Schema 1



- In Schema 1, etapa A, iodura de trimetilsulfoniu este tratată cu o bază organică cum ar fi n-butillitiu la o temperatură de aproximativ -50 °C într-un solvent cum ar fi THF. Un oxiran oximetil protejat, care este protejat cu o grupare de protecție adecvată, cum ar fi o grupare tritil, este apoi adăugat la soluția bazică la -10 °C și lăsat să se agite timp de aproximativ 2 ore pentru a da produsul protejat din Schema 1, Etapa A. „PG” este o grupare de protecție dezvoltată pentru gruparea amino sau gruparea de oxigen cum ar fi carbamați, amide, sau eteri. Astfel de grupări de protecție sunt bine cunoscute și apreciate în domeniu. Produsul protejat din Etapa A este pus să reacționeze cu un α-haloester cum ar fi *terf*-butoxi bromoacetat utilizând sulfat de tetra-N-butilamoniu sau alți catalizatori de transfer de fază de sare cuaternară de amoniu într-un solvent cum ar fi toluen și o bază apoasă anorganică cum ar fi hidroxid de sodiu la aproximativ temperatura camerei pentru a da compusul din Schema 1, Etapa B. Astfel de alchilări sunt bine cunoscute în domeniu. Alternativ se poate utiliza o bază cum ar fi 60% hidrură de sodiu în ulei cu solvenți cum ar fi N,N-dimetilformamidă sau THF și un interval al temperaturii de 0 până la 100 °C pentru a da produsul protejat din Etapa B. Acetatul de *terf*-butoxi carbonil este convertit la o oximă printr-o procedură în 2 etape. Un agent reducător cum ar fi hidrură de izobutilaluminu în hexani se adaugă în picătură la o temperatură de aproximativ -70 °C urmat de adăugarea în picătură a unui acid apos cum ar fi acid clorhidric la o temperatură de aproximativ -60 °C. Procesul este finalizat cu o extracție organică pentru a da materialul intermediar. Acest material este dizolvat într-un solvent organic cum ar fi diclorometan și tratat cu acetat de sodiu urmat de clorhidrat de hidroxilamină pentru a da produsul oximă din Etapa C. Produsul oximă din Schema 1, Etapa C poate fi convertit la produsul biciclic 4,5-dihidroizoxazol din Etapa D într-o ciclizare de

3+2 prin câteva metode cum ar fi utilizând o soluție apoasă de hipoclorit de sodiu sau un oxidant alternativ cum ar fi N-clorosuccinimidă și într-un solvent cum ar fi *terț*-butil metil eter, toluen, diclorometan, sau xilen la o temperatură de aproximativ 10-15 °C sau cu încălzire. Gruparea 2-fluoro, 5-bromo fenil poate fi adăugată la dihidroizoxazol prin generarea reactivului organometalic. Reactivul organometalic poate fi generat de la 4-bromo-1-fluoro-2-iodo-benzen

5 utilizand schimbul de halogen-metal cu reactivi cum ar fi n-butillitiu sau complexul clorură de izopropilmagneziu clorură de litiu și adăugarea în picătură la un interval al temperaturii de aproximativ -78 °C până la 15 °C într-un solvent cum ar fi THF. Apoi este adăugat un acid Lewis cum ar fi bor trifluorură dietil eterat pentru a da produsul din Schema 1, Etapa E.

10 Tetrahidroizoxazolul biciclic rezultat poate fi tratat cu zinc în acid acetic pentru a forma produsul cu inel deschis din Schema 1, Etapa F. O metodă alternativă pentru a deschide inelul de izoxazol utilizează Nichel Raney într-un solvent polar cum ar fi etanol sub presiune în condiții de hidrogenare. Produsul din Etapa F poate fi apoi pus să reacționeze cu izotiocianat de benzoil într-un solvent cum ar fi diclorometan sau THF la o temperatură de aproximativ 5 °C până la

15 temperatura camerei pentru a da compusul de tiouree din Etapa G. Inelul de tiazină poate fi format utilizând anhidridă trifluorometansulfonică și o bază organică cum ar fi piridină într-un solvent cum ar fi diclorometan la o temperatură de aproximativ -20 °C pentru a da produsul din Etapa H. Gruparea de protecție de hidroximetil cum ar fi o grupare tritil poate fi îndepărtată în Schema 1, Etapa I utilizand metode bine cunoscute în domeniu cum ar fi acid formic la temperatura camerei

20 pentru a da compusul din Etapa I. Hidroxi metilul poate fi oxidat până la acid carboxilic utilizând agenți oxidanți cum ar fi acid 2-iodoxibenzoic (IBX) la temperatura camerei într-un solvent cum ar fi DMSO sau prin adăugarea în porții de (diacetoxiiodo)benzen într-un solvent cum ar fi acetonitril cu agitare la o temperatură de aproximativ 5 °C pentru a da compusul din Schema 1, Etapa J. Amida Weinreb este preparată în Schema 1, Etapa K de la produsul acid din Etapa J cu adăugarea

25 de clorhidrat de N,O-dimetilhidroxilamină, o bază organică, cum ar fi trietilamină, și un reactiv de cuplare cum ar fi HATU. Amestecul este agitat la temperatura camerei pentru a da produsul din Etapa K. Alți agenți de cuplare care ar putea fi utilizați includ CDI, carbodiimide cum ar fi DCC, DIC, sau EDCI sau alte săruri de uroni sau fosfonii ale anionilor non-nucleofili, cum ar fi HBTU, PyBOP, și PyBrOP. Amida Weinreb este apoi convertită la cetonă utilizând un reactiv organometalic cum ar fi un reactiv Grignard sau un reactiv de organolitiu în Etapa L într-un

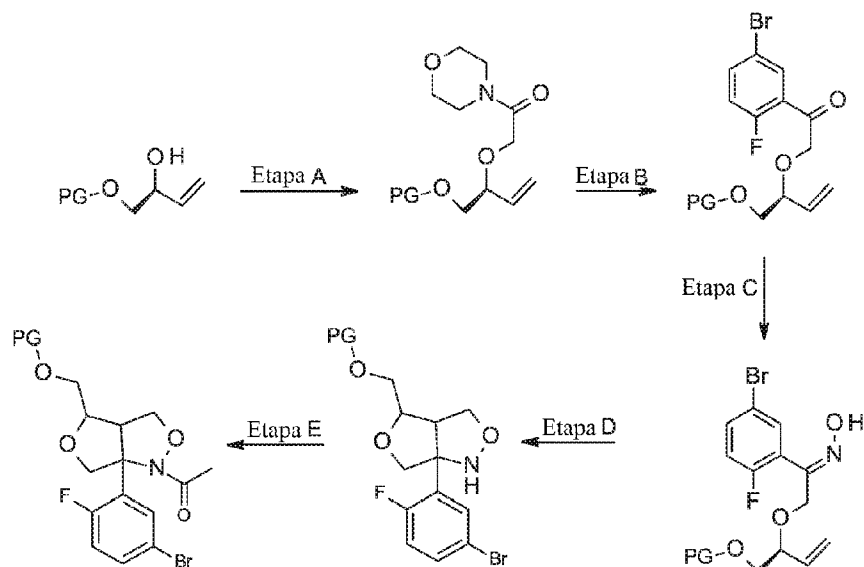
30 solvent cum ar fi THF. Mai specific, poate fi adăugată bromură de metilmagneziu ca soluție în solvenți cum ar fi eter sau 2-metiltetrahidrofuran la amida Weinreb la o temperatură de aproximativ -78 °C până la -40 °C pentru a da cetona din Etapa L. În Schema 1, Etapa M, gruparea de metil cetonă a compusului din Etapa L este convertită la o grupare de difluoroetil utilizând tetrafluoroborat de difluoro(morfolino)sulfoniu într-un solvent cum ar fi diclorometan la

35 aproximativ 0 °C urmat de adăugarea în picătură de trihidrofluorură de trietilamină și agitând la 0 °C până la temperatura camerei pentru a da compusul din Schema 1, Etapa M. Alternativ, alți agenți de fluorinare care pot fi utilizați care sunt bine cunoscuți în domeniu sunt Deoxo-Fluor®, DAST, XtalFluor-E® sau XtalFluor-M® cu un aditiv cum ar fi trietilamină tri(fluorură de

40 hidrogen) sau FLUOLEAD™ utilizand un aditiv cum ar fi HF-piridină. 5-bromo din fenil este convertit la amină utilizând (1R,2R)-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexandiamină într-un solvent cum ar fi etanol și adăugând azidă de sodiu urmată de ascorbat de sodiu și sulfat cupric. Masa de reacție este încălzită la aproximativ 80 °C timp de câteva ore și apoi procesată cu o extragere utilizând un solvent cum ar fi acetat de etil. Intermediarul este apoi redus în condiții de hidrogenare utilizând

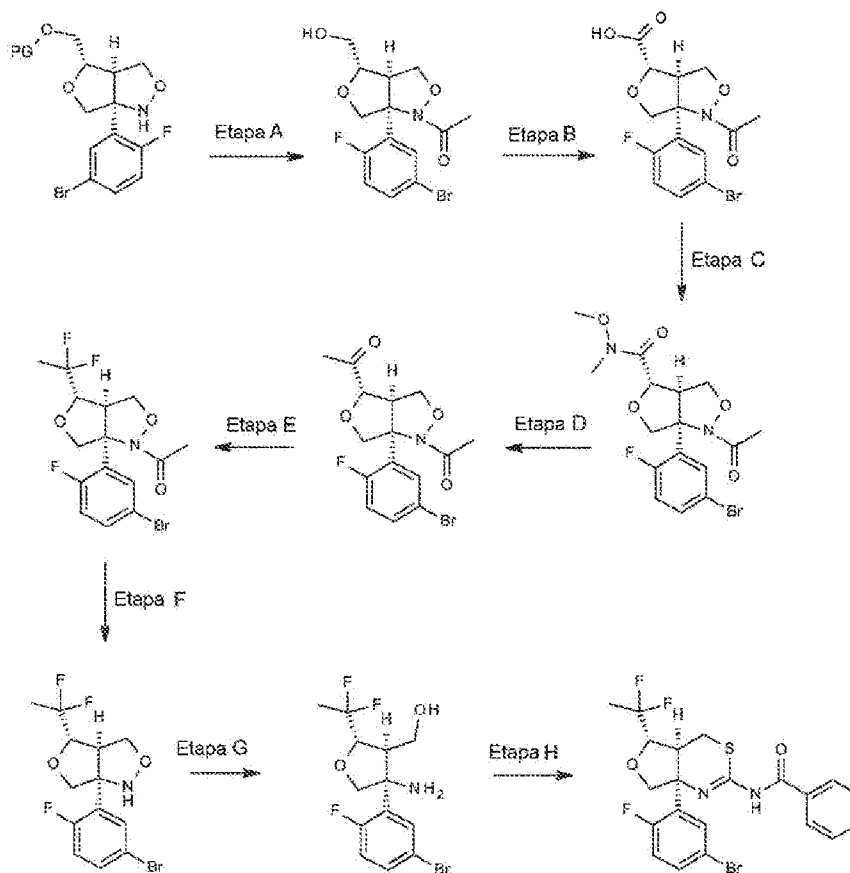
45 paladiu pe carbon cum ar fi 10% paladiu în solvenți cum ar fi etanol și THF la o presiune de aproximativ 50 psi de hidrogen pentru a da produsul de anilină din Schema 1, Etapa N.

Schema 1a



- Alternativ în Schema 1a, produsul protejat din Schema 1, Etapa A, poate fi tratat cu 4-(2-cloroacetyl)morfolino și o bază cum ar fi sulfat acid de tetrabutyl amoniu într-un solvent cum ar fi toluen la o temperatură de aproximativ 5 °C pentru a da produsul din Schema 1a, Etapa A.
- 5 Gruparea morfolino poate servi apoi ca o grupare îndepărtabilă în Schema 1a, Etapa B. De exemplu, produsul din Schema 1a, Etapa A poate fi tratat cu reactivul Grignard adecvat care poate fi preparat in situ din complexul clorură de izopropil magneziu clorură de litiu și 4-bromo-1-fluoro-2-iodobenzen sau dacă reactivul Grignard adecvat este disponibil, reactivul poate fi adăugat direct la produsul din Schema 1a, Etapa A la o temperatură de aproximativ 5 °C pentru a da
- 10 produsul din Schema 1a, Etapa B. Acetatul de carbonil poate fi convertit la o oximă cu clorhidrat de hidroxilamină și acetat de sodiu cu încălzire până la aproximativ 50 °C pentru a da produsul din Schema 1a, Etapa C. Produsul de oximă din Schema 1a, Etapa C poate fi apoi convertit la produsul din Schema 1a, Etapa D (același produs ca în Schema 1, Etapa E) utilizând hidrochinonă într-un solvent cum ar fi toluen și încălzind la reflux. Produsul de amină din Schema 1a, Etapa D poate fi
- 15 acilat cu clorură de acetyl utilizând o bază organică cum ar fi DMAP și piridină într-un solvent cum ar fi diclorometan la o temperatură de aproximativ 0-5 °C pentru a da produsul din Schema 1a, Etapa E. Produsul din Schema 1a, Etapa E poate fi apoi convertit la produsul din Schema 2, Etapa A cum s-a discutat mai jos.

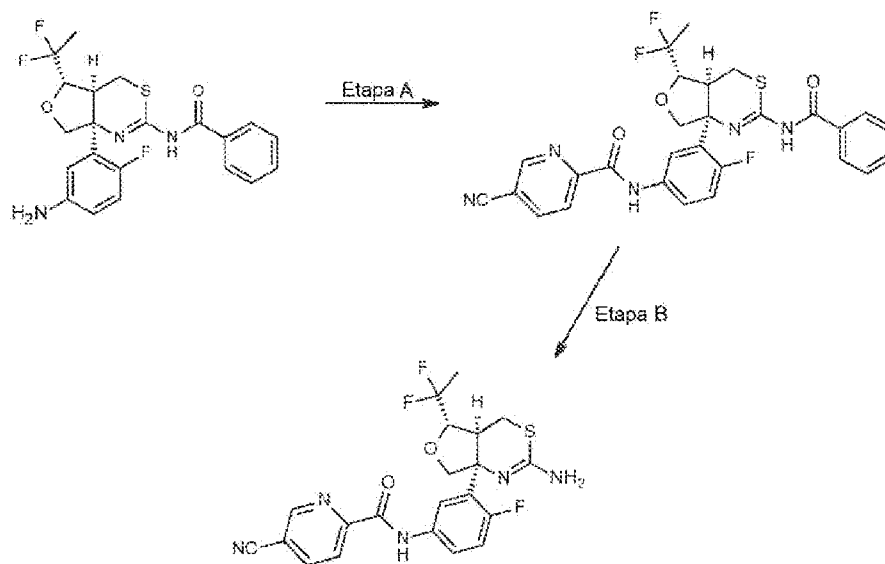
Schema 2



- Intr-o cale alternativă, cum s-a descris în Schema 2, azotul de izoxazol al compusului din Schema 1, Etapa E, este protejat cu o grupare de acetil și gruparea de protecție a hidroxi metilului este îndepărtată într-o procedură din două etape. De exemplu, tetrahidroizoxazolul este tratat cu o
- 5 bază organică cum ar fi DMAP și piridină într-un solvent cum ar fi diclorometan și se adaugă clorură de acetil. Temperatura este menținută mai jos de aproximativ 10 °C și apoi se lasă să se agite la aproximativ temperatura camerei. Reacția este diluată cu apă și extrasă cu un solvent cum ar fi diclorometan. Extractele organice sunt spălate cu un acid apos cum ar fi acid clorhidric 1 N și aposul este extras din nou cu un solvent cum ar fi diclorometan urmat de o spălare apoasă.
 - 10 Solventul organic este îndepărtat parțial și se adaugă un acid cum ar fi acid formic pentru a deproteja hidroxi metilul. Amestecul poate fi agitat la temperatura camerei sau încălzit la o temperatură de aproximativ 40 °C până când deprotejarea hidroxiului este completă pentru a da compusul din Schema 2, Etapa A. Produsul de hidroxi metil din Schema 2, Etapa A poate fi oxidat la produsul de acid carboxilic din Schema 2, Etapa B într-un mod analog cu procedura descrisă în
 - 15 Schema 1, Etapa J, și amida Weinreb poate fi preparată mai departe într-un mod analog cu procedura descrisă în Schema 1, Etapa K utilizând un agent de cuplare cum ar fi CDI într-o adăugare în porțiuni cu un solvent cum ar fi diclorometan, răcind până la -20 °C și agitând timp de aproximativ 1 oră și adăugând clorhidrat de N,O-dimetilhidroxilamină în porții. Adăugări suplimentare de CDI și N,O-dimetilhidroxilamină pot fi adăugate până când este observată reacția completă pentru a da produsul de amidă Weinreb din Schema 2, Etapa C. Cetona din Schema 2, Etapa D poate fi formată din amida Weinreb într-un mod analog cu procedura descrisă în Schema 1, Etapa L. Cetona din Etapa D poate fi convertită la o grupare de difluoroetil într-un mod analog cu procedura descrisă în Schema 1, Etapa M pentru a da produsul din Schema 2, Etapa E. Acetil tetrahidroizoxazolul poate fi deprotejat în condiții acide bine cunoscute în domeniu cum ar fi
 - 25 utilizând acid clorhidric și încălzind până la aproximativ 100 °C pentru a da produsul din Schema 2, Etapa F. Tetrahidroizoxazolul biciclic poate fi tratat cu zinc în acid acetic pentru a forma produsul cu inel deschis din Schema 2, Etapa G într-un mod analog cu procedura descrisă în Schema 1, Etapa F. Produsul de tiazină din Schema 2, Etapa H poate fi preparat într-o reacție de 2 etape într-un vas utilizând izotiocianat de benzoil într-un mod analog cu procedura descrisă în
 - 30 Schema 1, Etapa G și H. Amestecul este evaporat până la un reziduu și se adaugă ciclohexan. Amestecul este încălzit la aproximativ 60 °C și se adaugă metil *tert*-butil eter pentru a dizolva reziduu. Soluția este filtrată și concentrată la sec. Inelul de tiazină poate fi apoi format într-un

mod analog cu procedura descrisă în Schema 1, Etapa H pentru a da produsul din Schema 2, Etapa H.

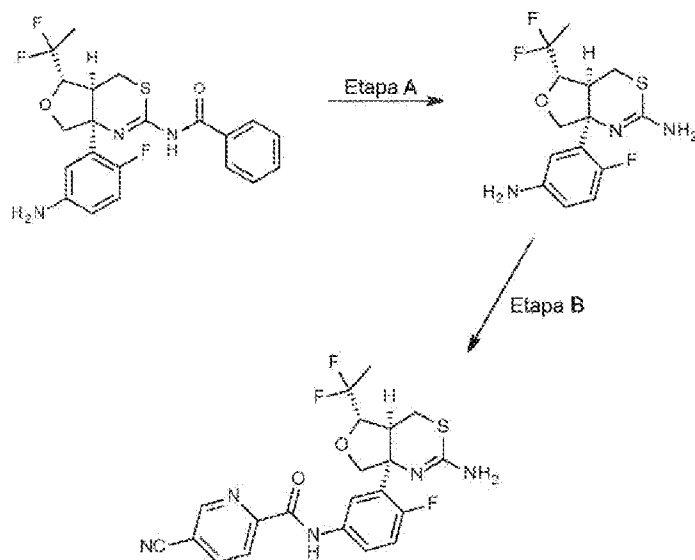
Schema 3



1a

- In Schema 3, Etapa A, produsul de anilină din Schema 1, Etapa N poate fi cuplat cu un acid carboxilic heteroaromatic utilizând condițiile de cuplare bine cunoscute în domeniu. O persoană calificată în domeniu va recunoaște că există un număr de metode și reactivi pentru formarea amidei care rezultă din reacția acizilor carboxilici și amine. De exemplu, reacția unei aniline adecvate cu un acid adecvat în prezența unui reactiv de cuplare și a unei baze de amină cum ar fi DIPEA sau trietilamină, va da un compus din Schema 3, Etapa A. Reactivii de cuplare includ carbodiimide cum ar fi DCC, DIC, EDCI, și oxime aromatice cum ar fi HOBt și HOAt. Suplimentar, săruri de uroni sau fosfoniu ale anionilor non-nucleofili cum ar fi HBTU, HATU, PyBOP, și PyBrOP sau o anhidridă fosforică ciclică cum ar fi anhidridă propilfosforică (T3P®) pot fi utilizate în locul reactivilor de cuplare mai tradiționali. Aditivii cum ar fi DMAP pot fi utilizați pentru a ameliora reacția. Alternativ, anilină amina poate fi acilată utilizând cloruri de benzoil substituit în prezența unei baze cum ar fi trietilamină sau piridină. În Schema 3, Etapa B, tiazin amina protejată poate fi apoi deprotejată cu o bază organică cum ar fi piridină și clorhidrat de O-metilhidroxilamină în solvenți cum ar fi THF și etanol și o bază organică cum ar fi piridină pentru a furniza compusul cu Formula 1a. Alternativ o bază anorganică cum ar fi hidroxid de litiu în metanol poate fi utilizată pentru a deproteja tiazina pentru a furniza compusul cu Formula 1a.

Schema 4

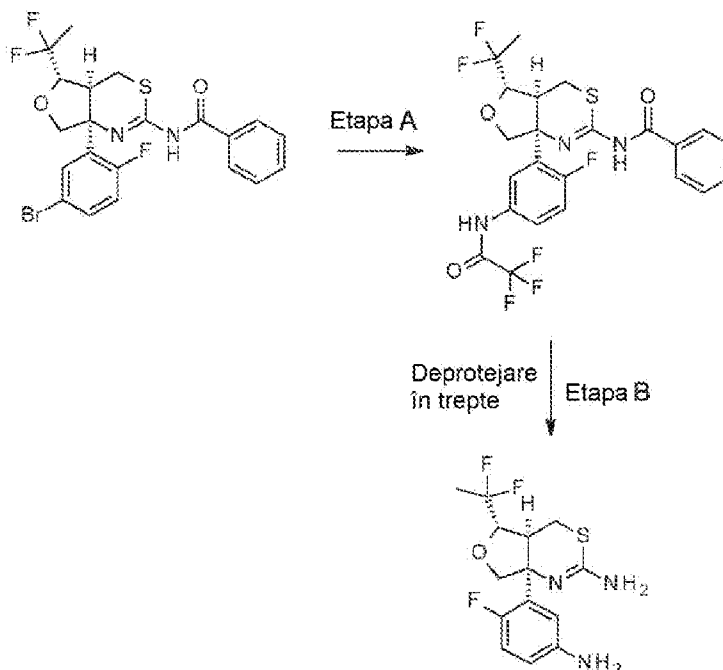


1a

Alternativ, în Schema 4, Etapa A, produsul de anilină din Schema 1, Etapa N poate fi deprotejat în condiții standard bine cunoscute în domeniu, de exemplu cu o bază organică cum ar fi piridină și clorhidrat de O-metilhidroxilamină în solvenți cum ar fi THF și etanol pentru a furniza compusul diamino deprotejat. Alternativ poate fi utilizată o bază anorganică cum ar fi hidroxid de litiu în metanol pentru deprotezare pentru a furniza compusul diamino deprotejat.

În Schema 4, Etapa B, compusul diamino deprotejat poate fi apoi cuplat selectiv la gruparea amino a anilinei cu un acid carboxilic heteroaromatic utilizând condițiile de cuplare bine cunoscute în domeniu pentru a furniza compusul cu Formula 1a. O persoană calificată în domeniu va recunoaște că există un număr de metode și reactivi pentru formarea amidei care rezultă din reacția acizilor carboxilici și a aminelor. De exemplu, reacția unei amine adecvate cu un acid adecvat în prezența unui reactiv de cuplare și a unei baze de amină cum ar fi DIPEA sau trietilamină, va furniza un compus cu Formula 1a. Reactivii de cuplare includ carbodiimide cum ar fi DCC, DIC, EDCI, și oxime aromatice cum ar fi HOBt și HOAt. Suplimentar, săruri de uroni sau fosfoniu ale anionilor non-nucleofili cum ar fi HBTU, HATU, PyBOP, și PyBrop sau o anhidridă fosforică ciclică cum ar fi anhidridă propilfosforică (T3P®) pot fi utilizate în locul reactivilor de cuplare mai tradiționali. Aditivii cum ar fi DMAP pot fi utilizați pentru a ameliora reacția.

Schema 5

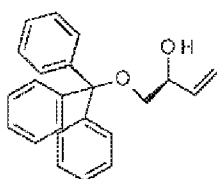


Alternativ, în Schema 5, produsul de bromură din Schema 1, Etapa M este convertit la o anilină protejată utilizând trifluoroacetamidă, iodură de cupru, o diamină cum ar fi trans, N,N'-dimetil-1,2-ciclohexan diamină racemică, o bază anorganică cum ar fi carbonat de potasiu, și iodură de sodiu cu încălzire până la aproximativ 100-130 °C pentru a da produsul de anilină protejat din Schema 5, Etapa A. Anilina și tiazin amina protejate pot fi apoi deprotejate în trepte. Trifluoroacetamida poate fi hidrolizată utilizând o bază cum ar fi amoniac 7 N în metanol pentru a da o anilină și tiazină protejată, același produs din Schema 1, Etapa N. Tiazina poate fi apoi deprotejată în condițiile bine cunoscute în domeniu și descrise în Schema 4, Etapa A utilizând clorhidrat de O-metilhidroxilamină într-un solvent cum ar fi etanol și THF cu o bază organică cum ar fi piridină urmată de încălzirea până la aproximativ 55 °C sau agitare la temperatura camerei urmată de concentrare și purificare pentru a da produsul din Schema 5, Etapa B. Alternativ, ordinea deprotejării ar putea fi inversată cu tiazina deprotejată prima și anilina deprotejată ultima.

Preparările și exemplele următoare ilustrează mai departe invenția.

Prepararea 1

(2S)-1-Tritiloxibut-3-en-2-ol



Schema 1, etapa A: Se agită iodură de trimetilsulfoni (193,5 g, 948,2 mmol) în THF (1264 mL) la temperatura ambiantă timp de 75 de minute. Se răcește amestecul la -50 °C și se adaugă n-butilitiu (2,5 mol/L în hexani, 379 mL, 948,2 mmol) prin canulă, într-o perioadă de 30 de minute. Se permite reacției să se încălzească gradual până la -30 °C și se agită timp de 60 de minute. Se adaugă (2S)-2-tritiloximetil oxiran (100 g, 316,1 mmol) în porții, menținând temperatura mai jos de -10 °C. După adăugarea completă, se permite amestecului de reacție să se încălzească la temperatura camerei și se agită timp de 2 ore. Se toarnă reacția în clorură de amoniu saturată, se separă fazele, și se extrage faza apoasă cu acetat de etil. Se combină straturile organice și se usucă pe sulfat de magneziu. Se filtrează și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduu prin cromatografie pe silica gel, eluând cu metil *t*-butil eter: hexani (10-15% gradient), pentru a da compusul din titlu (56,22 g, 54%). ES/MS *m/z* 353 (M+Na).

Prepararea 1 alternativă

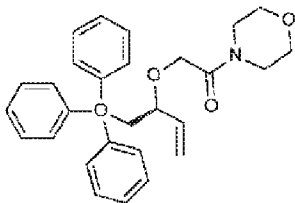
(2S)-1-Tritiloxibut-3-en-2-ol

Schema 1a, etapa A materia primă: Se adaugă clorură de trifenilmetil (287 g, 947,1 mmol), DMAP (7,71 g, 63,1 mmol) și trietilamină (140 g, 1383,5 mmol) la o soluție de (2S)-but-2-

en-1,2-diol (preparat ca în JACS, 1999, 121, 8649) (64,5 g, 631 mmol) în diclorometan (850 mL). Se agită timp de 24 de ore la 24 °C. Se adaugă acid citric apos 1 N (425 mL). Se separă straturile și se concentrează extractul organic sub presiune redusă la sec. Se adaugă metanol (900 mL) și se răcește la 5 °C timp de 1 oră. Se colectează solidele prin filtrare și se spală cu 5 °C metanol (50 mL). Se îndepărtează solidele și se concentrează lichidul mamă sub presiune redusă la sec. Se adaugă toluen (800 mL) și se concentrează la o masă de 268 g pentru a obține compusul din titlu (129 g, 67%) într-o soluție de toluen 48 g%.

Prepararea 2

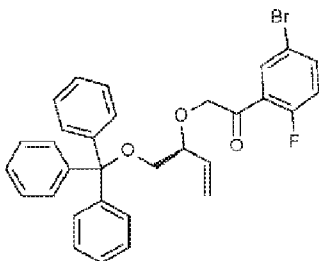
1-Morfolino-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]etanonă



Schema 1a, etapa A: Se adaugă tetrabutil amoniu hidrogen sulfat (83,2 g, 245,0 mmol) și 4-(2-cloroacetil)morfolină (638,50 g, 3902,7 mmol) la o soluție de 1-tritoloxibut-3-en-2-ol (832,4, 2519 mmol) în toluen (5800 mL) care este între 0 și 5 °C. Se adaugă hidroxid de sodiu (1008,0 g, 25202 mmol) în apă (1041 mL). Se agită timp de 19 ore între 0 și 5 °C. Se adaugă apă (2500 mL) și toluen (2500 mL). Se separă straturile și se spală extractul organic cu apă (2 × 3500 mL). Se concentrează extractul organic sub presiune redusă la sec. Se adaugă toluen (2500 mL) la reziduu și apoi se adaugă n-heptan (7500 mL) încet. Se agită timp de 16 ore. Se colectează solidele rezultate prin filtrare și se spală cu n-heptan (1200 mL). Se usucă solidul sub vid pentru a obține compusul din titlu (1075,7 g, 98%).

Prepararea 3

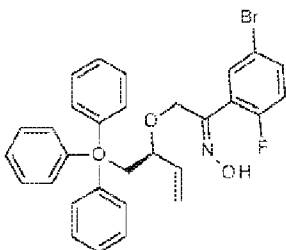
1-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]etanonă



Schema 1a, etapa B: Se adaugă o soluție 1,3 M din complexul clorură de izopropil magneziu clorură de litiu (3079 mL, 2000 mmol) în THF la o soluție de 4-bromo-1-fluoro-2-iodobenzen (673,2 g, 2237,5 mmol) în toluen (2500 mL) la o rată pentru a menține temperatura reacției mai jos de 5 °C. Se agită timp de 1 oră. Se adaugă soluția Grignard rezultată (5150 mL) la o soluție de 1-morfolino-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]etanonă (500 g, 1093 mmol) în toluen (5000 mL) la o rată pentru a menține temperatura reacției mai jos de 5 °C. Se agită timp de 3 ore menținând temperatura mai jos de 5 °C. Se adaugă soluția Grignard preparată suplimentar (429 mL) și se agită timp de 1 oră. Se adaugă o soluție de acid citric apos 1 N (5000 mL) la o rată pentru a menține temperatura mai jos de 5 °C. Se separă straturile și se spală extractul organic cu apă (5000 mL). Se concentrează soluția sub presiune redusă la sec. Se adaugă metanol (2000 mL) la reziduu și se concentrează pentru a da compusul din titlu ca reziduu (793 g, 73,4% potență, 83%).

Prepararea 4

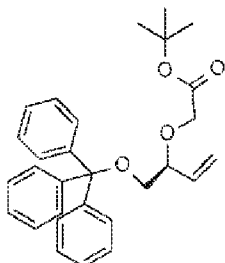
1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]etanonă oximă



Schema 1a, etapa C: Se adaugă clorhidrat de hidroxilamină (98,3 g) la 1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-((1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi)etanonă (450 g, 707 mmol) și acetat de sodiu (174 g) în metanol (3800 mL). Se încălzește soluția până la 50 °C timp de 2 ore. Se răcește la 24 °C și se concentrează. Se adaugă apă (1000 mL) și toluen (1500 mL) la reziduu. Se separă straturile și se extrage faza apoasă cu toluen (500 mL). Se combină extractul organic și se spală cu apă (2 × 400 mL). Se concentrează soluția sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu ca reziduu (567 g, 61,4% potență, 88%).

Prepararea 5

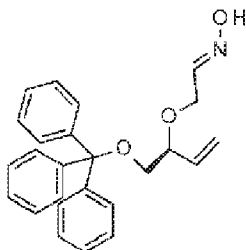
terț-Butil 2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]acetat



Schema 1, etapa B: Se adaugă (2S)-1-tritoloxibut-3-en-2-ol (74,67 g, 226,0 mmol) la o soluție de sulfat de tetra-N-butilamoniu (13,26 g, 22,6 mmol) în toluen (376 mL). Se adaugă hidroxid de sodiu (50% masă) în apă (119 mL) urmat de terț-butil-2-bromoacetat (110,20 g, 565,0 mmol). Se agită amestecul de reacție timp de 18 ore la temperatura ambiantă. Se toarnă în apă, se separă fazele, și se extrage faza apoasă cu acetat de etil. Se combină straturile organice și se usucă pe sulfat de magneziu. Se filtrează amestecul și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (77,86 g, 77%). ES/MS m/z 467 (M+Na).

Prepararea 6

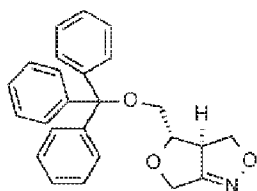
(1E)-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]acetaldehidă oximă



Schema 1, etapa C: Se răcește o soluție de terț-butil 2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]acetat (77,66 g, 174,7 mmol) în diclorometan (582,2 mL) la -78 °C. Se adaugă o soluție de hidruură de diizobutilaluminu în hexani (1 mol/L, 174,7 mL) în picătură într-o perioadă de 35 de minute și se menține temperatura mai jos de -70 °C. Se agită la -78 °C timp de 5 ore. Se adaugă acid clorhidric în apă (2 mol/L, 192,1 mL) la amestecul de reacție în picătură, menținând temperatura mai jos de -60 °C. Se permite reacției să se încălzească gradual la temperatura ambiantă și se agită timp de 60 de minute. Se separă extractul organic și se spală cu bicarbonat de sodiu saturat. Se usucă soluția pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se dizolvă reziduu în diclorometan. Se adaugă acetat de sodiu (28,66 g, 349,3 mmol), urmat de clorhidrat de hidroxilamină (18,21 g, 262,0 mmol). Se agită la temperatura ambiantă timp de 18 ore. Se toarnă în apă, se separă fazele, și se extrage faza apoasă cu diclorometan. Se combină straturile organice și se usucă pe sulfat de magneziu. Se filtrează amestecul și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (68,38 g, 101%). ES/MS m/z 386 (M-H).

Prepararea 7

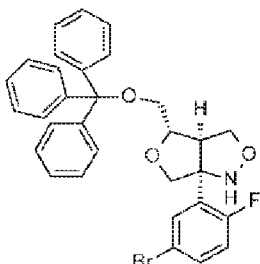
(3aR,4S)-4-(Tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol



Schema 1, etapa D: Se răcește o soluție de oximă de (1E)-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]acetaldehidă (55,57 g, 143,4 mmol) în *tert*-butil metil eter (717 mL) până la 5 °C. Se adaugă hipoclorit de sodiu (5% în apă, 591 mL, 430,2 mmol) în picătură, menținând temperatura mai jos de 10 °C. Se agită la 10 °C timp de 30 de minute. Se permite reacției să se încălzească până la 15 °C. Se agită la 15 °C timp de 18 ore. Se diluează amestecul de reacție cu acetat de etil și se spală cu bicarbonat de sodiu saturat. Se separă fazele, se spală faza organică cu o soluție 5% de sulfat acid de sodiu și saramură. Se usucă soluția pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduu prin cromatografie pe silica gel, eluând cu 50% metil *tert*-butil eter/diclorometan: hexani (20-27% gradient), pentru a da compusul din titlu (35,84 g, 65%). ES/MS *m/z* 408 (M+Na).

Prepararea 8

(3aR,4S,6aR)-6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol



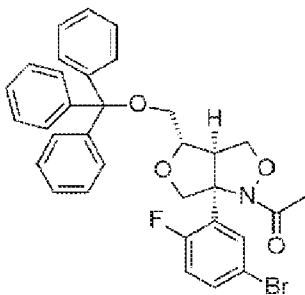
Schema 1, etapa E: Se răcește o soluție de 4-bromo-1-fluoro-2-iodo-benzen (86,94 g, 288,9 mmol) în THF (144,5 mL) și toluen (1445 mL) la -78 °C. Se adaugă *n*-butillitui (2,5 M în hexani, 120 mL, 288,9 mmol) în picătură, menținând temperatura mai jos de -70 °C. Se agită timp de 30 de minute la -78 °C. Se adaugă bor trifluorură dietil eterat (36,5 mL, 288,9 mmol) în picătură, menținând temperatura mai jos de -70 °C. Se agită soluția timp de 30 de minute la -78 °C. Se adaugă o soluție de (3aR,4S)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol (55,69 g, 144,5 mmol) în THF (482 mL) în picătură la reacție, într-o perioadă de 30 de minute, menținând temperatura mai jos de -65 °C. Se agită la -78 °C timp de 90 de minute. Se adaugă rapid clorură de amoniu saturată, menținând temperatura mai jos de -60 °C. Se toarnă în saramură, și se extrage faza apoasă cu acetat de etil. Se combină extractul organic și se usucă pe sulfat de magneziu. Se filtrează și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduu prin cromatografie pe silica gel, eluând cu un gradient de 100% hexani până la 30% hexani/70% dietil eter, pentru a da compusul din titlu (36,52 g, 45%). ES/MS *m/e* (⁷⁹Br/⁸¹Br) 560/562 [M+H].

Prepararea 8 alternativă

Schema 1a, etapa D: Se încălzește o soluție de oximă de 1-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-[(1S)-1-(tritoloximetil)aliloxi]etanonă (458 g, 502 mmol) și hidrochinonă (56,3 g 511 mmol) în toluen (4000 mL) la reflux sub azot timp de 27 de ore. Se răcește soluția la 24 °C și se adaugă carbonat de sodiu apos (800 mL). Se separă straturile și se extrage faza apoasă cu toluen (300 mL). Se combină extractul organic și se spală cu apă (2 × 500 mL). Se concentrează soluția sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se adaugă alcool izopropilic (1500 mL) și se încălzește la reflux. se răcește la 24 °C și se colectează solidele prin filtrare. Se usucă solidul sub vid pentru a obține compusul din titlu (212 g, 75%).

Prepararea 9

1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol-1-il]etanonă

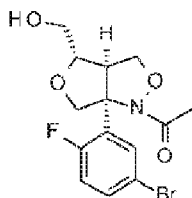


Schema 1a, etapa E: Se adaugă clorură de acetyl (35,56 g, 503,9 mmol) la o soluție de (3aR,4S,6aR)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol

(235,3 g, 420 mmol), DMAP (5,13 g, 42,0 mmol), și piridină (66,45 g, 840,1 mmol) în diclorometan (720 mL) sub azot, menținând temperatura internă mai jos de 5 °C. Se agită timp de 1 oră și apoi se adaugă apă (300 mL) și 1 M acid sulfuric (300 mL). Se agită amestecul timp de 10 minute și se permite straturilor să se separe. Se colectează extractul organic și se spală cu carbonat de sodiu saturat (500 mL) și apă (500 mL). Se usucă soluția pe sulfat de magneziu. Se filtrează și se concentrează sub presiune redusă pentru a da 1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol-1-il]etanonă (235 g, 93%) ca solid gri.

Prepararea 10

1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)tetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-1-il]etanonă



Schema 2, etapa A: Intr-un reactor de 20 L îmbrăcat se adaugă clorură de acetil (290 mL, 4075 mmol) la o soluție de (3aR,4S,6aR)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol (1996 g, 3384 mmol), DMAP (56,0 g, 458 mmol), piridină (500 mL, 6180 mmol) în diclorometan (10 L) sub azot menținând temperatura internă mai jos de 10 °C. După adăugarea completă (1 oră) se încălzește la 20 °C și se agită peste noapte. Dacă reacția este incompletă, se adaugă clorură de acetil, DMAP, piridină, și diclorometan până când se observă că reacția este completă. Se răcește amestecul de reacție până la 0 °C și se adaugă încet apă (5 L), se agită amestecul de reacție la 10 °C timp de 30 de minute și se permite straturilor să se separe. Se colectează extractul organic și se spală aposul cu diclorometan (1 L). Se spală extractele organice combinate cu 1 N acid clorhidric apos (2 ? 4 L), se extrage aposul cu diclorometan (2 ? 1 L). Se spală extractele organice combinate cu apă (4 L) și se îndepărtează solventul sub presiune redusă dând un volum total de aproximativ 5 L. Se adaugă 90% acid formic (1800 mL) și stă la temperatura ambiantă timp de 3 zile. Se încălzește la 40 °C timp de 2 ore apoi se îndepărtează solventul sub presiune redusă. Se diluează reziduul cu metanol (4 L) și se adaugă încet carbonat de sodiu apos saturat (3 L). Se adaugă carbonat de sodiu solid (375 g) pentru a ajusta pH-ul la 8-9. Se agită la 45 °C timp de 1 oră apoi se răcește la temperatura ambiantă. Se îndepărtează solidele prin filtrare, spălând cu metanol (4 × 500 mL) apoi se tratează cu 2 N hidroxid de sodiu apos (100 mL) și stă la temperatura ambiantă timp de 1 oră. Se îndepărtează solidele prin filtrare, spălând cu metanol (2 × 100 mL). Se evaporă solventul sub presiune redusă și se partajează reziduul între acetat de etil (5 L) și apă (2 L). Se extrage aposul cu acetat de etil (2 L) și se spală extractele organice combinate cu saramură (2 × 1 L). Se îndepărtează solventul sub presiune redusă, se adaugă metil *terț*-butil eter (2,5 L) și se evaporă la sec. Se adaugă metil *terț*-butil eter (4 L) și se agită la 65 °C timp de 1 oră se răcește la temperatura ambiantă și se colectează solidele prin filtrare, spălând cu metil *terț*-butil eter (3 × 500 mL). Se usucă sub vid până la un solid bej. Se încălzește acest solid în toluen (7,5 L) până la 110 °C până când este dizolvat complet, se răcește la 18 °C într-o oră, și se agită la această temperatură timp de 1 oră. Se încălzește la 40 °C și când se formează precipitat, se răcește la 18 °C încă o dată. Se agită timp de 45 de minute apoi se colectează solidele prin filtrare, spălând cu toluen (2 × 500 mL). Se usucă solidul sub vid pentru a obține compusul din titlu (443,1 g, 36%, 95% puritate prin LCMS). Se evaporă filtratul sub vid pentru a da un reziduu. Se purifică reziduul prin cromatografie rapidă pe silica gel, eluând cu 20% până la 100% acetat de etil în izohexan. Se suspendă produsul conținând fracțiuni în metil *terț*-butil eter (2 L) la 60 °C timp de 30 de minute, se răcește la temperatura ambiantă, și se colectează solidele prin filtrare, spălând cu metil *terț*-butil eter (2 × 200 mL). Se usucă solidele sub vid pentru a da compusul din titlu ca solid bej cristalin (304 g, 24%, 88% puritate prin LCMS). Se evaporă filtratul sub vid până la un reziduu. Se purifică reziduul prin cromatografie rapidă pe silica gel, eluând cu 20% până la 100% acetat de etil în izohexan pentru a da compusul din titlu (57,8 g, 5%, 88% puritate prin LCMS). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 360,0/362,0 [M+H].

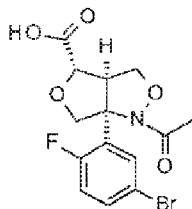
Prepararea 10 alternativă

Schema 2, etapa A: Se adaugă 1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol-1-il]etanonă (69 g, 114,5 mmol) la o soluție de 15 °C de acid *p*-toluensulfonic monohidrat (2,2 g, 11,45 mmol), diclorometan (280 mL) și metanol (700 mL). Se agită timp de 18 ore și apoi se îndepărtează solventul sub presiune redusă. Se diluează reziduul cu diclorometan (350 mL) și se adaugă 1 M carbonat de sodiu apos (140 mL)

și apă (140 mL). Se separă straturile și se evaporă stratul organic sub presiune redusă. Se adaugă toluen (350 mL) la reziduu și se încălzește la reflux timp de 1 oră. Se răcește până la 10-15 °C la o rată de 10 °C/oră. Se colectează solidele prin filtrare și se spală cu toluen (70 mL). Se usucă solidul sub vid pentru a obține compusul din titlu (30 g, 65%) ca gri solid.

5 Prepararea 11

Acid (3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol-4-carboxilic



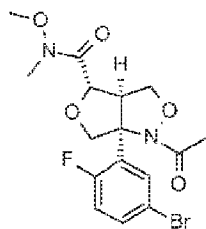
10 Schema 2, etapa B: Se adaugă apă (2 L) la o suspensie de 1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4-(hidroximetil)tetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-1-il]etanonă (804,9 g, 2177 mmol), (2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-il)oxil (40,0 g, 251 mmol) în acetonitril (4,5 L) într-un rector de 20 L îmbrăcat și se răcește până la o temperatură internă de 5 °C. Se adaugă (diacetoxiiodo)benzen (1693 g, 4993,43 mmol) în porții timp de 30 de minute. Se controlează
15 reacția exotermă utilizând răcirea reactorului și apoi se ține la 20 °C până când LCMS arată că reacția este completă. Se adaugă încet o suspensie de bisulfat de sodiu (70 g, 672,68 mmol) în apă (300 mL) la temperatura ambiantă, menținând temperatura internă mai jos de 25 °C. Se agită timp de 30 de minute și apoi se răcește la 5 °C. Se adaugă apă (2 L), apoi se adaugă încet 47 g% hidroxid de sodiu apos (780 mL) într-o perioadă de 1 oră menținând temperatura internă mai jos de 10 °C. Se adaugă acetat de etil (2 L) și izohexan (5 L), se agită viguros și se separă straturile. Se
20 extrag straturile organice bifazice cu apă (1 L) și se spală apoasele combinate cu metil *terț*-butil eter (2,5L). Se răcesc extractele apoase până la 5 °C și se adaugă încet 37% acid clorhidric (1,4 L) în 30 de minute menținând temperatura internă în jur de 5 °C. Se adaugă acetat de etil (5 L), se separă straturile și se spală organicul cu saramură (3 × 1 L). Se extrag extractele apoase combinate
25 cu acetat de etil (2,5 L), se spală organicele combinate cu saramură (1 L), apoi se usucă cu sulfat de sodiu, și se filtrează. Se diluează organicele cu heptan (2,5 L) și se evaporă la sec sub presiune redusă. Se adaugă metil *terț*-butil eter (1,5 L) și heptan (1,5 L) și se evaporă la sec. Se adaugă heptan (2,5 L) și se evaporă la sec de două ori. Se adaugă heptan (500 mL) și metil *terț*-butil eter (500 mL) și se agită la 40 °C timp de 30 de minute apoi se colectează precipitatul prin filtrare,
30 spălând cu heptan/metil *terț*-butil eter (1:1, 1 L) apoi metil *terț*-butil eter (3 × 300 mL) și se usucă cu aer pentru a da compusul din titlu ca solid bej cristalin (779 g, 91%). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 374,0/376,0 [M+H]. [α]_D²⁰ = -19,0 ° (C=1,004, cloroform).

Prepararea 11 alternativă

35 Schema 2, etapa B: Se adaugă apă (150 mL) și acetonitril (150 mL) la 1-[(4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol-1-il]etanonă (30 g, 73,3 mmol), TEMPO (1,14 g, 7,30 mmol) și (diacetoxiiodo) benzen (51,9 g, 161 mmol). Se răcește la 15 °C și se agită timp de 2 ore. Se adaugă încet tiosulfat de sodiu (21 g) și carbonat de potasiu (22 g) în apă (150 mL) la temperatura ambiantă. Se agită timp de 1 oră și apoi se adaugă metil *terț*-butil eter (150 mL). Se separă straturile și se ajustează pH-ul stratului apos până la 2-3
40 cu acid sulfuric concentrat. Se adaugă acetat de etil (150 mL) și se separă straturile. Se evaporă stratul organic la sec sub presiune redusă. Se adaugă n-heptan (90 mL) și se încălzește la reflux timp de 1 oră. Se răcește la 15 °C și apoi se colectează precipitatul prin filtrare, spălând cu n-heptan (90 mL). Se usucă sub vid pentru a da compusul din titlu ca solid alb (27 g, 98%).

45 Prepararea 12

(3aR,4S,6aS)-1-Acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-N-metoxi-N-metiltetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-4-carboxamidă



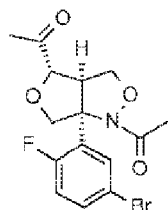
Schema 2, etapa C: Intr-un reactor de 10 L îmbrăcat, se răcește o soluție de acid (3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol-4-carboxilic (771 g, 2019 mmol) în diclorometan (7,0 L) până la 0 °C sub azot și se adaugă CDI (400 g, 2421 mmol) în porții timp de 40 de minute. Se răcește căptușeala reactorului la -20 °C și se agită timp de 1 oră și apoi se adaugă clorhidrat de N,O-dimetilhidroxilamină (260,0 g, 2612 mmol) în porții timp de aproximativ 30 de minute. Se agită la -20 °C timp de 1 oră, la 0 °C timp de 2 ore, și la 10 °C timp de 7 ore. Se adaugă CDI (175 g, 1058 mmol) și se agită la 10 °C peste noapte. Se adaugă suplimentar CDI (180 g, 1088 mmol) la 10 °C și se agită timp de 1 oră apoi se adaugă clorhidrat de N,O-dimetilhidroxilamină (140 g, 1407 mmol) și se continuă agitarea la 10 °C. Dacă reacția este incompletă, pot fi făcute încărcări suplimentare cu CDI urmat de clorhidrat de N,O-dimetilhidroxilamină până când se observă că reacția este completă. Se răcește amestecul de reacție până la 5 °C și se spală cu 1 N acid clorhidric apos (5 L) apoi 2 N acid clorhidric apos (5 L). Se extrage soluția apoasă combinată cu diclorometan (1 L), se combină extractul organic și se spală cu apă (2,5 L), 1 N hidroxid de sodiu apos (2,5 L), și apă (2,5 L), se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se evaporă sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se adaugă metil *terț*-butil eter (3 L) și se evaporă sub presiune redusă. Se adaugă suplimentar metil *terț*-butil eter (2 L) și se agită la 50 °C timp de 1 oră, se răcește la 25 °C și se agită timp de 30 de minute. Se colectează solidele rezultate prin filtrare, se spală cu metil *terț*-butil eter (2 × 500 mL) și se usucă sub vid pentru a da compusul din titlu (760 g, 88%) ca solid alb. ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 417,0/419,0 [M+H].

Prepararea 12 alternativă

Schema 2, etapa C: Se răcește o soluție de acid (3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol-4-carboxilic (27g, 70,7 mmol) în N,N-dimetilformamidă (135 mL) până la 0 °C sub azot și se adaugă CDI (14,9 g, 91,9 mmol). Se agită timp de 1 oră și apoi se adaugă clorhidrat de N,O-dimetilhidroxilamină (9,0 g, 92 mmol) și trietilamină (14,3 g, 141 mmol). Se agită la 15 °C timp de 16 ore. Se răcește amestecul de reacție până la 0 °C și se adaugă 0,5 M acid sulfuric apos (675 mL). Se agită timp de 1 oră. Se colectează solidele rezultate prin filtrare. Se suspendă solidele în metil *terț*-butil eter (90 mL) timp de 1 oră. Se colectează solidele prin filtrare, se spală cu metil *terț*-butil eter (30 mL). Se usucă sub vid pentru a da compusul din titlu (23 g, 78%) ca solid.

Prepararea 13

1-[(3aR,4S,6aS)-1-Acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol-4-il]etanonă



Schema 2, etapa D: Intr-un reactor de 20 L îmbrăcat, se răcește o soluție de (3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-N-metoxi-N-metiltetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-4-carboxamidă (654,0 g, 1536 mmol) în THF (10 L) la -60 °C și se adaugă o soluție 3,2 M de bromură de metilmagneziu în 2-metiltetrahidrofuran (660 mL, 2110 mmol) în picături, în timp ce se menține temperatura internă mai jos de -40 °C. Se agită amestecul de reacție la -40 °C timp de 30 de minute apoi se răcește la -50 °C și se adaugă o soluție de 1 N acid clorhidric apos (2 L) în THF (2 L) menținând temperatura internă mai jos de -38 °C. Se crește temperatura până la 10 °C și se adaugă acetat de etil (5 L) și apă (1 L), se agită și se permite ca temperatura internă să ajungă la 5 °C și se separă straturile. Se extrage stratul apos cu acetat de etil (1 L) și se combină extractele organice. Se spală extractele organice cu apă (2 L) și se extrage stratul apos cu acetat de etil (1 L). Se combină extractul organic și se spală cu saramură (3 × 2 L) apoi se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se evaporă sub presiune redusă până la un reziduu. Se adaugă ciclohexan

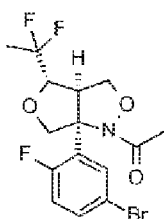
(2,5 L), se agită la 60 °C timp de 1 oră apoi la 20 °C timp de 30 de minute, și se colectează solidul prin filtrare, spălând cu ciclohexan (500 mL). Se usucă solidul sub vid pentru a obține compusul din titlu ca solid alb (565 g, 99%). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 372,0/ 374,0 [M+H], [α]_D²⁰ = -58,0 ° (C=1,000, cloroform).

5 Prepararea 13 alternativă

Schema 2, etapa D: Se răcește o soluție de (3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-N-metoxi-N-metiltetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-4-carboxamidă (4,0g, 9,59 mmol) în THF (60 mL) la -5 °C și se adaugă o soluție 3,0 M de bromură de metilmagneziu în 2-metiltetrahidrofuran (5,0 mL, 15 mmol) în picătură, în timp ce se menține temperatura internă între -5 și 0 °C. Se agită amestecul de reacție între -5 și 0 °C timp de 60 de minute apoi se adaugă o soluție de clorură de amoniu saturată (20 mL). Se adaugă metil *terț*-butil eter (40 mL), se permite ca temperatura internă să ajungă la 5 °C și se separă straturile. Se evaporă stratul organic sub presiune redusă până la un reziduu. Se adaugă n-heptan (50 mL), se agită, și se colectează solidul prin filtrare. Se usucă solidul sub vid pentru a obține compusul din titlu ca solid (3,0 g, 77%).

15 Prepararea 14

1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluorofenil)-4-(1,1-difluoroetil)tetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-1-il]etanonă



Schema 2, etapa E: Se adaugă 1-[(3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol-4-il]etanonă (5,08 g, 13,6 mmol) într-o singură porție la o suspensie agitată de tetrafluoroborat de difluoro(morfolino)-sulfoniu (10,02 g, 39,18 mmol) în diclorometan anhidru (100 mL) la 0-5 °C. Se agită amestecul timp de 10 minute și se adaugă trihidrofluorură de trietilamină (4,5 mL, 27 mmol) în picătură timp de 10 minute. Se agită amestecul de reacție în baia cu gheață timp de 8 ore apoi se încălzește la temperatura ambiantă și se agită peste noapte. Se adaugă carbonat de sodiu apos saturat (100 mL) și se agită timp de 1 oră. Se separă straturile și se extrage aposul cu diclorometan (2 × 50 mL). Se combină extractele organice și se spală cu bicarbonat de sodiu apos saturat (100 mL), 2 N acid clorhidric apos (2 × 100 mL), și saramură (100 mL). Se evaporă la sec până la un solid maro deschis și se dizolvă în metil *terț*-butil eter (300 mL) la 60 °C. Se filtrează soluția fierbinte și se evaporă filtratul pentru a da un solid maro (5,3 g, 81%, 82% puritate prin LCMS) care este utilizat fără purificare suplimentară. ES/MS: m/x (⁷⁹Br/⁸¹Br) 393,8/395,8 [M+H].

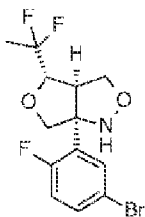
Prepararea 14 alternativă

Schema 2, etapa E: Se adaugă XtalFluor-M® (1,21 kg, 4,73 mol) în porții la o soluție agitată de 1-[(3aR,4S,6aS)-1-acetil-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-3,3a,4,6-tetra-hidrofuro[3,4-c]izoxazol-4-il]etanonă (565 g, 1,51 mol) în diclorometan anhidru (5 L) la -14 °C. Se agită amestecul timp de 10 minute și se adaugă trihidrofluorură de trietilamină (550 g, 3,34 mol) în picătură timp de 20 de minute. Se agită amestecul de reacție la -10 °C timp de aproximativ 10 ore apoi se încălzește la temperatura ambiantă și se agită peste noapte. Se adaugă 50% hidroxid de sodiu apos (750 mL) încet, menținând temperatura internă mai jos de 10 °C, apoi se adaugă apă (1,5 L) și carbonat acid de sodiu apos saturat (1 L) și se agită timp de 30 de minute. Se separă straturile și se extrage aposul cu diclorometan (1 L). Se combină extractele organice și se spală cu saramură (3 L), 2 N acid clorhidric apos (5 L), și saramură (3 L). Se evaporă pentru a da un reziduu și se purifică prin cromatografie pe silica gel eluând cu 50-100% diclorometan în izo-hexan apoi 10% metil *terț*-butil eter în diclorometan pentru a da compusul din titlu ca pulbere albă (467 g, 73%, 94% puritate prin LCMS). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 393,8/395,8 [M+H].

Prepararea 15

(3aR,4S,6aS)-6a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(1,1-difluoroetil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]izoxazol

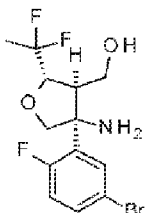
50



Schema 2, etapa F: Se adaugă 37g% acid clorhidric apos (1,3 L, 16 mol) la o soluție de 1-[(3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4-(1,1-difluoroetil)tetrahidro-1H,3H-furo[3,4-c][1,2]oxazol-1-il]etanonă (570 g, 1,45 mol) în 1,4-dioxan (5 L) într-un reactor de 10 L imbrăcat și se agită la 100 °C timp de aproximativ 3 ore sau până când LCMS arată că reacția este completă. Se răcește amestecul de reacție până la 10 °C, se diluează cu apă (1 L) și se adaugă un amestec de 50 g% soluție apoasă de hidroxid de sodiu (800 mL) și apă (1 L) încet, menținând temperatura internă mai jos de 20 °C. Se adaugă acetat de etil (2,5 L) și se agită viguros, înainte de separarea straturilor și spălarea fazei organice cu saramură (2 L), saramură suplimentară (1 L), și apă (1 L). Se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează și se concentrează la sec sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se adaugă ciclohexan (2,5 L) și se evaporă la sec apoi se repetă pentru a obține compusul din titlu ca ulei maro (527 g, 89%, 86% puritate prin LCMS). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 351,8/353,8 [M+H].

Prepararea 16

15 [(2S,3R,4S)-4-Amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(1,1-difluoroetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol -3-



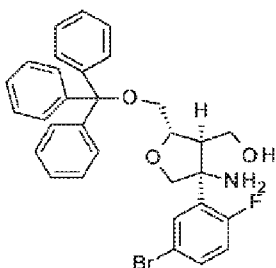
Schema 2, etapa G: Se adaugă pulbere de zinc (6,0 g, 92 mmol) la o soluție de (3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(1,1-difluoroetil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]izoxazol (5,06 g, 13,4 mmol) în acid acetic (100 mL) la temperatura ambiantă și se agită peste noapte. Se diluează amestecul cu acetat de etil (200 mL) și apă (300 mL) și se agită viguros în timp ce se adaugă carbonat de sodiu (97 g, 915 mmol). Se separă straturile și se spală stratul organic cu saramură (2 × 200 mL), se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează pentru a da un reziduu. Se purifică reziduul prin cromatografie pe silica gel eluând cu 0% până la 100% metil *tert*-butil eter în izohexan pentru a da compusul din titlu ca solid ceros (4,67 g, 89%, 90% puritate prin LCMS). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 354,0/356,0 [M+H].

Prepararea 16 alternativă

Schema 2, etapa G: Se adaugă pulbere de zinc (200 g, 3,06 mol) în porții la o soluție de (3aR,4S,6aS)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(1,1-difluoroetil)-3,3a,4,6-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]izoxazol (304 g, 75% puritate, 647 mmol) în acid acetic (2 L) și apă (2 L) la 20 °C apoi se încălzește până la 40 °C și se agită peste noapte. Se diluează amestecul cu apă (2 L) și se agită viguros în timp ce se adaugă carbonat de sodiu (4 kg, 43,4 mol) apoi se ajustează la pH 8-9 cu carbonat de sodiu suplimentar. Se adaugă acetat de etil (5 L) și apă (2,5 L), se agită timp de 30 de minute și se filtrează prin pământ de diatomee spălând cu 2:1 acetonitril/apă. Se separă straturile, se extrage aposul cu acetat de etil (2 × 2,5 L) și se spală extractele organice combinate cu saramură (2 × 2,5 L), se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează pentru a da un reziduu. Se purifică reziduul prin SFC, coloană: Chiralpak AD-H (5), 50 × 250 mm; eluent: 12% etanol (0,2% dietilmetilamină în CO₂); debit: 340 g/minut la UV 220 nm pentru a da compusul din titlu ca solid alb (197,7 g, 84%). [α]_D²⁰ = -6,93 ° (C=0,678, cloroform). ES/MS: m/z (⁷⁹Br/⁸¹Br) 354,0/356,0 [M+H].

Prepararea 17

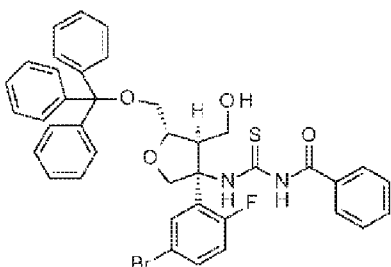
45 [(2S,3R,4S)-4-Amino-4-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol



Schema 1, etapa F: Se adaugă (3aR,4S,6aR)-6a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(tritoloximetil)-3,3a,4,6-tetrahidrofuro[3,4-c]izoxazol (31,30 g, 55,9 mmol) la acid acetic (186 mL) pentru a da o suspensie. Se adaugă zinc (25,6 g, 391 mmol) și se agită amestecul de reacție viguros timp de 18 ore. Se diluează amestecul cu toluen și se filtrează prin pământ de diatomee. Se concentrează filtratul sub presiune redusă. Se solubilizează reziduul cu acetat de etil, se spală cu saramură, și bicarbonat de sodiu saturat. Se separă fazele, se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (31,35 g, 99%). ES/MS *m/e* ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 562/564 [M+H].

10 Prepararea 18

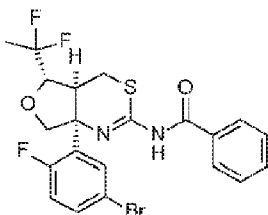
N-[[[(3S,4R,5S)-3-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)-5-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]carbamotiil]benzamidă



Schema 1, etapa G: Se dizolvă [(2S,3R,4S)-4-amino-4-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol (31,35 g, 55,73 mmol) în diclorometan (557 mL) și se răcește la 5 °C. Se adaugă izotiocianat de benzoil (9,74 mL, 72,45 mmol). După ce adăugarea este completă, se permite amestecului de reacție să se încălzească la temperatura camerei și se agită timp de 2 ore. Se toarnă în bicarbonat de sodiu saturat, se separă fazele, și se extrage faza apoasă cu diclorometan. Se combină extractul organic și se usucă pe sulfat de magneziu. Se filtrează soluția și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (42,95 g, 106%). ES/MS *m/e* ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 747/749 [M+Na].

Prepararea 19

N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă



Schema 2, etapa H: Se adaugă izotiocianat de benzoil (1,80 mL, 13,3 mmol) la o soluție de [(2S,3R,4S)-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(1,1-difluoroetil)tetrahidrofuran-3-il]metanol (4,67 g, 11,9 mmol) în diclorometan (20 mL) la temperatura ambiantă timp de 1 oră până când LCMS arată că reacția este completă. Se evaporă amestecul de reacție până la un reziduu sub vid. Se adaugă ciclohexan (50 mL), se încălzește la 60 °C și se adaugă metil *tert*-butil eter până când precipitatul este complet dizolvat (100 mL). Se filtrează soluția fierbinte, se răcește la temperatura camerei și se evaporă încet sub presiune redusă până când se formează un precipitat alb. Se îndepărtează solventul sub presiune redusă și se dizolvă reziduul în diclorometan anhidru (30 mL), se adaugă piridină (2,4 mL, 30 mmol), și se răcește soluția la -25 °C. Se adaugă anhidridă trifluorometansulfonică (2,2 mL 13 mmol) în picătură timp de 30 de minute și se lasă să se încălzească până la 0 °C într-o oră. Se spală amestecul de reacție cu apă (25 mL), 2 N acid clorhidric apos (25 mL), apă (25 mL), bicarbonat de sodiu apos saturat (25 mL), și apă (25 mL), se

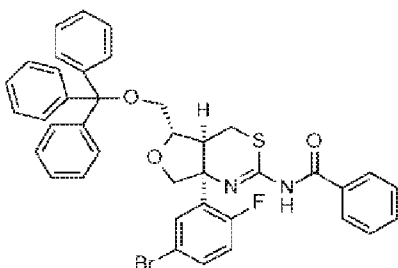
usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează la sec. Se purifică reziduul prin cromatografie pe silica gel eluand cu 5% metil *terț*-butil eter in diclorometan pentru a da compusul din titlu ca spumă galben deschis (5,0 g, 76%, 90 % puritate prin LCMS). ES/MS: m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 499,0/501,0 [M+H].

5 Prepararea 19 alternativă

Schema 2, etapa H: Se adaugă izotiocianat de benzoil (98 mL, 724,9 mmol,) la o soluție de [(2S,3R,4S)-4-amino-4-(5-bromo-2-fluorofenil)-2-(1,1-difluoroetil)tetra-hidrofuran-3-il]metanol (197,6 g, 546,7 mmol) în diclorometan (1,2 L) la 30 °C timp de 1 oră. Se adaugă CDI (101 g, 610,4 mmol) și se agită la temperatura ambiantă timp de 3 ore. Pot fi adăugate încărcări suplimentare de CDI pentru a asigura consumul complet al intermediarului de tiouree. Se încălzește la 90 °C timp de 42 de ore și se răcește soluția la temperatura ambiantă. Se diluează amestecul de reacție cu acetat de etil (2 L) și se adaugă 2 N acid clorhidric apos (2 L), se agită, se adaugă saramură (1 L) și se separă straturile. Se spală stratul organic cu 2 N acid clorhidric apos (0,5 L), saramură (2 × 1 L) și bicarbonat de sodiu apos saturat (1 L). Se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează pentru a da un reziduu. Se purifică reziduul prin cromatografie pe silica gel eluand cu 0-100% acetat de etil in izo-hexan pentru a da compusul din titlu ca solid galben deschis (234 g, 83%). ES/MS: m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 499,0/501,0 [M+H].

Prepararea 20

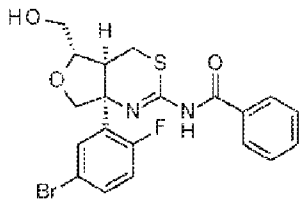
20 N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-5-(tritoloximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă



Schema 1, etapa H: Se dizolvă N-[(3S,4R,5S)-3-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4-(hidroximetil)-5-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]carbamoil]benzamidă (42,95 g, 59,18 mmol) in diclorometan (591 mL) și se răcește la -20 °C. Se adaugă piridină (12,0 mL, 148,0 mmol), urmată de anhidridă trifluorometansulfonică (10,97 mL, 65,10 mmol). Se monitorizează adăugarea menținând temperatura mai jos de -20 °C. Se agită amestecul de reacție la -20 °C timp de 30 de minute. Se permite amestecului de reacție să se încălzească la temperatura camerei. Se toarnă în clorură de amoniu saturată, se separă fazele, și se extrage faza apoasă cu diclorometan. Se combină extractul organic și se usucă pe sulfat de magneziu. Se filtrează soluția și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (45,24 g, 108%). ES/MS m/e ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 707/709 [M+H].

Prepararea 21

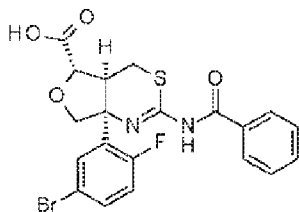
35 N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-5-(hidroximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă



Schema 1, etapa I: Se dizolvă N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-5-(tritoloximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă (45,24 g, 63,93 mmol) în acid formic (160 mL) și se agită la temperatura ambiantă timp de 1 oră. Se adaugă apă (29 mL) într-o perioadă de 5 minute. Se agită timp de 50 de minute. Se concentrează amestecul sub presiune redusă la un reziduu. Se dizolvă reziduul în metanol (639 mL), se adaugă trietilamină (26,7 mL, 191,8 mmol), și se agită peste noapte la temperatura ambiantă. Se toarnă în saramură, se separă fazele, și se extrage faza apoasă cu cloroform. Se combină extractul organic și se usucă pe sulfat de magneziu. Se filtrează și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduul prin cromatografie pe silica gel, eluând cu acetonă: hexani (25-38% gradient), pentru a da compusul din titlu (16,04 g, 54%). ES/MS m/e ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 465/467 [M+H].

Prepararea 22

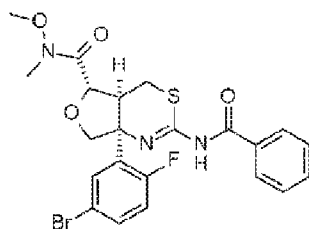
Acid (4aS,5S,7aS)-2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-5-carboxilic



Schema 1, etapa J: Se adaugă N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-5-(hidroximetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă (16,04 g, 34,47 mmol) la DMSO (172 mL). Se adaugă acid 2-iodoxibenzoic (35,56 g, 120,70 mmol) și se agită la temperatura ambiantă timp de 3 ore. Se diluează amestecul de reacție cu cloroform (300 mL) și se toarnă în clorură de amoniu saturată (400 mL). Se separă faza organică și se usucă pe sulfat de magneziu. Se filtrează soluția și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se dizolvă reziduu în acetat de etil (400 mL) și se spală cu clorură de amoniu saturată (2×250 mL). Se separă faza organică, se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se dizolvă reziduu într-un amestec de diclorometan:metanol și se adaugă dietil eter până când precipită un solid. Se colectează solidul prin filtrare și se usucă sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (5,78 g, 35%). ES/MS *m/e* ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 479/481 [M+H].

Prepararea 23

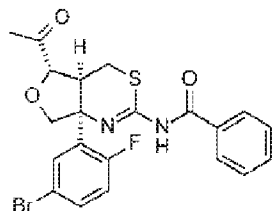
(4aS,5S,7aS)-2-Benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-N-metoxi-N-metil-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-5-carboxamidă



Schema 1, etapa K: Se dizolvă acid (4aS,5S,7aS)-2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-5-carboxilic (5,78 g, 12,1 mmol) în diclorometan (201 mL) și clorhidrat de N,O-dimetilhidroxilamină (1,76 g, 18,1 mmol). Se adaugă trietilamină (5,29 mL, 36,2 mmol) urmată de HATU (7,02 g, 18,1 mmol). Se agită la temperatura ambiantă timp de 3 zile. Se toarnă în clorură de amoniu saturată, se separă fazele, și se extrage faza apoasă cu acetat de etil. Se combină extractele organice și se usucă pe sulfat de magneziu. Se filtrează și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduu prin cromatografie pe silica gel, eluand cu acetat de etil:diclorometan (0-50% gradient) pentru a da compusul din titlu (4,15 g, 66%). ES/MS *m/e* ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 522/524 [M+H].

Prepararea 24

N-[(4aS,5S,7aS)-5-Acetil-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă

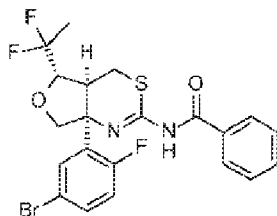


Schema 1, etapa L: Se adaugă în picătură la o soluție de -78 °C de (4aS,5S,7aS)-2-benzamido-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-N-metoxi-N-metil-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-5-carboxamidă (1,51 g, 2,89 mmol) în THF (57,8 mL) bromură de metilmagneziu (3,0 mol/L în dietil eter, 4,8 mL, 14,5 mmol). Se agită reacția la -78 °C timp de 5 minute și se lasă să se încălzească gradual până la temperatura ambiantă. Se agită timp de 30 de minute. Se stinge reacția cu metanol (4 mL), se diluează cu clorură de amoniu saturată, și se extrage cu acetat de etil. Se combină extractul organic și se usucă pe sulfat de sodiu. Se filtrează și se concentrează sub

presiune redusă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduul prin cromatografie pe silica gel, eluand cu acetat de etil: hexani (0-100% gradient) pentru a da compusul din titlu (1,28 g, 93%). ES/MS *m/e* ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 477/479 [M+H].

Prepararea 25

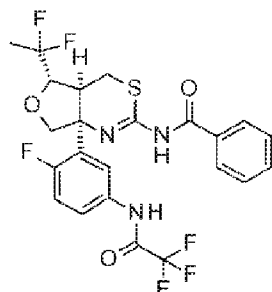
- 5 **N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Bromo-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă**



- 10 Schema 1, etapa M: Se adaugă împreună diclorometan (34 mL), trifluorură de bis(2-metoxietil)aminosulf (1,52 mL, 6,88 mmol), și bor trifluorură dietil eterat (0,89 mL, 6,88 mmol). Se agită la temperatura ambiantă timp de 2 ore. Se adaugă N-[(4aS,5S,7aS)-5-acetil-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă (0,821 g, 1,72 mmol) într-o porție, urmată de trihidrofluorură de trietilamină (1,13 mL, 6,88 mmol). Se agită la temperatura ambiantă timp de 18 ore. Se toarnă în clorură de amoniu saturată, se separă fazele, și se extrage
- 15 faza apoasă cu acetat de etil. Se combină extractul organic și se usucă pe sulfat de magneziu. Se filtrează și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduul prin cromatografie pe silica gel, eluand cu diclorometan: hexani (80-100 % gradient), pentru a da compusul din titlu (0,552 g, 64%). ES/MS *m/e* ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 499/501 [M+H].

Prepararea 26

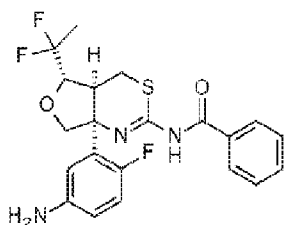
- 20 **N-[(5S,7aS)-5-(1,1-Difluoroetil)-7a-{2-fluoro-5-[(trifluoroacetil)amino]fenil}-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă**



- 25 Schema 5, etapa A: Se dizolvă N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluorofenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă (234 g, 454,6 mmol) în 1,4-dioxan (2 L) și se adaugă site moleculare de 4 A (37 g), 2,2,2-trifluoroacetamidă (91 g, 780,9 mmol), carbonat de potasiu fin măcinat (114 g, 824,9 mmol), iodură de sodiu (117 g, 780,6 mmol), iodură de cupru (I) (17,5 g, 91,9 mmol) și trans-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexan diamină racemică (20 g, 140,6 mmol) sub un curent de azot. Se purjează vasul cu 3 schimburi de azot cu vid și se încălzește la 123 °C timp de 18 ore. Se răcește la temperatura ambiantă și se filtrează soluția prin
- 30 pământ de diatomee, și se spală cu acetat de etil. Se adaugă clorură de amoniu apoasă saturată (2 L) și se agită viguros timp de 45 de minute. Se separă straturile și se spală stratul organic cu clorură de amoniu apoasă saturată (3 × 1 L), saramură (300 mL), se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se evaporă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduul prin cromatografie pe silica
- 35 gel eluand cu 0-100% acetat de etil în izo-hexan pentru a da compusul din titlu ca solid galben deschis (297,9 g, 95%, 81% puritate). ES/MS: *m/z* 532,0 [M+H].

Prepararea 27

- 40 **N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă**



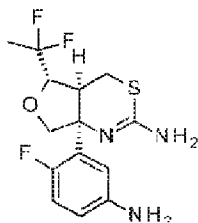
Schema 1, etapa N: Se combină N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-bromo-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă (0,372 g, 0,74 mmol) și (1R,2R)-N,N'-dimetil-1,2-ciclohexandiamină (0,037 mL, 0,22 mmol) în etanol (30 mL). Se adaugă azidă de sodiu (0,194 g, 2,98 mmol), urmată de ascorbat de sodiu (0,66 M soluție, 0,50 mL, 0,33 mmol). Se purjează vârful flaconului cu azot și se adaugă sulfat cupric (0,33 M soluție, 0,68 mL, 0,22 mmol). Se încălzește amestecul de reacție până la 80 °C și se agită timp de 5 ore. Se răcește reacția și se adaugă apă rece. Se extrage amestecul cu acetat de etil. Se combină extractul organic și se usucă pe sulfat de sodiu. Se filtrează și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se combină reziduu cu paladiu (10 masă% pe carbon, 0,35 g, 0,16 mmol) în etanol (50 mL) și THF (10 mL). Se purjează amestecul cu azot și cu hidrogen. Se agită la temperatura ambiantă sub 50 psi de hidrogen timp de 1 oră. Se filtrează catalizatorul și se spală cu acetat de etil. Se concentrează soluția sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduu prin cromatografie pe silica gel, eluând cu acetat de etil: diclorometan (0-20% gradient), pentru a da compusul din titlu (0,2184 g, 67%). ES/MS m/z 436 (M+H).

Prepararea 27 alternativă

Schema 5, etapa B: Se adaugă 7 N amoniac în metanol (600 mL, 4,2 mol) la o suspensie agitată de N-[(5S,7aS)-5-(1,1-difluoroetil)-7a-{2-fluoro-5-[(trifluoroacetil)-amino]fenil}-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă (250 g, 80% puritate, 376,3 mmol) în metanol (200 mL) la temperatura camerei și se agită la temperatura ambiantă timp de 18 ore. Se evaporă la sec pentru a da compusul din titlu ca gumă maro (190 g, 375,2 mmol, 86% puritate). ES/MS: m/z 436,0 [M+H].

Prepararea 28

(4aS,5S,7aS)-7a-(5-Amino-2-fluorofenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4a,5,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,4-d][1,3]tiazin-2-amină

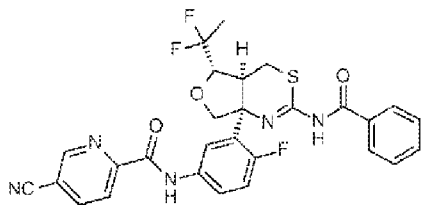


Schema 4, etapa A: Se dizolvă N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă (216,4 g, 88% puritate, 435,9 mmol) în piridină (400 mL), etanol (100 mL) și THF (300 mL). Se adaugă clorhidrat de O-metilhidroxilamină (190 g, 2275,0 mmol) și se agită la temperatura ambiantă timp de 18 ore. Se diluează cu 2-metiltetrahidrofuran (1 L) și se spală cu apă (2 × 300 mL). Se izolează stratul organic și se adaugă 35% hidroxid de amoniu apos (100 mL) la cel apos. Se extrage cu 2-metiltetrahidrofuran (300 mL) apoi se saturează cu clorură de sodiu și se extrage cu 2-metiltetrahidrofuran (2 × 300 mL). Se combină extractele organice, se spală cu saramură (300 mL), și se evaporă până la un reziduu. Se dizolvă în metanol (200 mL), se adaugă 7 N amoniac în metanol (100 mL, 700 mmol) și se agită la temperatura camerei timp de 18 ore. Poate fi adăugat amoniac suplimentar dacă rămâne orice impuritate de trifluoroacetamidă. Se îndepărtează solvenul sub presiune redusă și se dizolvă reziduu în soluție apoasă de 2 N acid clorhidric apos (1,5 L). Se extrage cu diclorometan (6 × 500 mL), se combină straturile organice și se îndepărtează solvenul sub presiune redusă până la un volum total de aproximativ 1 L. Se spală cu acid clorhidric apos 2 N (300 mL) și se combină toate spălările apoase. Se adaugă 2-metiltetrahidrofuran (1 L) și se agită viguros în timp ce se ajustează pH-ul până la bazic cu bicarbonat de sodiu până când nu este observată nici o evoluție de gaz. Se separă straturile și se extrage aposul cu 2-metiltetrahidrofuran (2 × 500 mL). Se usucă extractele organice combinate cu sulfat de magneziu, se filtrează, și se evaporă pentru a da un solid maro. Se purifică reziduu prin cromatografie pe silica gel eluând cu 0-100% diclorometan în THF. Se evaporă produsul conținând fracțiuni cu acetat de etil/heptan

pentru a da compusul din titlu ca pulbere bej fină (106 g, 70%, 95% puritate). ES/MS: m/z 332,0 [M+H], $[\alpha]_D^{20} = +42,11^\circ$ (C= 0,532, cloroform).

Prepararea 29

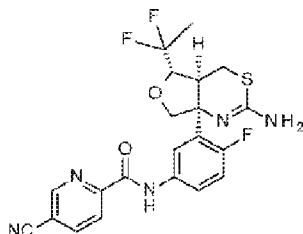
- 5 **N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-Benzamido-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă.**



- 10 Schema 3, Etapa A: Se adaugă N,N-diizopropiletilamină (0,032 mL, 0,1837 mmol) la un amestec de N-[(4aS,5S,7aS)-7a-(5-amino-2-fluoro-fenil)-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-2-il]benzamidă (0,040 g, 0,09185 mmol), acid 5-cianopiridin-2-carboxilic (0,0203 g, 0,1378 mmol) și 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (0,0191 g, 0,1378 mmol) în diclorometan (2 mL) și dimetilformamidă (0,5 mL). Se adaugă clorhidrat de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimidă (0,026 g, 0,1378 mmol) într-o porție. Se agită amestecul de reacție la temperatura ambiantă timp de 18 ore. Se diluează cu acetat de etil, și se spală cu apă și saramură. Se extrage cu acetat de etil. Se combină extracțele organice și se usucă pe sulfat de sodiu. Se filtrează și se concentrează sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduu prin cromatografie pe silica gel, eluand cu metil-*tert*-butil eter: diclorometan (0-10% gradient), pentru a da compusul din titlu (0,0465 g, 90%). ES/MS m/z 566 (M+1).

20 Exemplul 1

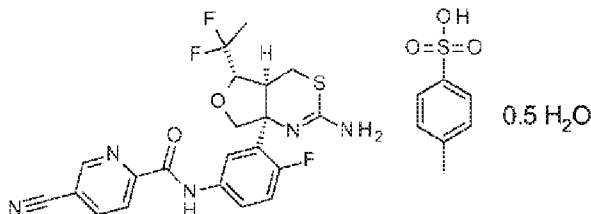
N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-Amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă



- 25 Schema 3, Etapa B: Se încălzește până la 50 °C timp de 18 ore un amestec de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-benzamido-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă (0,0465 g, 0,0822 mmol), clorhidrat de O-metilhidroxilamină (0,0687 g, 0,8220 mmol) și piridină (0,066 mL, 0,8220 mmol) în THF (1,5 mL) și etanol (1,5 mL). Se concentrează amestecul sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Se purifică reziduu prin cromatografie pe silica gel, eluand cu 7 N NH₃ în metanol: diclorometan (0-2% gradient), pentru a da compusul din titlu (0,026 g, 68%). ES/MS m/z 462 (M+1).

Exemplul 1a

- 35 **N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-Amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă 4-metilbenzensulfonat hemihidrat (1:1:0,5)**



- 40 Se adaugă N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă (150 mg, 0,33 mmol) și THF (2 mL) împreună și se agită la temperatura camerei pentru a se dizolva. Se adaugă acid p-

toluensulfonic hidrat (0,095 g, 0,5 mmol) și se încălzește soluția până la 50 °C. Se adaugă apă în alicote de 200 microlitri și se observă precipitarea după aproximativ 2 mL de adăugare totală. Se agită la 50 °C timp de câteva ore pentru a da o suspensie groasă. Se adaugă THF suplimentar (1 mL) pentru a îmbunătăți amestecarea. Se răcește la temperatura camerei timp de câteva ore și se filtrează prin filtrare în vid. Se spală cu minimum de THF. Se lasă să se usuce la aer peste noapte pentru a da compusul din titlu.

Prepararea alternativă din Exemplul 1a

N-[3-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-Amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă 4-metilbenzensulfonat hemihidrat (1:1:0,5)

Se adaugă N-[3-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidro-furo[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă (1,5 g, 3,3 mmol) și THF (12 mL) împreună și se agită la temperatura camerei pentru a se dizolva. Se încălzește până la 60 °C și se adaugă acid *p*-toluensulfonic hidrat (0,75 g, 3,96 mmol) și apă (5 mL). Se formează un precipitat alb după 5 minute de agitare. Se agită la 60 °C timp de cateva ore pentru a da o suspensie groasă. Se răcește la temperatura camerei în câteva ore și se filtrează prin filtrare în vid. Se lasă să se usuce la aer peste noapte pentru a da compusul din titlu.

Difracția în pulbere cu raze X (XRD)

Tiparele XRD ale solidelor cristaline sunt obținute pe un difractometru cu raze X în pulbere Bruker D4 Endeavor, echipat cu o sursă de CuKα ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) și un detector Vantec, care operează la 35 kV și 50 mA. Mostră este scanată între 4 și 40° în 2θ, cu o dimensiune a etapei de 0,009° în 2θ și o rată de scanare de 0,5 secunde/etapă, și cu divergență de 0,6 mm, anti-împrăștiere fixată la 5,28, și fante detectoare de 9,5 mm. Pulberea uscată este ambalată pe un suport de cuarț pentru mostre și este obținută o suprafață netedă utilizând o lamelă din sticlă. Tiparele de difracție ale formelor cristaline sunt colectate la temperatura ambiantă și la umiditate relativă. Este bine cunoscut în domeniul cristalografiei că, pentru orice formă dată de cristal, intensitățile relative ale vârfurilor de difracție pot varia din cauza orientării preferate care rezultă de la factori cum ar fi morfologia cristalului și obișnuința. Unde sunt prezente efectele orientării preferate, intensitățile vârfurilor sunt modificate, dar pozițiile caracteristice ale varfurilor polimorfei sunt nemodificate. Vezi, *de exemplu*, Farmacopeea Statelor unite #23, Formularul Național #18, paginile 1843-1844, 1995. Mai mult, este de asemenea bine cunoscut în domeniul cristalografiei că pentru orice formă dată de cristal pozițiile angulare ale vârfurilor pot varia puțin. De exemplu, pozițiile vârfurilor se pot schimba din cauza unei variații a temperaturii sau umidității la care o mostră este analizată, a deplasării mostrei, sau a prezenței sau absenței unui standard intern. În cazul prezent, o variabilitate a poziției vârfului de $\pm 0,2$ în 2θ va ține seama de aceste variații potențiale fără a împiedica identificarea fără echivoc a formei de cristal indicate. Confirmarea unei forme de cristal poate fi făcută pe baza a orice combinație unică de vârfuri distinctive (în unități de ° 2θ), de obicei vârfurile mai proeminente. Tiparele de difracție ale formelor cristaline, colectate la temperatura ambiantă și la umiditate relativă, sunt ajustate pe baza varfurilor standardului NIST 675 la 8,853 și 26,774 °2-teta.

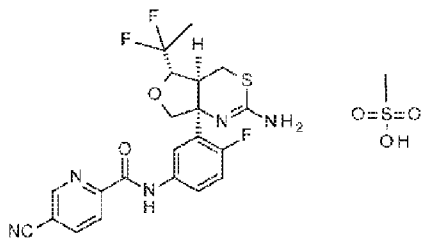
O mostră preparată a cristalinului de N-[3-[(4a*S*,5*S*,7a*S*)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă 4-metilbenzensulfonat hemihidrat (1:1:0,5) este caracterizată printr-un tipar de XRD utilizand radiație CuKα ca având vârfurile de difracție (valori 2-teta) cum s-au descris în Tabelul 1, și în particular având vârfuri la 6,8° în combinație cu unul sau mai multe din vârfurile selectate din grupul constând din 19,7°, 14,9°, și 10,3°; cu o toleranță pentru unghiurile de difracție de 0,2 grade.

Tabelul 1: Vârfurile difracției în pulbere cu raze X ale cristalinului din Exemplul 1a

Pozițiile vârfurilor Exemplului 1a		
Varf	Unghi (°2-Teta) +/-0,2°	Intensitate relativă (% celui mai intens vârf)
1	5,9	12,5%
2	6,8	100,0%
3	10,3	17,2%
4	14,9	18,7%
5	18,8	3,7%
6	19,7	46,5%
7	21,0	14,3%
8	24,5	4,8%
9	28,6	8,1%
10	39,7	5,1%

Exemplul 1b

Metansulfonat de N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă



Se adaugă N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidro-furo[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă (150 mg, 0,33 mmol) și THF (2 mL) împreună și se agită la temperatura camerei pentru a se dizolva. Se adaugă acid metansulfonic (0,095 g, 0,5 mmol) și se încălzește soluția până la 50 °C. Se adaugă apă în alicote de 200 microlitri până la 2 mL de adăugare totală. Se agită la 25 °C și nu se observă precipitare. Se concentrează sub azot la ½ de volum și este observat un precipitat. Se încălzește suspensia până la 60 °C și este observată o soluție clară după aproximativ 10 minute. Se încălzește la 60 °C timp de 1 oră. Se răcește la temperatura camerei pentru a da o suspensie albă și se agită amestecul timp de câteva ore. Se izolează solidul prin filtrare în vid și se spală cu o cantitate minimă de apă. Se lasă să se usuce cu aer peste noapte pentru a da compusul din titlu ca solid cristalin.

Proceduri de testare *in vitro*:

Pentru a evalua selectivitatea BACE1 față de BACE2, compusul de testat este evaluat în FRET și teste enzimaticale ale bazei de detecție a imunotestului utilizând substraturi specifice pentru BACE1 și BACE2 cum s-a descris mai jos. Pentru testele *in vitro* enzimaticale și celulare, compusul de testat este preparat în DMSO pentru a face o soluție de stoc de 10 mM. Soluția stoc este diluată serial în DMSO pentru a obține o curbă de diluție de zece puncte cu concentrații finale ale compusului care variază de la 10 μM până la 0,05 nM într-o placă cu 96 de godeuri cu fund rotund înainte de efectuarea testelor *in vitro* enzimaticale și cu celule întregi.

Teste de inhibare a proteazei *in vitro*:**Expresia de huBACE1:Fc și huBACE2:Fc.**

BACE1 umană (număr de acces: AF190725) și BACE2 umană (număr de acces: AF 204944) sunt clonate din ADNc de creier total prin RT-PCR. Secvențele nucleotidice corespunzătoare secvențelor de aminoacizi #1 până la 460 sunt inserate în ADNc care codifică polipeptida de IgG₁ umană (Fc) (Vassar și colab., Science, 286, 735-742 (1999)). Această proteină de fuziune a BACE1(1-460) sau BACE2(1-460) și Fc uman, denumită huBACE1:Fc și respectiv huBACE2:Fc, este construită în vectorul pJB02. BACE1(1-460):Fc umană (huBACE1:Fc) și BACE2(1-460):Fc umană (huBACE2:Fc) sunt exprimate tranzitoriu în celulele HEK293. ADNc (250 μg) al fiecărui construct se amestecă cu Eugene 6 și se adaugă la 1 litru de celule HEK293. La patru zile după transfectare, mediul condiționat se recoltează pentru purificare. huBACE1:Fc și huBACE2:Fc sunt purificate prin cromatografie cu Proteină A cum s-a descris mai jos. Enzimele sunt depozitate la -80 °C în alicote mici. (Vezi Yang, și colab., J. Neurochemistry, 91(6) 1249-59 (2004)).

Purificarea huBACE1:Fc și huBACE2:Fc.

Sunt colectate mediile condiționate ale celulelor HEK293 transfectate tranzitoriu cu ADNc de huBACE1:Fc sau huBACE2:Fc. Resturile celulare sunt îndepărtate prin filtrarea mediului condiționat prin filtru steril de 0,22 μm. Se adaugă 5 ml de Proteină A-agaroză (volum de pat) la 4 litri de mediu condiționat. Acest amestec este agitat ușor peste noapte la 4 °C. Se colectează Proteina A-rășină agaroză și se ambalează într-o coloană de cromatografie cu presiune joasă. Coloana este spălată cu 20× volume de pat de PBS la un debit de 20 ml per oră. Proteina huBACE1:Fc sau huBACE2:Fc legată este eluată cu 50 mM acid acetic, pH 3,6, la un debit de 20 ml per oră. Frațiuni de 1 ml de eluent sunt neutralizate imediat cu acetat de amoniu (0,5 ml 200 mM), pH 6,5. Puritya produsului final este evaluată prin electroforeză în 4-20% Tris-Glicină SDS-PAGE. Enzima este depozitată la -80 °C în alicote mici.

Testul BACE1 cu FRET

Sunt preparate diluții seriale ale compusului de testat cum s-a descris mai sus. Compusul este diluat suplimentar de 20⁷ în tampon de KH₂PO₄. Se adaugă 10 μL din fiecare diluție la fiecare godeu de la rândul A până la H al unei plăci negre cu legare scăzută a proteinei corespunzătoare conținând amestecul de reacție (25 μL de 50 mM KH₂PO₄, pH 4,6, 1 mM TRITON® X-100, 1 mg/mL BSA, și 15 μM de substrat FRET bazat pe secvența APP) (Vezi Yang, și colab., J. Neurochemistry, 91(6) 1249-59 (2004)). Conținutul este amestecat bine pe un agitator de placă timp de 10 minute. Se adaugă 15 μL de 200 pM BACE1(1-460):Fc umană (Vezi Vasser, și colab., Science, 286, 735-741 (1999)) în tamponul KH₂PO₄ la placa conținând substrat și compusul de testat pentru a iniția reacția. RFU a amestecului la timpul 0 este înregistrată la lungimea de undă a excitației de 355 nm și lungimea de undă a emisiei de 460 nm, după amestecarea scurtă pe un agitator de placă. Placa de reacție este acoperită cu folie de aluminiu și ținută într-un cuptor umidificat întunecat la temperatura camerei timp de 16 până la 24 de ore. RFU la sfârșitul incubării este înregistrată cu aceleași setări de excitație și emisie utilizate la timpul 0. Diferența de RFU la timpul 0 și sfârșitul incubării este reprezentativă pentru activitatea BACE1 sub tratamentul cu compusul. Diferențele RFU sunt reprezentate grafic versus concentrația inhibitoare și este ajustată o curbă cu o ecuație logistică cu patru parametri pentru a obține valoarea IC₅₀. (May, și colab., Journal of Neuroscience, 31, 16507-16516 (2011)).

Compusul din Exemplul 1 este testat în mod esențial cum s-a descris mai sus și prezintă o IC₅₀ pentru BACE1 de 0,509 nM ± 0,104, n= 4 (Medie ± deviație standard a mediei). Aceste date demonstrează că compusul din Exemplul 1 inhibă activitatea enzimei BACE1 recombinantă purificată *in vitro*.

Testul BACE2 cu MBP-C125Swe

Sunt preparate diluții seriale de 10 puncte ale compușilor testați în intervalul adecvat. Compușii sunt diluați suplimentar de 6× în tamponul de testare de acetat de amoniu (50 mmol acetat de amoniu, pH 4,6, 1 mM Triton X-100, 1 mg/mL BSA). Se adaugă 10 μL din fiecare diluție la fiecare godeu de pe rândul A până la H al unei plăci cu legare scăzută a proteinei corespunzătoare la care sunt pre-adăugați 10 μL dintr-un substrat derivat din *Escherichia coli* purificat de afinitate (MBPC125Swe, 1 μg/mL) pentru activitatea BACE2. Conținutul este amestecat bine pe un agitator de placă timp de 10 minute. Se adaugă 10 μL de 200 picomolar BACE2 (1-460):Fc umană în același tampon de reacție descris mai sus la placa conținând substrat și compușii testați pentru a iniția reacția. După 4 ore, reacția este oprită prin adăugare de tampon de oprire (40 μL). Cantitatea de produs este măsurată prin ELISA utilizând MBP-C26Swe standard. Este imobilizat anticorp anti-MBP pe suprafața unei plăci din polistiren cu legare ridicată și blocat utilizând un tampon de blocare cazeină/PBS. Mostră sau standard (40 μL) se adaugă la placa ELISA și se incubează la 4 °C peste noapte. Plăcile sunt apoi spălate și se adaugă 40 μL din anticorpul de detecție specific clivării (GN405) și se lasă să stea timp de o oră la temperatura camerei. GN405 nelegat este apoi îndepărtat prin spălare și 40 μL de conjugat de capră anti-iepure-HRP (Southern Biotech, 4010-05) se adaugă la placă și se lasă să stea timp de 1 oră la temperatura camerei. Placa este spălată din nou și se adaugă substrat TMB (40 μL). Cantitatea corespunzătoare de produs eliberat este o măsură a activității BACE2 în soluție la orice concentrație testată de inhibitor. Curba de inhibare de 10 puncte este reprezentată grafic și adaptată cu ecuația logistică cu patru parametri pentru a obține valorile EC₅₀ și IC₅₀. (Vezi: Sinha, și colab., Nature, 402, 537-540 (2000)).

Compusul din Exemplul 1 este testat în mod esențial cum s-a descris mai sus și prezintă o IC₅₀ a BACE2 de 17,6 nM ± 7,4, n=6 (Medie ± deviație standard a mediei). Raportul BACE1 (test enzimatic al IC₅₀ cu FRET) la BACE2 (test celular cu MBP-C125Swe) este de aproximativ 35 de ori, care indică selectivitate funcțională pentru inhibarea enzimei BACE1. Datele stabilite mai sus demonstrează că compusul din Exemplul 1 este selectiv pentru BACE1 față de BACE2.

Testul pe celulele întregi SH-SY5YAPP695Wt

Testul pe celule întregi de rutină pentru măsurarea inhibării activității BACE1 utilizează linia celulară de neuroblastom uman SH-SY5Y (Nr. ATCC de acces CRL2266) care exprimă stabil un ADNc de APP695Wt umană. Celulele sunt utilizate în mod obișnuit până la trecerea cu numărul 6 și apoi îndepărtate.

Celulele SH-SY5YAPP695Wt sunt placcate în plăci cu 96 de godeuri pentru cultură de țesut la 5,0×10⁴ celule/godeu în 200 μL mediu de cultură (50% MEM/EBSS și F12 al lui Ham, 1× fiecare piruvat de sodiu, aminoacizi neesențiali și NaHCO₃ conținând 10% FBS). Ziua următoare, mediul este îndepărtat din celule, este adăugat mediu proaspăt apoi se incubează la 37 °C timp de 24 de ore în prezența/absența compusului de testat la intervalul de concentrație dorită.

La sfârșitul incubării, mediile condiționate sunt analizate pentru dovada activității beta-secretazei prin analiza peptidelor Abeta 1-40 și 1-42 prin ELISA de tip sandwich specifice. Pentru a măsura aceste izoforme specifice de Abeta, este utilizat 2G3 monoclonal ca anticorp de captură pentru Abeta 1-40 și 21F12 monoclonal ca anticorp de captură pentru Abeta 1-42. Atât ELISA de Abeta 1-40 cât și de Abeta 1-42 utilizează 3D6 biotinitat ca anticorp raportor (pentru descrierea anticorpilor, vezi Johnson-Wood, și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. SUA 94, 1550-1555 (1997)). Concentrația de Abeta eliberată în mediul condiționat după tratamentul cu compusul corespunde cu activitatea BACE1 în astfel de condiții. Curba de inhibare de 10 puncte este reprezentată grafic și este adaptată cu ecuația logistică cu patru parametri pentru a obține valorile IC₅₀ pentru efectul de scădere a Abeta.

Compusul din Exemplul 1 este testat în mod esențial cum s-a descris mai sus și prezintă o IC₅₀ de 0,157 nM ± 0,048, n=4 pentru ELISA de A-beta (1-40) cu SH-SY5YAPP695Wt și o IC₅₀ de 0,177 nM ± 0,050, n=4 pentru ELISA de A-beta (1-42) cu SH-SY5YAPP695Wt (Medie ± deviație standard a mediei). Datele stabilite mai sus demonstrează că compusul din Exemplul 1 inhibă BACE1 în testul cu celule întregi.

Inhibarea *in vivo* a beta-secretazei

Mai multe modele la animale, incluzând șoarece, porc de guinea, câine, și maimuță, pot fi utilizate pentru a evalua inhibarea activității beta-secretazei *in vivo* după tratamentul cu compusul. Animalele utilizate în această invenție pot fi animale de tip sălbatic, transgenice, sau cu gene knockout (eliminate). De exemplu, modelul la șoarece de PDAPP, preparat cum s-a descris în Games și colab., Nature 373, 523-527 (1995), și alte animale ne-transgenice sau cu gene knockout sunt utile pentru a analiza inhibarea *in vivo* a producției de Abeta și sAPPbeta în prezența compușilor inhibitori. În general, șoarecilor în vârstă de 2 luni cu PDAPP, șoarecilor cu gene knockout sau animalelor ne-transgenice le sunt administrate compusul formulat în vehicule, cum ar fi ulei de porumb, beta-ciclodextran, tampoane de fosfat, PHARMASOLVE®, sau alte vehicule adecvate pe cale orală, subcutanată, intra-venoasă, prin hrănire, sau pe altă cale de administrare. La 1 până la 24 de ore după administrarea compusului, animalele sunt sacrificate, și creierul este îndepărtat pentru analiza Abeta 1-x. „Abeta 1-x” așa cum s-a utilizat în acest document se referă la suma speciilor de Abeta care începe cu restul 1 și se termină cu un C-terminal mai mare decât restul 28. Aceasta detectează majoritatea speciilor de Abeta și este adesea denumită „Abeta totală”. Nivelurile de peptide Abeta totale (Abeta 1-x) sunt măsurate cu o ELISA sandwich, utilizând 266 monoclonal ca anticorp de captură și 3D6 biotinitat ca anticorp raportor. (Vezi May, și colab., Journal of Neuroscience, 31, 16507-16516 (2011)).

Pentru studiile acute, este administrat compusul sau vehiculul adecvat și animalele sunt sacrificate la aproximativ 3 ore după dozare. Este obținut țesutul cerebral, de la animalele selectate și este analizat pentru prezența Abeta 1-x. După dozarea cronică țesuturile cerebrale ale animalelor transgenice cu APP mai în vârstă pot fi de asemenea analizate pentru cantitatea de plăci de beta-amiloid după tratamentul cu compusul.

Animalele (șoareci transgenici cu PDAPP sau altă APP sau ne-transgenici) cărora li s-a administrat un compus inhibitor pot prezenta o reducere a Abeta în țesuturile cerebrale, în comparație cu controalele tratate cu vehicul sau controalele de la timpul zero. De exemplu, o doză orală de 0,1, 0,3, și 1 mg/kg din Exemplul 1, la șoarecii tineri femele cu PDAPP a redus nivelurile de peptide Abeta 1-x în hipocampusul creierului cu 32%, 40%, și 55% (toate valori p < 0,01), în mod respectiv. În țesutul cortical al creierului, dozele de 0,1, 0,3, și 1 mg/kg din Exemplul 1 au redus nivelurile de Abeta 1-x cu 38%, 50%, și 67% (toate valori p < 0,01) în comparație cu șoarecii tratați cu vehicul la trei ore după dozare.

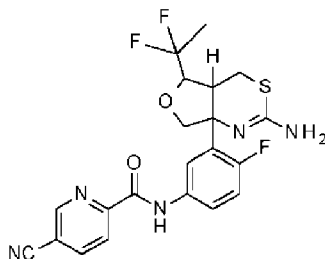
Data fiind activitatea compusului din Exemplul 1 împotriva enzimei BACE1 *in vitro*, aceste efecte de scădere a Abeta sunt în concordanță cu inhibarea BACE1 *in vivo*, și demonstrează suplimentar penetrarea SNC a compusului din Exemplul 1.

Aceste studii arată că compușii prezentei invenții inhibă BACE1 și sunt, priuți în reducerea nivelurilor de Abeta.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

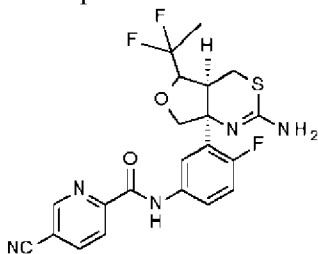
- JP-A- 2014 101 354
- US-B2- 8 338 407

(57) Revendicări:

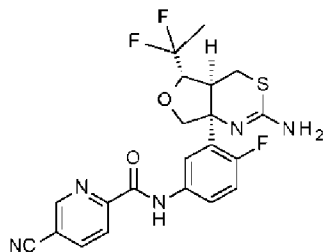


1. Un compus cu formula
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

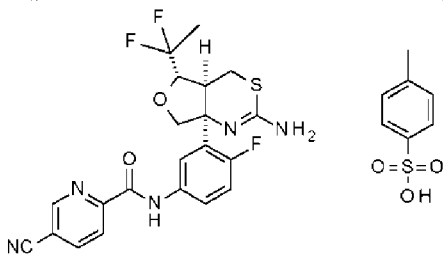
2. Compusul sau sarea acestuia în conformitate cu revendicarea 1 în care compusul este:



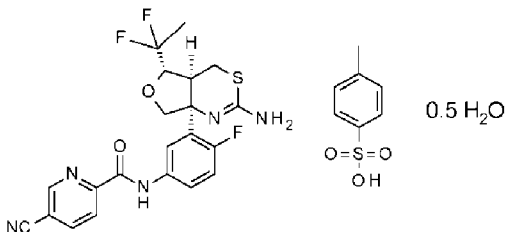
3. Compusul sau sarea acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 sau 2 în care compusul este:



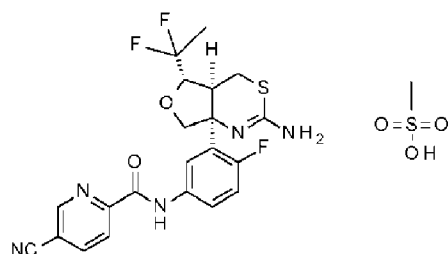
4. Sarea în conformitate cu revendicarea 3 care este:



5. Sarea în conformitate cu revendicarea 3 care este:



6. Sarea în conformitate cu revendicarea 3 care este:



7. Compusul sau sarea acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 3 în care compusul este N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluoro-fenil]-5-ciano-piridin-2-carboxa-midă.

8. Compusul în conformitate cu revendicarea 3 care este N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă.

9. Sarea în conformitate cu revendicarea 4 care este N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă 4-metilbenzensulfonat.

10. Sarea în conformitate cu revendicarea 5 care este N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă 4-metilbenzensulfonat hemihidrat.

11. Sarea în conformitate cu revendicarea 10 care este **caracterizată prin** un varf substanțial în spectrul de difracție cu raze X, la unghiul de difracție 2-teta de 6,8° în combinație cu unul sau mai multe dintre varfurile selectate din grupul constând din 19,7°, 14,9°, și 10,3°; cu o toleranță pentru unghiurile de difracție de 0,2 grade.

12. Sarea în conformitate cu revendicarea 6 care este N-[3-[(4aS,5S,7aS)-2-amino-5-(1,1-difluoroetil)-4,4a,5,7-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]tiazin-7a-il]-4-fluorofenil]-5-ciano-piridin-2-carboxamidă metansulfonat.

13. Un compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-12 pentru utilizare în terapie.

14. Un compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-12 pentru utilizare în tratamentul bolii Alzheimer.

15. Un compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-12 pentru utilizare în tratarea progresului deprecierii cognitive ușoare către boala Alzheimer.

16. O compoziție farmaceutică, cuprinzând un compus sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-12 cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic.

17. Un procedeu pentru prepararea unei compoziții farmaceutice, cuprinzând amestecarea unui compus sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-12 cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic.