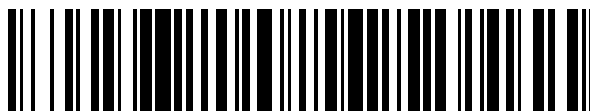


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 204**

51 Int. Cl.:

C07D 249/04 (2006.01)

C07D 249/12 (2006.01)

A61K 31/4192 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2012 PCT/US2012/041229**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12173850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2012 E 12729769 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2721012**

54 Título: **Derivados de ácido biciclo (3.1.0) hexano-2,6-dicarboxílico como agonistas del receptor mGlu2**

30 Prioridad:

17.06.2011 EP 11382208

12.08.2011 US 201161522791 P

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

21.10.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MAN, TERESA TSE KI;
MONN, JAMES ALLEN;
MONTERO SALGADO, CARLOS;
PRIETO, LOURDES;
WALTON, LESLEY y
TUPPER, DAVID EDWARD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 587 204 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de ácido biciclo (3.1.0) hexano-2,6-dicarboxílico como agonistas del receptor mGlu2

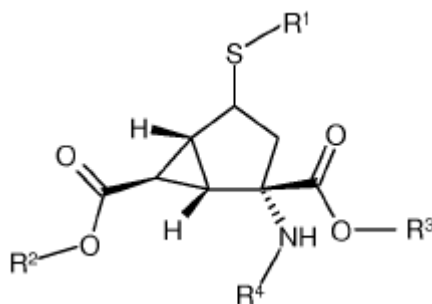
La presente invención se refiere a compuestos agonistas de receptor mGlu2, profármacos particulares de los mismos y sus sales, así como también a composiciones farmacéuticas y usos farmacéuticos de dichos compuestos, profármacos particulares, y sus sales.

El L-glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central y se hace referencia al mismo como un aminoácido excitador. Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu) son receptores acoplados a la proteína G que modulan la excitabilidad neuronal. El tratamiento de trastornos neurológicos o psiquiátricos se ha asociado a la activación selectiva de receptores de aminoácidos excitadores mGlu. Diversos estudios apoyan la activación del receptor mGlu del Grupo II (que incluye mGlu2 y/o mGlu3) para el tratamiento de esquizofrenia. Más particularmente, datos recientes demuestran que un agonista del receptor mGlu2/3 tiene propiedades antipsicóticas y puede proporcionar una nueva alternativa para el tratamiento de esquizofrenia. Estudios en ratones con inactivación de receptor mGlu2 y mGlu3 sugieren que la actividad de tipo antipsicótico de los agonistas del receptor mGlu2/3 es mediada por mGlu2. Los estudios demuestran también que los agonistas de mGlu2/3 tienen propiedades ansiolíticas, antidepresivas y neuroprotectoras. Por lo tanto, los agonistas del receptor mGlu2 pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos psiquiátricos, tales como trastorno bipolar (conocido también como trastorno maniaco depresivo), conocido también como trastorno maniaco depresivo, esquizofrenia y trastorno de ansiedad generalizada.

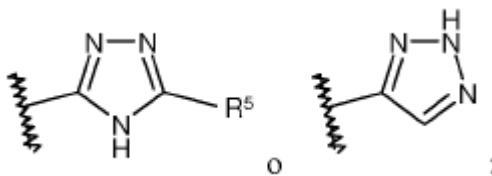
El documento W09717952 divulga ciertos compuestos biciclo[3.1.0]hexano 4-sustituídos que se afirma que son antagonistas o agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato. El compuesto W003104217 divulga compuestos de biciclo[3.1.0]hexano y heterobiciclo[3.1.0]hexano que se afirma que son formas de profármaco de compuestos agonistas del receptor mGlu2.

El tono glutamatérgico excesivo ha estado implicado en muchos estados de enfermedad del sistema nervioso central; sin embargo, existe una carencia de agentes efectivos para corregir dichos estados patofisiológicos en la práctica clínica. En particular, la aplicación clínica no ha sido puesta en práctica debido a una carencia de antagonistas de mGlu2 con propiedades apropiadas similares a fármaco. De esta manera, sigue existiendo una necesidad de potentes antagonistas de mGlu2. Existe también una necesidad de agonistas de mGlu2 eficaces. La presente invención proporciona novedosos biciclo[3.1.0]hexanos 4-sustituídos, incluyendo profármacos particulares de los mismos, los cuales proporcionan una mayor biodisponibilidad adecuada para desarrollo clínico, que son agonistas de mGlu2 potentes y eficaces. Dichos nuevos compuestos de la presente invención podrían dar respuesta a la necesidad de tratamientos potentes y efectivos de trastornos psiquiátricos tales como trastorno bipolar, esquizofrenia y trastorno de ansiedad generalizada.

La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula:



en la que R¹ es



R² es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo, en la que bencilo es opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, o alcoxi C₁-C₃; R³ es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo, en la que bencilo es opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor o alcoxi C₁-C₃; R⁴ es hidrógeno, (2S)-2-aminopropanoilo, (2S)-

2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4-metil-pentanoilo o 2-aminoacetilo; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo; con la condición de que cuando R² y/o R³ no son hidrógeno entonces R⁴ es hidrógeno; con la condición de que cuando R⁴ no es hidrógeno entonces R² y/o R³ son hidrógeno; con la condición de que R⁵ pueda ser hidrógeno cuando el átomo de azufre está unido al sistema de anillo biciclo[3.1.0]hexano en la configuración S: o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención proporciona un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de un trastorno psiquiátrico seleccionado de entre el grupo que consiste de trastorno bipolar, esquizofrenia y trastorno de ansiedad generalizada.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, la formulación comprende además uno o más de otros agentes terapéuticos.

La presente invención proporciona un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en terapia, en particular para el tratamiento de un trastorno psiquiátrico. Además, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno psiquiátrico. La presente invención proporciona también un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de un trastorno psiquiátrico.

La presente invención proporciona un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en terapia, en particular para el tratamiento del dolor. Además, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor. La presente invención proporciona también un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de un dolor.

La presente invención proporciona un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en terapia, en particular para el tratamiento de abuso de sustancias. Además, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de abuso de sustancias. La presente invención proporciona también un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de abuso de sustancias.

Adicionalmente, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de un trastorno psiquiátrico. Además, la presente invención proporciona realizaciones preferentes de los usos tal como se describe en la presente memoria, en los que el trastorno psiquiátrico se selecciona de entre el grupo que consiste en trastorno bipolar, esquizofrenia y trastorno de ansiedad generalizada.

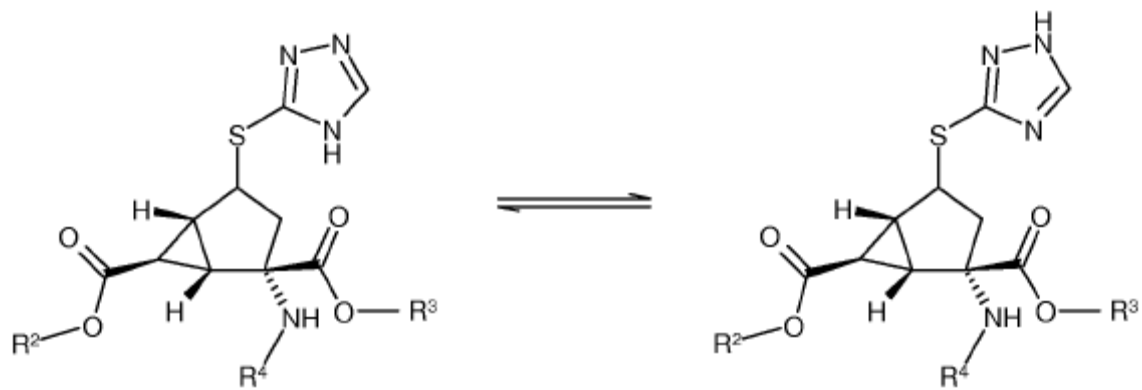
Además, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento del dolor. Además, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de abuso de sustancias.

Los términos químicos generales usados en las fórmulas anteriores y a lo largo de la memoria descriptiva tienen sus significados usuales. Por ejemplo, el término "alquilo C₁-C₃" es un grupo alquilo C₁-C₃ y se refiere a metilo, etilo, propilo e isopropilo. El término "alcoxi C₁-C₃" es un grupo alquilo C₁-C₃ unido a un átomo de oxígeno y se refiere a metoxi, etoxi, propoxi e isopropoxi.

Se considera que los términos "grupo protector de nitrógeno" o "grupo protector de amino" y "grupo protector de oxígeno" o "grupo protector de carboxilo" significan una fracción que es estable a condiciones de reacción proyectadas y aun así puede ser removida selectivamente por reactivos y condiciones de reacción compatibles con la amina o el ácido regenerados. Dichos grupos son bien conocidos por el experto en la materia y se describen en la literatura. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Cuarta edición, John Wiley & Sons, Inc., (2007).

El experto en la materia apreciará que los compuestos de la invención pueden existir en formas tautoméricas, tal como se representa por ejemplo en (1), a continuación. Cuando se proporciona cualquier referencia en la presente solicitud a uno o más tautómeros específicos de los compuestos de la invención, se entiende que abarca tanto las formas tautoméricas como todas las mezclas de los mismos.

5

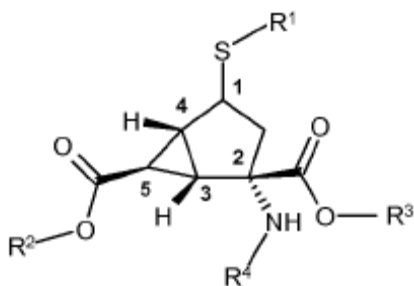


10

(1)

El experto en la materia apreciará que los compuestos de la invención están compuestos de un núcleo que contiene al menos cinco centros quirales:

15



20

(2)

25

Los compuestos con la configuración absoluta en los átomos etiquetados **2** a **5**, tal como se ilustra en (2) anterior, son compuestos preferentes de la invención. En el átomo etiquetado **1**, la configuración R es definida cuando el átomo de azufre está unido al sistema de anillo biciclo[3.1.0]hexano en la posición hacia abajo con relación a la posición plana del anillo tal como se indica mediante una unión punteada. Por el contrario, la configuración S es definida cuando el átomo de azufre está unido al sistema de anillo biciclo[3.1.0]hexano en la posición hacia arriba con relación a la posición plana del anillo tal como se indica mediante la unión de cuña sólida.

30

Adicionalmente, el experto en la materia apreciará que pueden crearse centros quirales adicionales en los compuestos de la invención mediante la selección de ciertas variables. En dicho caso, la presente invención contempla todos los enantiómeros o diastereómeros individuales, así como las mezclas de los enantiómeros y diastereómeros de dichos compuestos que incluyen racematos.

35

El experto en la materia apreciará también que las designaciones (R) o (S) de Cahn-Ingold-Prelog para todos los centros quirales variarán dependiendo de los patrones de sustitución del compuesto particular. Los enantiómeros o diastereómeros individuales pueden prepararse comenzando con reactivos quirales o mediante técnicas sintéticas estereoselectivas o estereoespecíficas. De manera alternativa, los enantiómeros o diastereómeros individuales pueden ser aislados a partir de mezclas mediante técnicas de cristalización o cromatográficas quirales estándares en cualquier punto conveniente en la síntesis de los compuestos de la invención. Los enantiómeros y diastereómeros individuales de los compuestos de la invención son una realización preferente de la invención.

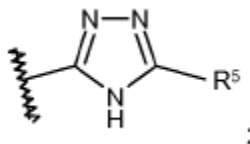
40

Los compuestos de la presente invención son capaces de reacción, por ejemplo, con un número de ácidos orgánicos e inorgánicos para formar sales de adición de ácido o sales de adición básica farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, (VCH/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, N° 1, Enero de 1977. Las sales farmacéuticamente aceptables preferentes son aquellas formadas con ácido clorhídrico.

Aunque todos los compuestos de la invención son útiles como agonistas de mGlu2, ciertas clases de compuestos son preferentes. Los párrafos siguientes describen dichas clases preferentes:

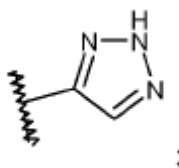
R¹ es

5



R¹ es

10



R² es hidrógeno;

R² es 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃;

15

R² es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃;

R² es bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃;

R³ es hidrógeno;

R³ es 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃;

R³ es bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃;

20

R³ es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃;

R⁴ es hidrógeno;

R⁴ es (2S)-2-aminopropanoilo, (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4-metil-pentanoilo o 2-aminoacetilo;

R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo;

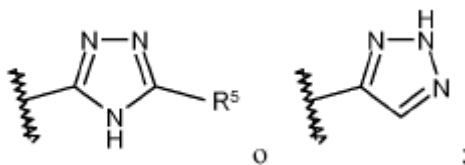
25

El compuesto de la invención es una sal farmacéuticamente aceptable;

El compuesto de la invención es la sal de clorhidrato.

Una realización preferente se refiere a compuestos de la presente invención en los que R¹ es

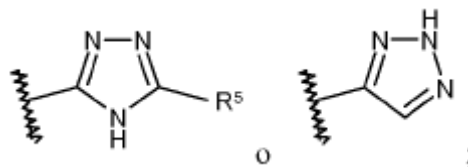
30



R² es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo, en el que bencilo es opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, o alcoxi C₁-C₃; R³ es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo, en el que bencilo es opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, o alcoxi C₁-C₃; R⁴ es hidrógeno, (2S)-2-aminopropanoilo, (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4-metil-pentanoilo o 2-aminoacetilo; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo; con la condición de que cuando R² y/o R³ no son hidrógeno entonces R⁴ es hidrógeno; con la condición de que cuando R⁴ no es hidrógeno entonces R² y/o R³ son hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

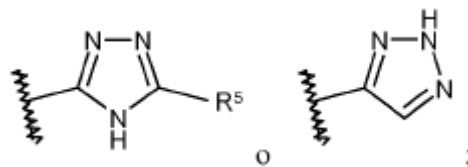
35

Otra realización preferente se refiere a compuestos de la presente invención en los que R¹ es



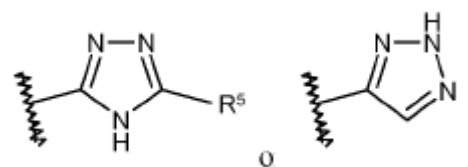
10 R² es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃; R³ es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃; R⁴ es hidrógeno, (2S)-2-aminopropanoilo, (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4-metil-pentanoilo o 2-aminoacetilo; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo; con la condición de que cuando R² y/o R³ no son hidrógeno entonces R⁴ es hidrógeno; con la condición de que cuando R⁴ no es hidrógeno entonces R² y/o R³ son hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una realización preferente adicional se refiere a compuestos de la presente invención en los que R¹ es



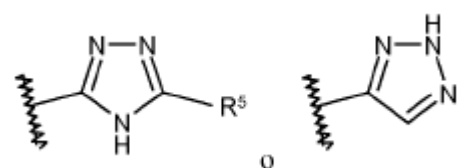
20 R² es hidrógeno, 2,2- dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃, u -OCH₃; R³ es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃; R⁴ es hidrógeno, (2S)-2-aminopropanoilo, (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4-metil-pentanoilo o 2-aminoacetilo; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo; con la condición de que cuando R¹ y/o R³ no son hidrógeno entonces R⁴ es hidrógeno; con la condición de que cuando R⁴ no es hidrógeno entonces R² y/o R³ son hidrógeno; con la condición de que R⁵ puede ser hidrógeno cuando el átomo de azufre está unido al sistema de anillo biciclo[3.1.0]hexano en la configuración S; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 Otra realización preferente se refiere a compuestos de la presente invención en los que R¹ es



35 R² es hidrógeno o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃; R³ es hidrógeno o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃; R⁴ es hidrógeno, (2S)-2- aminopropanoilo, (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4- metil-pentanoilo o 2-aminoacetilo; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo; con la condición de que cuando R² y/o R³ no son hidrógeno entonces R⁴ es hidrógeno; con la condición de que cuando R¹ no es hidrógeno entonces R² y/o R³ son hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una realización preferente adicional se refiere a compuestos de la presente invención en los que R¹ es

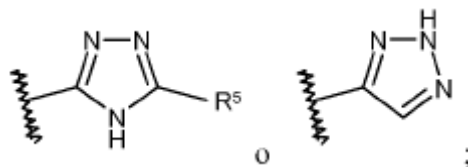


R² es hidrógeno o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃; R³ es hidrógeno o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃; R⁴ es hidrógeno, (2S)-2- aminopropanoilo, (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4-metil-pentanoilo o 2-aminoacetilo; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo; con la condición de que cuando R² y/o R³ no son

hidrógeno entonces R^4 es hidrógeno; con la condición de que cuando R^4 no es hidrógeno entonces R^2 y/o R^3 son hidrógeno; con la condición de que R^5 puede ser hidrógeno cuando el átomo de azufre está unido al sistema de anillo biciclo[3.1.0]hexano en la configuración S; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una realización preferente se refiere a compuestos de la presente invención en los que R^1 es

5

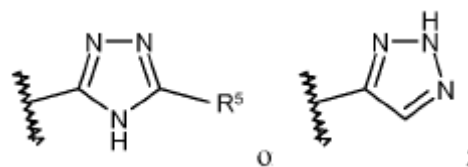


R^2 es 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, $-CF_3$ u $-OCH_3$; R^3 es 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, $-CF_3$ u $-OCH_3$; R^4 es hidrógeno; R^5 es alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, $-NH_2$ o ciclopropilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

Otra realización preferente se refiere a compuestos de la presente invención en los que R^1 es

15

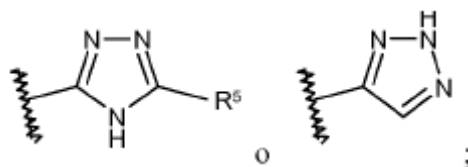


R^2 es 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, $-CF_3$ u $-OCH_3$; R^3 es 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, $-CF_3$ u $-OCH_3$; R^4 es hidrógeno; R^5 es alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, $-NH_2$ o ciclopropilo; con la condición de que R^5 puede ser hidrógeno cuando el átomo de azufre está unido al sistema de anillo biciclo[3.1.0]hexano en la configuración S; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

Una realización preferente adicional se refiere a compuestos de la presente invención en los que R^1 es

25

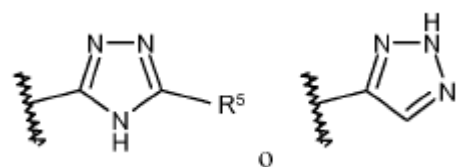


R^2 es bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, $-CF_3$ u $-OCH_3$; R^3 es bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, $-CF_3$ u $-OCH_3$; R^4 es hidrógeno; R^5 es alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, $-NH_2$ o ciclopropilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30

Una realización preferente adicional se refiere a compuestos de la presente invención en los que R^1 es

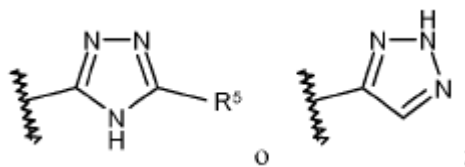
35



R^2 es bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, $-CF_3$ u $-OCH_3$; R^3 es bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, $-CF_3$ u $-OCH_3$; R^4 es hidrógeno; R^5 es alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, $-NH_2$ o ciclopropilo; con la condición de que R^5 puede ser hidrógeno cuando el átomo de azufre está unido al sistema de anillo biciclo[3.1.0]hexano en la configuración S; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40

Otra realización preferente adicional se refiere a compuestos de la presente invención en los que R^1 es



5 R² es hidrógeno; R³ es hidrógeno; R⁴ es (2S)-2-aminopropanoilo, (2S)-2- amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4-metil-pentanoilo o 2- aminoacetilo; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra realización preferente adicional se refiere a compuestos de la presente invención en los que R¹ es



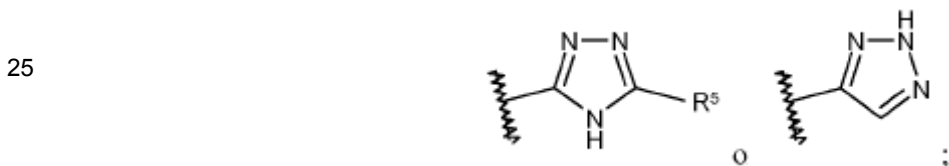
10 R² es hidrógeno; R³ es hidrógeno; R⁴ es (2S)-2-aminopropanoilo, (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4-metil-pentanoilo o 2-aminoacetilo; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo; con la condición de que R⁵ puede ser hidrógeno cuando el átomo de azufre está unido al sistema de anillo biciclo[3.1.0]hexano en la configuración S; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una realización especialmente preferente se refiere a compuestos de la presente invención en los que R¹ es



20 R² es hidrógeno; R³ es hidrógeno; R⁴ es hidrógeno; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una realización especialmente preferente se refiere a compuestos de la presente invención en los que R¹ es



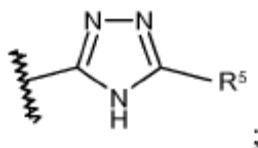
25 R² es hidrógeno; R³ es hidrógeno; R⁴ es hidrógeno; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo; con la condición de que R⁵ puede ser hidrógeno cuando el átomo de azufre está unido al sistema de anillo biciclo[3.1.0]hexano en la configuración S; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra realización especialmente preferente se refiere a compuestos de la presente invención en los que R¹ es



35 R² es hidrógeno; R³ es hidrógeno, R⁴ es hidrógeno; R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂, o ciclopropilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra realización especialmente preferente se refiere a compuestos de la presente invención en los que R¹ es



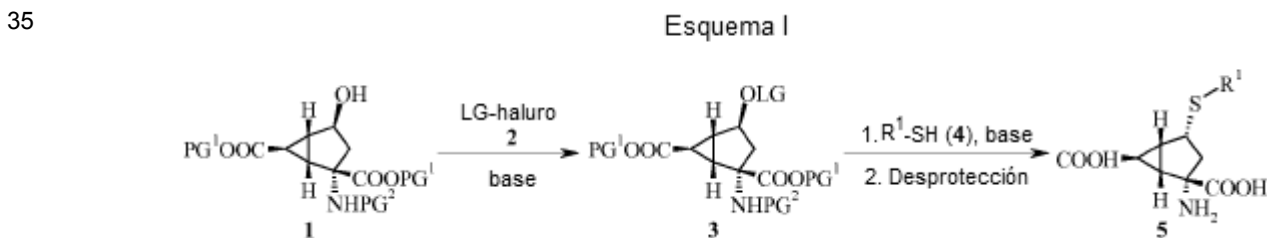
5 R^2 es hidrógeno; R^3 es hidrógeno, R^4 es hidrógeno; R^5 es alquilo C_1 - C_3 opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, $-NH_2$, o ciclopropilo; con la condición de que R^5 puede ser hidrógeno cuando el átomo de azufre está unido al sistema de anillo biciclo[3.1.0]hexano en la configuración S; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Los compuestos de la presente invención, o sus sales, pueden ser preparados mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustra en los Esquemas de reacción, Preparaciones y Ejemplos siguientes. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las rutas descritas pueden ser combinadas de diferentes maneras, o en conjunción con etapas de diferentes esquemas, para preparar compuestos de la invención, o sus sales. Los productos de cada etapa en los esquemas siguientes pueden ser recuperados mediante procedimientos convencionales, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización.

15 Ciertos centros estereoquímicos no han sido especificados y ciertos sustituyentes han sido eliminados en los siguientes esquemas de reacción en aras de la claridad y no pretenden limitar, de manera alguna, las enseñanzas de los esquemas de reacción. Además, los isómeros, enantiómeros o diastereómeros individuales pueden ser separados en cualquier punto conveniente en la síntesis de los compuestos de la invención mediante procedimientos tales como cromatografía quiral. Adicionalmente, los intermediarios descritos en los siguientes esquemas contienen un número de grupos protectores para los grupos carboxilo y amino. El grupo protector variable puede ser el mismo o diferente en cada caso, dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las transformaciones particulares a ser realizadas. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas por el experto en la materia y se describen en la literatura. Véase por ejemplo, Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, supra.

25 Las abreviaturas usadas en la presente memoria se definen según Aldrichimica Acta, Vol. 17, N° 1, 1984. Otras abreviaturas se definen como sigue: "tosilato" es p-toluensulfonilo; "mesilato" es metansulfonilo; "DIPEA" se refiere a diisopropiletamina; "DIC" se refiere a diisopropilcarbodiimida; "HATU" se refiere a hexafluorofosfato metanamino de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio; "HBTU" se refiere a hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio; "HOAt" se refiere a 1-hidroxi-7-azabenzotriazol; "PyBOP" se refiere a hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidin-fosfonio; "PyBrop" se refiere a hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidin fosfonio; "DMAP" se refiere a 4-dimetilaminopiridina; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "SCX" es intercambio catiónico fuerte; "N° Prep" es Número de Preparación; "N° Ej." es el Número de Ejemplo.

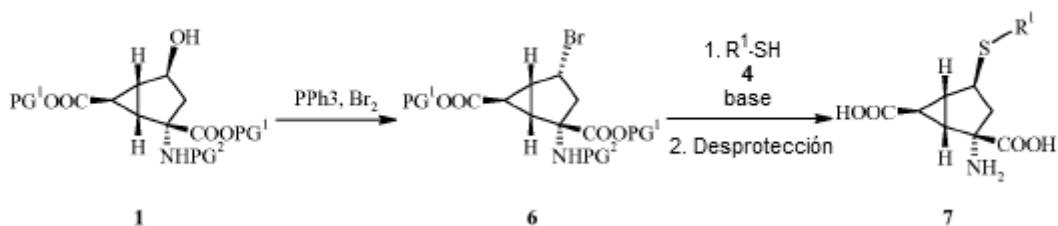
30 En los esquemas siguientes, a menos que se indique lo contrario, todos los sustituyentes son tal como se ha definido anteriormente. Los reactivos y los materiales de partida son en general fácilmente disponibles para una persona con conocimientos ordinarios en la materia. Otros pueden ser realizados mediante técnicas estándares de química orgánica y heterocíclica que son análogas a la síntesis de compuestos estructuralmente similares conocidos y a los procedimientos descritos en las Preparaciones y los Ejemplos siguientes, incluyendo cualquier procedimiento novedoso.



40 El Esquema I ilustra la síntesis general de un compuesto de fórmula 5. "PG¹" es un grupo protector desarrollado para el grupo carboxilo, tales como ésteres. "PG²" es un grupo protector desarrollado para el grupo amino, tales como carbamatos y amidas. Dichos grupos protectores son bien conocidos y apreciados en la técnica. "LG" es un grupo saliente, tal como tosilato o mesilato. De esta manera, "LG-haluro" es un reactivo, tal como cloruro de para-toluensulfonilo o cloruro de metansulfonilo.

45 Un compuesto de fórmula 1 reacciona con un compuesto de fórmula 2 en presencia de una base apropiada, tal como dimetilaminopiridina o trietilamina, en un disolvente apropiado, tal como diclorometano, para proporcionar un compuesto de fórmula 3. Un compuesto de fórmula 5 resulta de la reacción de un compuesto de fórmula 3 con un compuesto apropiado de fórmula 4 en presencia de una base adecuada, tal como carbonato de potasio o carbonato de sodio, en un disolvente apropiado, tal como dimetilformamida, seguido por condiciones para facilitar la eliminación de los grupos protectores, que son bien conocidas y apreciadas en la técnica. Un compuesto de fórmula 5 puede ser aislado como una base libre o una sal apropiada, tal como la sal de clorhidrato.

Esquema II



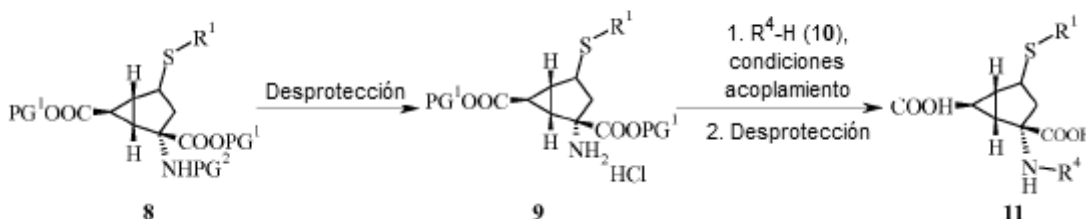
5

El Esquema II ilustra la síntesis general de un compuesto de fórmula 7. "PG¹" y "PG²" son tal como se han definido en el Esquema I, anterior.

10 Un compuesto de fórmula 1 se hace reaccionar con trifetilfosfina y Br₂ en un disolvente adecuado, tal como tolueno o tetrahidrofurano, para proporcionar el compuesto de bromo resultante de fórmula 6. Un compuesto de fórmula 7 resulta de la reacción de un compuesto de fórmula 6 con un compuesto apropiado de fórmula 4 en presencia de una base adecuada, tal como carbonato de potasio, en un disolvente apropiado, tal como dimetilformamida, seguido de condiciones para facilitar la eliminación de los grupos protectores, que son bien conocidos y apreciados en la técnica. Un compuesto de fórmula 7 puede ser aislado como una base libre o una sal apropiada, tal como la sal de clorhidrato.

15

Esquema III



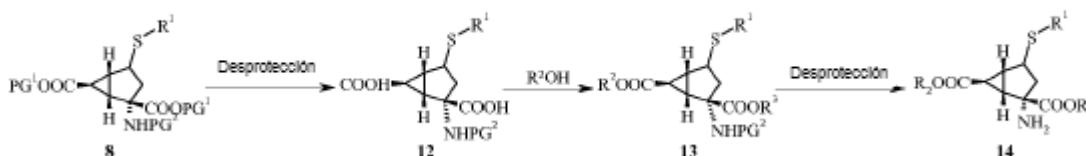
20

El Esquema III ilustra la síntesis general para generar un compuesto de fórmula 11, "PG¹" y "PG²" son tal como se han definido en el Esquema 1, anterior. R⁴ no es hidrógeno.

25 Un compuesto de fórmula 8 es sometido a las condiciones de desprotección apropiadas para efectuar la eliminación de "PG²" para proporcionar un compuesto de fórmula 9. Dichas condiciones son bien conocidas y apreciadas en la técnica. Un compuesto de fórmula 11 resulta de la reacción de un compuesto de fórmula 9 con un compuesto de fórmula 10 bajo condiciones de acoplamiento apropiadas seguidas de condiciones para facilitar la eliminación de los grupos protectores, que son bien conocidos y apreciados en la técnica. Una persona con conocimientos en la materia reconocerá que existen una serie de procedimientos y reactivos para formación de amida que resulta de la reacción de ácidos carboxílicos y aminas. Por ejemplo, las condiciones de acoplamiento apropiadas incluyen la reacción de un compuesto apropiado de fórmula 9 con un ácido apropiado de fórmula 10 en presencia de un reactivo de acoplamiento y una base de amina, tal como DIPEA o trietilamina. Los reactivos de acoplamiento incluyen carbodiimidas, tales como DCC, DIC, EDCI, y reactivos de acoplamiento aromáticos, tales como HOBT y HOAT. Además, pueden usarse sales de uronio o fosfonio de aniones no nucleofílicos, tales como HBTU, HATU, PyBOP y PyBrOP en lugar de los reactivos de acoplamiento más tradicionales. Pueden usarse aditivos tales como DMAP para mejorar las reacciones. Un compuesto de fórmula 11 puede ser aislado como una base libre o una sal apropiada, tal como la sal de clorhidrato.

35

Esquema IV



40

El Esquema IV ilustra la síntesis general para generar un compuesto de fórmula 14. "PG¹" y "PG²" se definen tal como se han descrito en el Esquema I anterior.

Un compuesto de fórmula 12 se obtiene sometiendo un compuesto de fórmula 8 a las condiciones de desprotección

apropiadas para efectuar la desprotección de los ácidos solamente. Dichas condiciones son bien conocidas y apreciadas en la técnica. Un compuesto de fórmula 13 se obtiene mediante esterificación de las fracciones de ácido carboxílico libres resultantes con R^2OH bajo las condiciones apropiadas. Obsérvese que $R^2 = R^3$. El experto en la materia apreciará que existen una serie de procedimientos y reactivos para efectuar la esterificación de un ácido carboxílico libre. Por ejemplo, un exceso de uno de los reactivos, tal como el componente alcohol, puede ser añadido a la mezcla de reacción. De manera alternativa, el agua resultante puede ser eliminada de la reacción mediante destilación o agente deshidratante. Finalmente, el compuesto resultante de fórmula 13 es sometido a condiciones apropiadas para efectuar la desprotección de la amina. Dichas condiciones son bien conocidas y apreciadas en la técnica. Un compuesto de fórmula 14 puede ser aislado como una base libre o una sal apropiada, tal como la sal de clorhidrato.

De manera alternativa, puede conseguirse un di-éster en el que R^2 y R^3 son diferentes mediante protección y desprotección selectiva y escalonada de un intermediario apropiado, tal como un compuesto de fórmula 7. Dichas condiciones son bien conocidas y apreciadas en la técnica.

Tal como se apreciará fácilmente, los compuestos de fórmula 1 pueden ser preparados rápidamente mediante procedimientos similares a los descritos en la presente memoria y mediante procedimientos que son bien conocidos y establecidos en la técnica. Tal como se entenderá fácilmente, las etapas para preparar los compuestos de la presente invención dependen del compuesto particular sintetizado, el compuesto de partida y la labilidad relativa de las fracciones sustituidas.

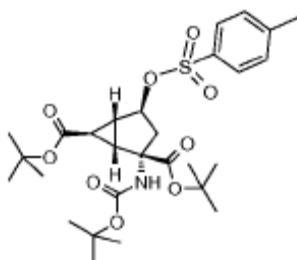
Preparaciones y Ejemplos

Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Los nombres para los compuestos ejemplificados de la presente invención son proporcionados por SYMYX®Draw 3.2 o ACD/Name versión 12.

Preparación 1

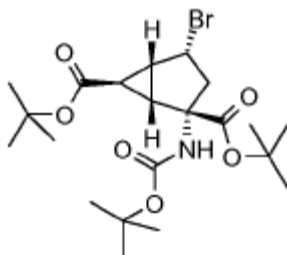
(1S, 2S, 4S, 5R, 6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(p-tolilsulfonilo)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo



Cargar un matraz de fondo redondo de 2 cuellos bajo atmósfera de nitrógeno con (1S,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo (20,7 g, 0,5 mol, véase el documento WO03/104217/A2 para los detalles de la síntesis), 4-dimetilaminopiridina (10,4 g, 0,85 mol), trietilamina (6,98 ml, 0,5 mmol) y cloruro de p-toluensulfonilo (10,6 g, 0,55 mol) en diclorometano (200 ml), y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Añadir solución de hidrógeno sulfato de potasio 1N (200 ml), agua (100 ml) y extraer la capa orgánica. Lavar con agua (200 ml), salmuera (200 ml), secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y evaporar hasta la sequedad. Agregar tetrahidrofurano (30 ml), a continuación heptanos (90 ml). Calentar la mezcla a 60°C y lentamente añadir más heptanos (200 ml). Enfriar la mezcla a temperatura ambiente. Filtrar la parte sólida y secar bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (24,6 g, 87%). MS (m/z): 590 (M+23).

Preparación 2

(1R, 2S, 4R, 5R, 6R)-4-bromo-2-(tert-butoxicarbonilamino)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo

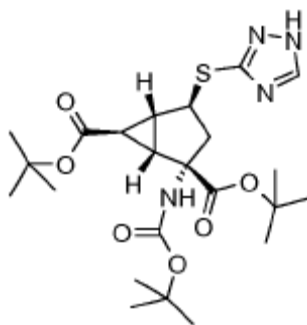


5 Disolver trifenilfosfina (41,97 g, 158,4 mmol) en tolueno fresco (660 ml) y añadir bromo (8,14 ml, 158,4 mmol) hasta que persiste un color amarillo. Añadir, gota a gota, una solución de (1S,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo (32,75 g, 79,2 mmol) en tolueno (176 ml) y piridina anhidra (528 ml) durante 45 minutos. Agitar la reacción a 75°C durante la noche. Enfriar a temperatura ambiente, diluir con acetato de etilo, filtrar y concentrar hasta la sequedad. Someter la parte cruda a suspensión en metil tert-butil éter, filtrar para eliminar los sólidos y concentrar la parte filtrada hasta la sequedad. Purificar la parte cruda mediante cromatografía en gel de sílice (750 g) eluyendo con hexano:acetato de etilo (0:100 a 80:20) para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (29,52 g, 78 %). MS (m/z): 498, 500 (M+23).

Preparación 3

10 (1R, 2S, 4S, 5R, 6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(1H-1,2,4- triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo

15



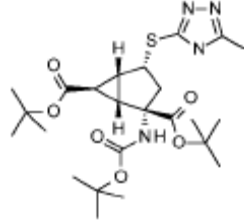
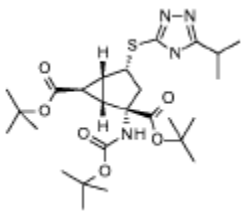
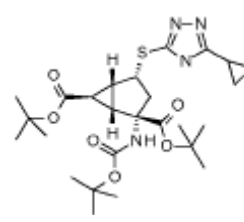
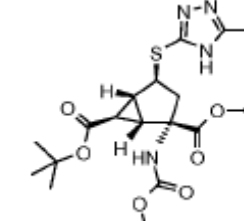
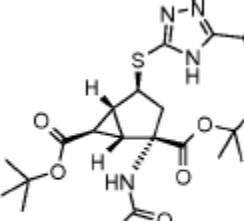
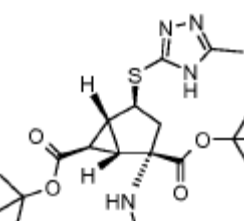
20 Añadir a una solución de (1R,2S,4R,5R,6R)-4-bromo-2-(tert-butoxicarbonilamino)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo (2 g, 4,20 mmol) en dimetilformamida (10 ml), 1H-1,2,4-triazol-3-tiol (525 mg, 5,04 mmol) y carbonato de potasio (1,16 g, 8,4 mmol). Agitar la mezcla a 80°C durante la noche. Enfriar a temperatura ambiente y diluir con acetato de etilo, lavar con ácido cítrico al 10% y salmuera, secar sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar hasta la sequedad. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice (columna de sílice 80 g) eluyendo con hexano:acetato de etilo (80:20 a 0:100) para obtener el compuesto del título (1,64g, 78%). MS (m/z): 497 (M+1).

25 Los siguientes compuestos en la Tabla 1 se preparan a partir de la Preparación 1 o la Preparación 2 siguiendo esencialmente el procedimiento de la Preparación 3.

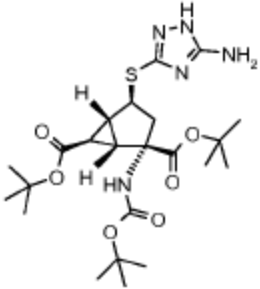
Tabla 1

Nº Prep.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos M (m/z):
4	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[[5-(difluorometil)-4H-1,2,4- triazol-3-il]sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo		569 (M+23)
5	(1R,2S,4R,5R,6R)-4-(5- amino-[1,3,4]triazol-2-ilsulfanil)-2-tert-butoxicarbonilamino-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo ¹		512 (M+1)

(Cont.)

6	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[(5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo		511 (M+1)
7	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[(5-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo		539 (M+1)
8	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[(5-ciclopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo		537 (M+1)
9	(1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[(5-ciclopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo		537 (M+1)
10	(1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[(5-isopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo ²		539 (M+1)
11	(1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[(5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo ²		511 (M+1)

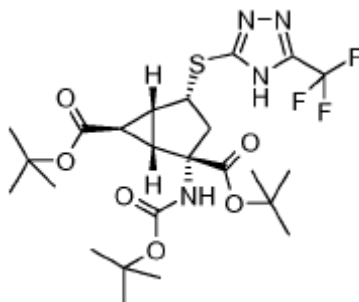
(Cont.)

12	(1R,2S,4S,5R,6R)-4-[(5-amino-1H-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]-2-(tert-butoxicarbonilamino)biciclo[3,1,0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo ²		512 (M+1)
<p>¹La base usada en la reacción fue Na₂CO₃.</p> <p>²La reacción se calienta mediante microondas.</p>			

Preparación 13

5 (1R,2S,4R,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[[5-(trifluorometil)-1H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo

10



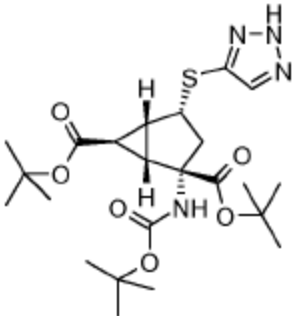
15

Purgar con nitrógeno una solución de (1R,2S,4R,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(2H-triazol-4-ilsulfanil) biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo (11,8 mg, 20,77 mmol) y 1H-mercapto-(trifluorometil)-4H-1,2,4-triazol, sal de sodio (7,7 g, 38,5 mmol) en dimetilformamida (100 ml) y agitar a 70°C durante la noche. Enfriar a temperatura ambiente, diluir con agua y extraer con acetato de etilo. Lavar la capa orgánica con agua, salmuera, secar sobre sulfato de magnesio y concentrar hasta la sequedad. Purificar mediante cromatografía en columna flash eluyendo con isohexano:acetato de etilo (95:5 a 60:40) para proporcionar el compuesto del título (10,9 g, 93,5%). MS (m/z): 587 (M+23).

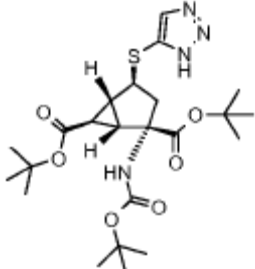
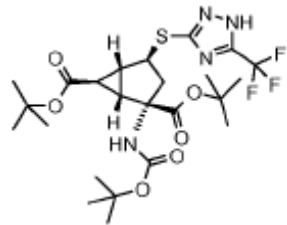
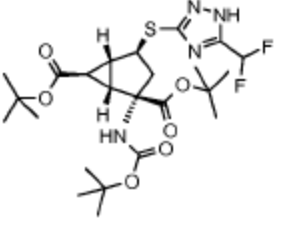
Los siguientes compuestos en la Tabla 2 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento de la Preparación 13.

20

Tabla 2

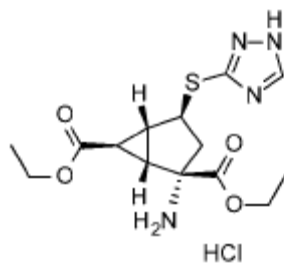
Nº Prep.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos M (m/z):
14	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(2H-1,2,4-triazol-4-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo		519 (M+23)

(Cont.)

15	(1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(1H-1,2,3-triazol-5-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo ²		497 (M+1)
16	(1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[[5-(trifluorometil)-1H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo ²		587 (M+23)
17	(1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[[5-(difluorometil)-1H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo		569 (M+23)

²La reacción se calienta mediante microondas**Preparación 18**

5 Clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo



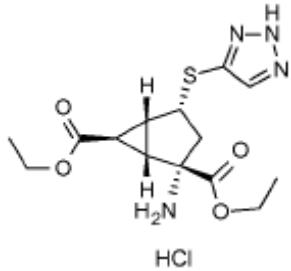
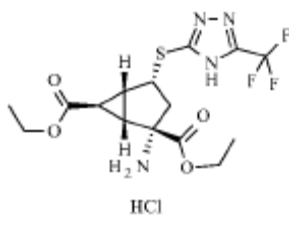
10

Cargar un matraz de fondo redondo con (1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo (3,7 g, 7,45 mmol) y etanol (50 ml). Añadir lentamente cloruro de tionilo (2,71 ml, 37,25 mmol) (reacción exotérmica a 45°C) y agitar la mezcla a 80 °C durante la noche. Eliminar el disolvente bajo vacío para dar el compuesto del título como un sólido blanco (2,8 g, 99%). MS (m/z): 341 (M+1).

15

Los siguientes compuestos en la Tabla 3 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento de la Preparación 18.

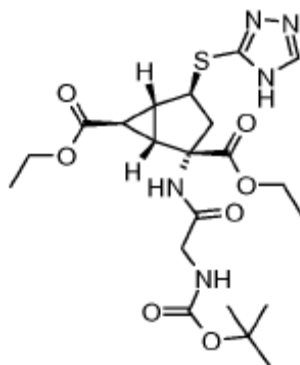
Tabla 3

Nº Prep.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
19	Clorhidrato de (1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo		341 (M+1), 363 (M+23)
20	Clorhidrato de (1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo		409 (M+1)

Preparación 21

5 (1R,2S,4S,5R,6R)-2-[-2-(tert-butoxicarbonilamino)acetil]amino]-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo

10

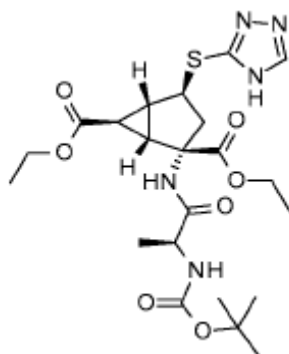


15 Añadir tetrahidrofurano (11,5 ml) a clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo (0,869 g, 2,31 mmol) y enfriar la mezcla a 0-5°C con un baño de agua helada. Añadir 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (404,9 mg, 2,31 mmol) y ácido (2S)-2-(tert-butoxicarbonilamino)acético (0,404 g, 2,31 mmol). Lentamente, añadir N-metilmorfolina (0,55 ml, 5,07 mmol) y agitar durante 2 horas. Filtrar la mezcla y lavar la parte sólida blanca con tetrahidrofurano. Descartar la parte sólida y concentrar la solución hasta la sequedad. Purificar mediante cartucho OASIS® HLB (cargar en DMSO y eluir con gradiente de solución tampón de bicarbonato de amonio pH=9/acetonitrilo). Eluir el compuesto deseado con 3:1 (bicarbonato de amonio/acetonitrilo). Eliminar el disolvente. Disolver el residuo en diclorometano y lavar con agua. Descartar la fase acuosa. Secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar hasta la sequedad para dar el compuesto del título como un sólido blanco (440 mg, 38%). MS (m/z): 498 (M+1), 520 (M+23).

20

Preparación 22

25 (1R,2S,4S,5R,6R)-2-((S)-2-tert-butoxicarbonilamino-propionilamino)-4-(4H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo



5

10

15

Combinar clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo (354 mg, 0, 894 mmol), ácido (2S)-2-(tert-butoxicarbonilamino)propanoico (257 mg, 1,34 mmol), 4-dimetilaminopiridina (10,92 mg, 89 μ mol), hidrato de 1- hidroxibenzotriazol (219 mg, 1,41 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (208 mg, 1,34 mmol) en diclorometano (9 ml) y añadir trietilamina (373 μ l, 2,68 mmol). Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche bajo una atmósfera de nitrógeno. Lavar con solución de ácido cítrico al 10%, solución saturada de hidrógeno carbonato de sodio y salmuera. Descartar las capas acuosas, filtrar la capa orgánica a través de un cartucho de tierra diatomácea y eliminar el disolvente bajo vacío. Purificar mediante cromatografía flash eluyendo con diclorometano:metanol (1-15%) para dar el compuesto del título (412,5mg, 90,2%). MS (m/z): 552 (M+1), 534 (M+23).

Los siguientes compuestos en la Tabla 4 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento de la Preparación 22.

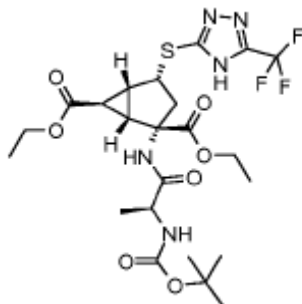
Tabla 4

Nº Prep.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
23	(1R,2S,4S,5R,6R)-2-((S)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-metil-pentanoilamino)-4-(4H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo		554 (M+1), 576 (M+23)
24	(1R,2S,4S,5R,6R)-2- ((S)-2-tert-bucoxicarbonilamino-4- metilsulfanil-butirilamino)-4-(4H-1-[1,2,4]triazol-3- ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo		572 (M+1), 594 (M+23)

20

Preparación 25

(1R,2S,4R,5R,6R)-2-(2-((S)-tert-butoxicarbonilamino)-propionilamino)-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo



Combinar clorhidrato de (1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo (657 mg, 1,48 mmol), hexafluorofosfato de o-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (730 mg, 1,92mmol) y ácido (2S)-2-(tert-butoxicarbonilamino)propanoico (363 mg, 1,92 mmol) en dimetilformamida anhidra (12 ml) a temperatura ambiente, añadir diisopropiletilamina (3,0 ml, 17,20 mmol) y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche bajo una atmósfera de nitrógeno. Diluir la mezcla de reacción con acetato de etilo (60 ml) y lavar con solución saturada de hidrógeno carbonato de sodio (30 ml). Extraer la fase acuosa con acetato de etilo. Combinar las fases orgánicas, lavar con agua (30 ml) y salmuera (30 ml). Secar la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y eliminar el disolvente bajo vacío. Purificar mediante cromatografía en gel de sílice (110 g columna de sílice) eluyendo con isohexano:acetato de etilo (95:5 a 10:90) para dar el compuesto del título (321 mg, 38%). MS (m/z): 602 (M+23).

Los siguientes compuestos en la Tabla 5 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento de la Preparación 25.

Tabla 5

Nº Prep.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
26	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-[2-((S)-tert-butoxicarbonilamino)-4-metilsulfanil-butirilamino]-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo		662 (M+23)
27	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-(2-tert-butoxicarbonilamino-acetilamino)-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo		558 (M+23)

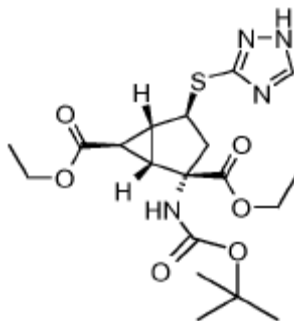
(Cont.)

28	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-[2-((5)-tert-butoxicarbonilamino)-propionilamino]-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo		520 (M+23)
29	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-[2-((S)-tert-butoxicarbonilamino)-propionilamino]-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo		534 (M+23)
30	(1R,2S,4R,5R,6R)-2-[2-((5)-tert-butoxicarbonilamino)-4-metilsulfanil-butirilamino]-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo		572 (M+1), 594 (M+23)

Preparación 31

5 (1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo

10

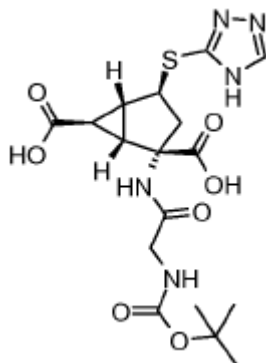


15

Añadir dicarbonato de ditert-butilo (2,39 g, 10,83 mmol) y carbonato de potasio (1,89 g, 13,53 mmol) a una suspensión de clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo (2,04 g, 5,41 mmol) en 1,4-dioxano (27,07 ml, 317,02 mmol). Diez minutos más tarde, añadir agua (27,07 ml, 1,50 mol), y agitar a temperatura ambiente durante 2 días. Retirar el dioxano y diluir con acetato de etilo. Separar las capas y secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar. El compuesto del título se obtiene como un sólido blanco (1,97g, 83%). MS (m/z): 441 (M+1).

Preparación 32

Ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-[[2-(tert-butoxicarbonilamino)acetil]amino]-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico



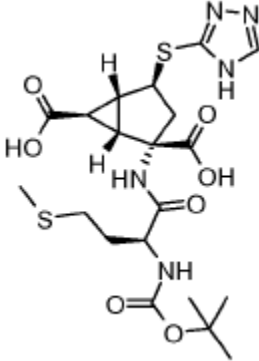
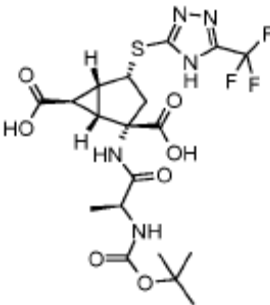
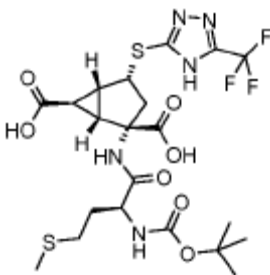
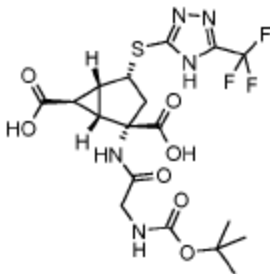
Disolver (1R,2S,4S,5R,6R)-2-[[2-(tert-butoxicarbonilamino)acetil]amino]-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo (0,420 g, 0,84 mmol) en tetrahidrofurano (7 ml), a continuación añadir hidróxido de litio 2,5M (6,7 ml, 16,88 mmol). Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 3,5 horas. Diluir la mezcla de reacción con agua y lavar con acetato de etilo. Descartar la capa orgánica. Ajustar la fase acuosa a pH=2 con ácido clorhídrico 1N y extraer con acetato de etilo. Secar la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar hasta la sequedad para dar el compuesto del título como un sólido blanco (250 mg, 66%). MS (m/z): 442 (M+1), 464 (M+23).

Los siguientes compuestos en la Tabla 6 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento de la Preparación 32.

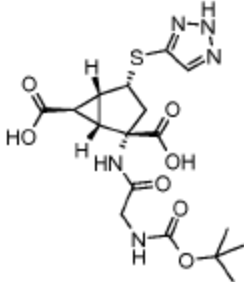
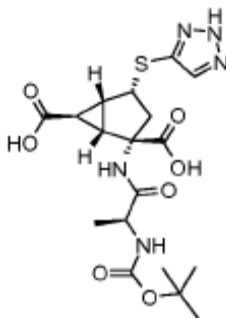
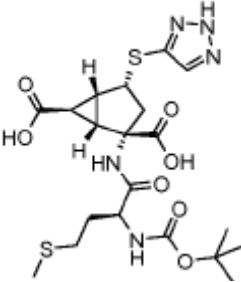
Tabla 6

Nº Prep.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
33	Ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-((S)-2-tert-butoxicarbonilamino-propionilamino)-4-(4H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico		456 (M+1)
34	Ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-((S)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-metil-pentanoilamino)-4-(4H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico		497 (M+1)

(Cont.)

35	<p>Ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-((S)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-metilsulfanil-butirilamino)-4-(4H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico</p>		516 (M+1)
36	<p>Ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-[2-((S)-tert-butoxicarbonilamino)-propionilamino]-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico³</p>		546 (M+23)
37	<p>Ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-[2-((S)-tert-butoxicarbonilamino)-4-metilsulfanil-butirilamino]-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico³</p>		584 (M+1)
38	<p>Ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-(2-tert-butoxicarbonilamino-acetilamino)-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico³</p>		510 (M+1), 532 (M+23)

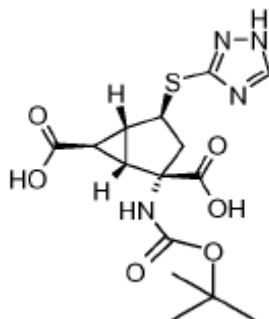
(Cont.)

39	Ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-(2-tert-butoxicarbonilamino-acetilamino)-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico ³		442 (M+1), 464 (M+23)
40	Ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-[2-((5)-tert-butoxicarbonilamino)-propionilamino]-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico ³		456 (M+1), 478 (M+23)
41	Ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-[2-((S)-tert-butoxicarbonilamino)-4-metilsulfanil-butirilamino]-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico ³		516 (M+1)

³La base usada en la reacción fue LiOH 2,0M.**Preparación 42**

Ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico

5



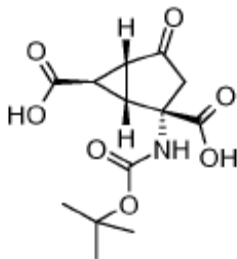
10

15

Añadir una solución acuosa de hidróxido de litio 2,5M (20,70 ml, 51,76 mmol) a (1R,2S,4S,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dietilo (1,9 g, 4,31 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml) y agitar a temperatura ambiente durante la noche. Evaporar el tetrahidrofurano. Diluir con agua y lavar con acetato de etilo. Descartar la capa orgánica. Ajustar la fase acuosa a pH=2 con ácido clorhídrico 5M y extraer con acetato de etilo. Separar las capas y secar las partes orgánicas sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar. El compuesto del título se obtiene como un sólido blanco (1,58 g, 95%). MS (m/z): 385 (M+1).

Preparación 43

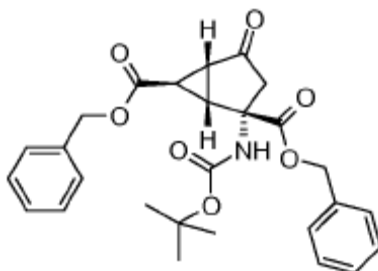
Ácido (1S,2S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico



Añadir hidróxido de sodio 2,5M (15,55 ml, 38,88 mmol) a una solución agitada del (1S,2S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo (2,0 g, 4,86 mmol) en tetrahidrofurano (24,3 ml) y etanol (9,72 ml). Calentar la mezcla de reacción a 60°C y mantener la agitación durante la noche. Continuar el calentamiento durante 4 horas, a continuación lavar con acetato de etilo. Enfriar la fase acuosa en un baño helado y acidificar a pH=2-3 con solución ácido clorhídrico 1N. Extraer con acetato de etilo (3 veces), secar la parte orgánica en sulfato de sodio, filtrar y concentrar para dar el compuesto del título como un sólido de color naranja (1,4 g, 96%). MS (m/z): 322 (M+23).

Preparación 44

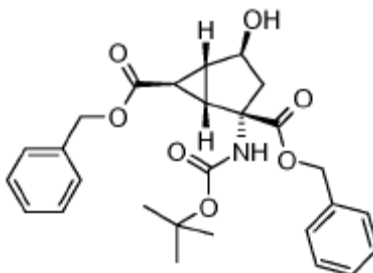
(1S,2S,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-oxo-biciclo[3.1.0] hexan-2,6-dicarboxilato de dibencilo



Añadir bromuro de bencilo (8,69 ml, 72,9 mmol), gota a gota, a una suspensión agitada de ácido (1S,2S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico (7,27 g, 24,3 mmol) y carbonato de cesio (15,83 g, 48,6 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (60 ml). Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche bajo nitrógeno. Inactivar con agua y diluir con acetato de etilo. Extraer la fase acuosa con acetato de etilo (3 veces) y lavar las capas orgánicas con salmuera y agua. Secar sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar para dar el material crudo como un aceite marrón pálido. Purificar mediante cromatografía flash eluyendo con acetato de etilo:hexano (20:80 a 30:70) para dar el compuesto del título como una espuma gomosa de color amarillo (9,15 g, 78,5%). MS (m/z): 502 (M+23).

Preparación 45

(1S,2S,4S,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dibencilo

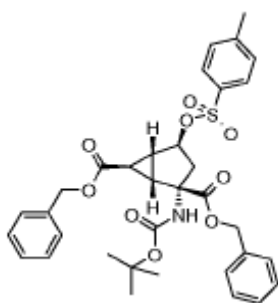


Añadir una solución de L-selectrida 1M en THF (30 ml, 30 mmol), gota a gota, a una solución agitada de (1S,2S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis[(fenil)metil] (9,15 g, 19,08 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml) a -78°C. Agitar la mezcla de color naranja resultante bajo nitrógeno durante 1 hora y 45 minutos. Inactivar con una solución saturada de hidrógeno carbonato de sodio a -78°C. Diluir con agua y acetato de etilo. Separar

las capas y lavar la fase orgánica con salmuera y agua. Secar sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar hasta la sequedad para dar el material crudo como un aceite amarillo pálido. Purificar el material combinado mediante cromatografía flash eluyendo con acetato de etilo:hexanos (20:80 a 50:50) para dar el producto del título como un isómero único (9,19 g, 100%). MS (m/z): 504 (M+23)

5 Preparación 46

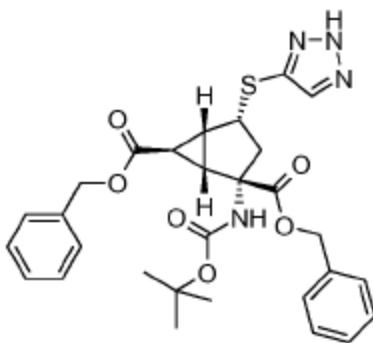
(1*S*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-*tert*-butoxicarbonilamino-4-(toluen-4-sulfoniloxi)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dibencilo



El producto del título se prepara esencialmente según el procedimiento de la Preparación 1 (rendimiento 75%). MS (m/z): 658 (M+23).

15 Preparación 47

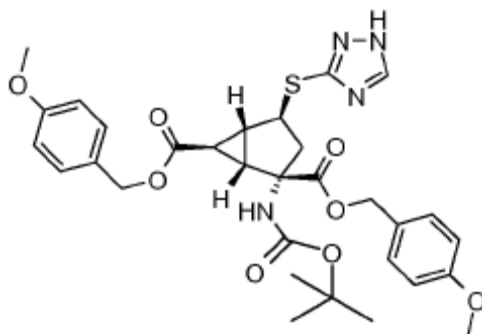
(1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-*tert*-butoxicarbonilamino-4-(1*H*-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dibencilo



Añadir 1*H*-5-Mercapto-1,2,3-triazol, dihidrato de sal de sodio (0,174 g, 1,42 mmol) a una solución agitada de éster dibencilo del ácido (1*S*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-(tosiloxi)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico (0,6 g, 0,943 mmol) y en dimetilformamida anhidra (8 ml) y calentar a 70 °C durante la noche. Diluir la mezcla de reacción con acetato de etilo (60 ml) y lavar la capa orgánica con NaHCO₃ (30 ml) y salmuera (30 ml), secar sobre Na₂SO₄ anhidro), concentrar y purificar mediante cromatografía en gel de sílice (columna de sílice 40 g) eluyendo con acetato de etilo al 0-60% en isohexano para dar el compuesto del título como una goma incolora (0,405 g, rendimiento 76%). MS (m/z): 587 (M+23).

30 Preparación 48

(1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-*tert*-butoxicarbonilamino-4-(1*H*-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis-(4-metoxi-bencilo)



5

10

Agitar una suspensión de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico (369 mg, 0,959 mmol), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (0,985 g, 2,59 mmol), diisopropiltilamina (0,920 ml), en diclorometano (9,60 ml) durante 15 minutos. A continuación, añadir bencenmetanol, 4-metoxi (0,365 g, 2,59 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante la noche. Retirar el disolvente y purificar mediante cromatografía en gel de sílice (cartucho en gel de sílice 12 g) eluyendo con gradiente de diclorometano/metanol para proporcionar el compuesto del título (240 mg, 40%). MS (m/z): 625 (M+1).

El siguiente compuesto en la Tabla 7 se prepara esencialmente siguiendo el procedimiento de la Preparación 48.

15

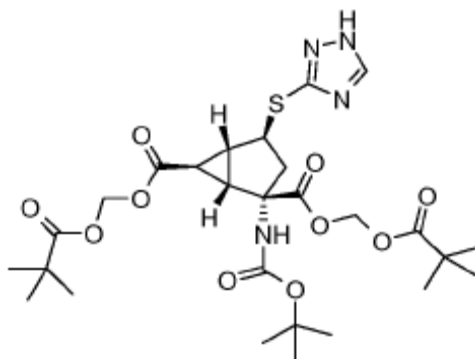
Tabla 7

Nº Prep.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
49	2,6-dicarboxilato de bis[[3-(trifluorometil)fenil]metil] (1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexano		701 (M+1)

Preparación 50

(1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de Bis(2,2-dimetilpropanoilo)metilo

20



25

30

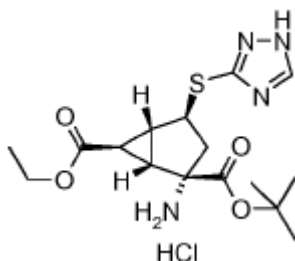
Añadir bicarbonato de sodio (0,393 g, 4,68 mmol), yoduro de sodio (0,351 g, 2,34 mmol) y éster 2,2-dimetil-clorometilo de ácido propanoico (352,60 mg, 2,34 mmol) a una solución de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico (0,300 g, 0,780 mmol) en 3 ml de dimetilformamida seca. Agitar la mezcla heterogénea resultante durante 18 horas. Retirar el disolvente bajo vacío, añadir agua y extraer con acetato de etilo. Separar las capas y secar las partes orgánicas sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar. Purificar el producto crudo a través de un cartucho de fase normal Phenomenex STRATAT™ 5 g eluyendo con una mezcla de 50%

hexano:acetato de etilo para proporcionar el compuesto del título (96 mg, 20%). MS (ro/z): 613 (M+1).

Preparación 51

Clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de 2-tert-butil-6-etil

5



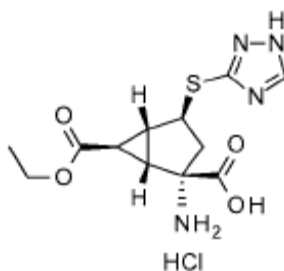
10

Añadir cloruro de acetilo (1,12 ml, 15,71 mmol), gota a gota, a una solución de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-4,6-dicarboxilato de ditert-butilo (1,3 g, 2,62 mmol) en etanol (9,14 ml). Calentar la mezcla en un tubo sellado a 50°C durante 2 horas. Retirar el disolvente para proporcionar el compuesto del título (950 mg, 90%). MS (m/z): 369 (M+1).

15 Preparación 52

Clorhidrato de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-4-amino-6-etoxicarbonil-2-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-4-carboxílico

20



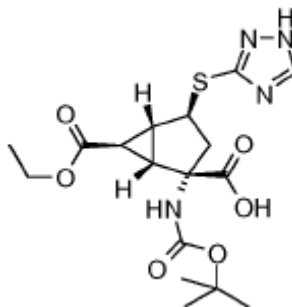
25

Disolver clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarsboxilato de 2-tert-butil-6-etilo (946 mg, 2,34 mmol) en una solución saturada de gas de cloruro de hidrógeno en acetato de etilo (8 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 25 horas. Retirar el disolvente para proporcionar el compuesto del título (831 mg, 101%). MS (m/z): 313 (M+1).

Preparación 53

Ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-6-etoxicarbonil-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2-carboxílico

30



35

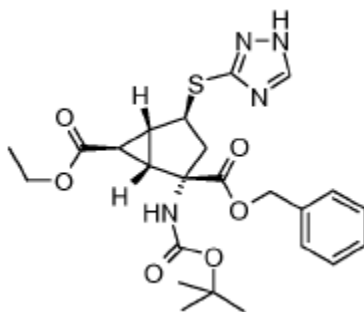
Añadir dicarbonato de ditert-butilo (935,39 mg, 4,24 mmol) y carbonato de potasio (888,5 mg, 6,36 mmol) a una suspensión de clorhidrato de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-4-amino-6-etoxicarbonil-2-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-4-carboxílico (740 mg, 2,12 mmol) en 1,4-dioxano (10,61 ml). Agitar la mezcla a temperatura

40

ambiente. Diez minutos más tarde, añadir agua (10,61 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 2 días. Retirar el dioxano y diluir con acetato de etilo, ajustar el pH ácido con HCl 5M. Separar las capas y secar las partes orgánicas sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar para proporcionar el compuesto del título (270 mg, 31%). MS (m/z): 413 (M+1).

Preparación 54

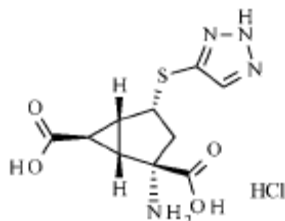
5 *(1R,2S,4S,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de 2-bencil-6-etilo*



10 Agitar una suspensión de ácido *(1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-6-etoxicarbonil-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2-carboxílico* (270 mg, 0,654 mmol), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N'-tetrametiluronio (0,373 g, 0,982 mmol), diisopropiletilamina (0,342 ml, 1,96 mmol), en diclorometano (6,55 ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente y añadir alcohol bencílico (0,101 ml, 0,982 mmol). Agitar a temperatura ambiente durante la noche. Retirar el disolvente y purificar primero mediante cromatografía en columna de sílice (4 g cartucho en gel de sílice, gradiente eluyente diclorometano/metanol (el compuesto deseado se eluye con 6% de metanol), y segundo mediante cartucho HLB Waters OASIS® eluyendo con 3:1 acetonitrilo/agua. El compuesto del título se obtiene como un sólido blanco (100 mg, 30%). MS (m/z): 503 (M+1).

Ejemplo 1

15 *Clorhidrato de ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico*

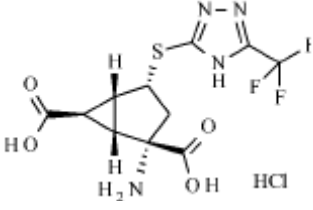
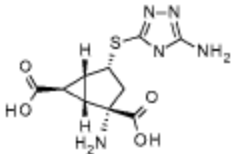
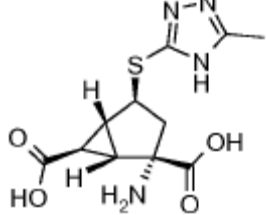
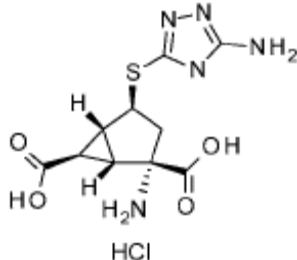
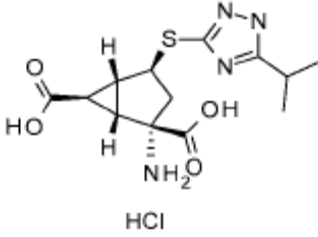
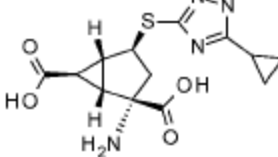


25 Añadir dibromuro de zinc (0,88 g, 3,91 mmol) a una solución agitada de *(1R,2S,4R,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo* (194 mg, 0,39 mmol) en diclorometano (30 ml). Agitar durante la noche a 50 °C. Añadir más dibromuro de zinc (0,44 g, 1,95 mmol) y continuar la agitación a 50°C hasta que el material de partida se consuma completamente. Evaporar el disolvente y agitar el residuo en ácido clorhídrico acuoso 2M (5mL) a 50°C hasta que solo haya presente el producto deseado. Enfriar la mezcla de reacción y purificar el residuo mediante cromatografía de intercambio catiónico (DOWEX® 50WX8-100). Permitir que el compuesto fluya a través de la columna a una velocidad de goteo de aproximadamente 1 gota cada 1-2 segundos. Después de que el volumen de carga inicial ha bajado a la superficie de la resina, enjuagar con agua (5 a 10 ml) y repetir 3 veces. Supervisar el pH del efluente y continuar enjuagando con agua hasta que se complete la aplicación (ciclo de pH observado: efluente desde la columna inicialmente a pH=7, a continuación baja a pH=1 y vuelve nuevamente a pH=7). Lavar la columna con al menos un volumen de columna cada uno de agua, agua:tetrahidrofurano (1:1), a continuación agua. Desplazar el producto desde la resina con piridina 10%:agua. Continuar eluyendo con piridina 10%:agua hasta que no se detecta producto adicional. Concentrar las fracciones que contienen el producto para obtener un sólido incoloro. Secar el sólido. Disolver en ácido clorhídrico 2M y evaporar para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (94 mg, 75%). MS (m/z): 285 (M+1).

Los siguientes compuestos en la Tabla 8 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1.

45

Tabla 8

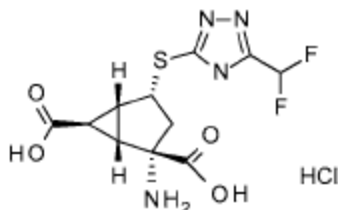
Nº Ej.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
2	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6- dicarboxílico		353 (M+1)
3	Ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-(5-amino-[1,3,4]triazol-2-ilsulfanil)- biciclo[3.1.0]hexan-2,6- dicarboxílico ⁴		300 (M+1)
4	Ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-[(5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo [3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico ⁴		299 (M+1)
5	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6- dicarboxílico		300 (M+1)
6	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-[(5-isopropil-4H-,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6- dicarboxílico		327 (M+1)
7	Ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-[(5-ciclopropil-4H-1,2,4-triazol-3- il)sulfanil]biciclo [3.1.0]hexan-2,6- dicarboxílico ⁴		325 (M+1)

(Cont.)

⁴Los compuestos finales se aíslan directamente mediante cromatografía de intercambio catiónico y se concentran hasta la sequedad.

Ejemplo 8

Clorhidrato de ácido (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-amino-4-(5-difluorometil-1*H*-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico



Añadir (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-[[5-(difluorometil)-4*H*-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil]biciclo [3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de *tert*-butilo (0,356 g, 651,3 μ mol) en 1,4-dioxano (1,63 ml) a una solución de cloruro de hidrógeno (4*M* en dioxano). Calentar la mezcla a 50°C con agitación. Se precipita un sólido a partir de la solución inmediatamente después de comenzar el calentamiento. Enfriar la mezcla de reacción y concentrar bajo presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía en gel de sílice (40 g de SiO₂) eluyendo con ácido clorhídrico al 0-20% (0,01 *M* acuoso) en gradiente de acetonitrilo durante 60 minutos a un caudal de 40 ml/minuto. Concentrar bajo presión reducida para proporcionar el material crudo como aceite. Purificar nuevamente usando las mismas condiciones. Concentrar bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (0,196 g, 93%). MS (*m/z*): 335 (*M*+1).

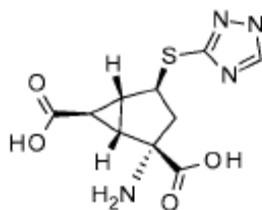
El siguiente compuesto en la Tabla 9 se preparó esencialmente siguiendo el procedimiento del Ejemplo 8.

Tabla 9

Nº Ej.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (<i>m/z</i>):
9	Clorhidrato de ácido (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-2-amino-4-[[5-(difluorometil)-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-il]sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico		335 (<i>M</i> +1)

Ejemplo 10

Ácido (1*R*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-4-(1*H*-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico



5

Añadir cloruro de hidrógeno 4M en 1,4-dioxano (20 ml) a una solución de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-tert-butoxycarbonilamino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-bicyclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo (1,64 g, 3,30 mmol) en 1,4-dioxano (20 ml) y agitar la mezcla a 50°C durante la noche. Concentrar hasta la sequedad. Purificar mediante intercambio catiónico (DOWEX® Marathon C, Na⁺ Forma fuertemente ácida). Disolver el residuo en una cantidad mínima de agua para solubilizar el material y cargar en la resina. Lavar la resina sucesivamente con 2 volúmenes en columna de agua, a continuación 2 volúmenes en columna de agua:tetrahidrofurano (1:1) y 2 volúmenes en columna de agua. Eluir el producto deseado con 2 volúmenes en columna de piridina 10% en agua para dar el compuesto del título como un sólido blanco. MS (m/z): 285 (M+1). 1H NMR (300 MHz, D₂O): 4,25 (d, J= 7,3 Hz, 1H), 2,53-2,38 (m, 3H), 2,23 (dd, J= 8,1, 16,1 Hz, 1H), 1,95 (t, J= 3,3 Hz, 1H).

10

15 Los siguientes compuestos en la Tabla 10 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento del Ejemplo 10.

Tabla 10

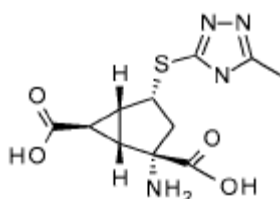
Nº Ej.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
11	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-triazol-4-ilsulfanil)bicyclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico ⁵	<p>HCl</p>	285 (M+1)
12	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-[[5-(trifluorometil)-1H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil]bicyclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico ⁵	<p>HCl</p>	353 (M+1)

⁵Añadir HCl 2 M a la solución resultante y concentrar bajo presión reducida.

Ejemplo 13

Ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-[[5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil]bicyclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico

20



5 Disolver (1R,2S,4R,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-[(5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-ipsulfanil]biciclo[3.1.0] hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo (85 mg, 0,166 mmol), acético ácido (1 ml) y agua (1 ml). Calentar la mezcla a 160°C a aproximadamente 40 Watos en un microondas BIOTAGE® Initiator durante 6 minutos. Concentrar la mezcla de reacción bajo presión reducida. Añadir agua y remover bajo presión reducida dos veces para retirar el exceso de acético ácido para dar el compuesto del título como un sólido blanco (40 mg, 88,6%). MS (m/z): 299 (M+1).

Los siguientes compuestos en la Tabla 11 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento del Ejemplo 13.

Tabla 11

Nº Ej.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
14	Ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-[[5-(1-metiletil)-4H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico		327 (M+1)
15	Ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-[[5-ciclopropil-4H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico		325 (M+1)

Ejemplo 16

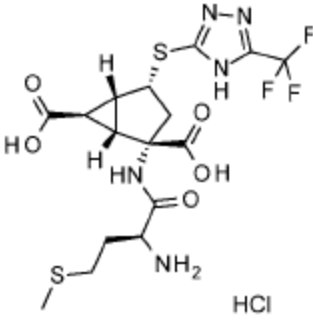
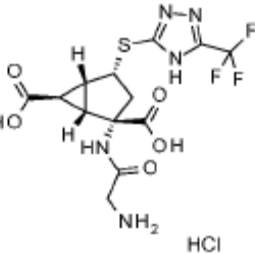
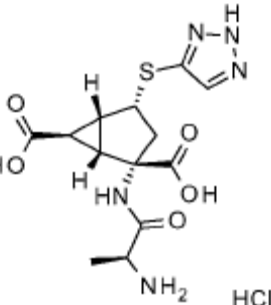
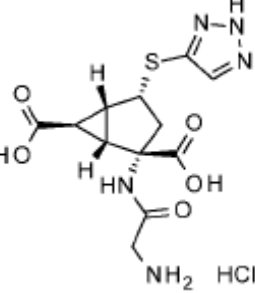
10 Clorhidrato de ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-[[2-(S)-2-aminopropanoil]amino-4-[[5-(trifluorometil)-1H-1,2,4-triazol-3-il]tio]biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico



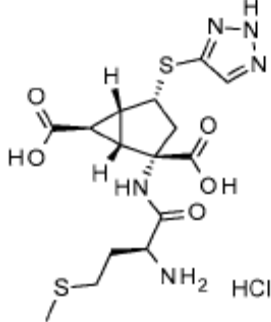
20 Tratar ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-[2-((S)-tert-butoxicarbonilamino)-propionilamino]-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico (340 mg, 0,65 mmol) con ácido clorhídrico acuoso (2M, 7 ml) y agitar a temperatura ambiente durante la noche. Concentrar la mezcla de reacción hasta la sequedad y purificar el residuo mediante cromatografía de intercambio catiónico (DOWEX® 50WX8-100). Disolver el compuesto en agua y ajustar a pH=2. Permitir que el compuesto fluya a través de la columna a una velocidad de goteo de aproximadamente 1 gota cada 1-2 segundos. Después que el volumen de carga inicial ha bajado a la superficie de resina, enjuagar con agua (5 a 10 ml) y repetir 3 veces. Supervisar el pH del efluente y continuar enjuagando con agua hasta que se completa la aplicación (ciclo pH observado: efluente de la columna inicialmente a pH=7 a continuación goteo a pH=1 y vuelve nuevamente a pH=7). Lavar la columna con al menos un volumen de columna cada una de agua, agua:tetrahidrofurano (1:1) a continuación agua. Desplazar el producto de la resina con piridina 10%:agua. Continuar eluyendo con piridina 10%:agua hasta que no se eluya producto adicional. Concentrar las fracciones que contienen el producto para obtener un sólido incoloro (204 mg). Disolver lo sólido en agua, añadir ácido clorhídrico 2M (1,5 eq) y liofilizar la solución durante 48 horas para dar el compuesto del título como un sólido blanco (225 mg, 75,4%). MS (m/z): 424 (M+1).

Los siguientes compuestos en la Tabla 12 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento del Ejemplo 16.

Tabla 12

Nº Ej.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
17	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-((S)-2-amino-4-metilsulfanil-butirilamino)-4-(5-trifluorometil-1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6- dicarboxílico	 <p style="text-align: right;">HCl</p>	484 (M+1)
18	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-(glicilamino)-4-((5-(trifluorometil)-1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico	 <p style="text-align: right;">HCl</p>	411 (M+1)
19	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-(((2S)-2-aminopropanoil)amino)4-(2H-1,2,3-triazol-4-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico	 <p style="text-align: right;">HCl</p>	356 (M+1)
20	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-(2-amino-acetilamino)-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6- dicarboxílico	 <p style="text-align: right;">HCl</p>	342 (M+1), 364 (M+23)

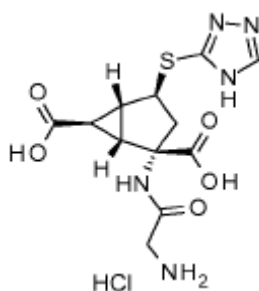
(Cont.)

21	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-((S)-2-amino-4-metilsulfanil-butirilamino)-4-(2H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6- dicarboxílico		416 (M+1), 438 (M+23)
----	--	--	--------------------------------

Ejemplo 22

5 Clorhidrato de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-[-(2-aminoacetil)amino]-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico

10

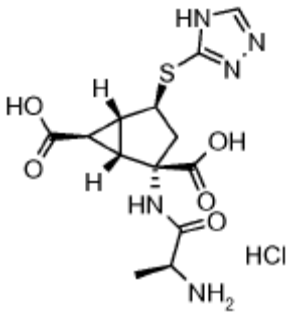


15

Disolver ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-[-(2-(tert-butoxicarbonilamino)acetil)amino]-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico (220 mg, 0,49 mmol) en una solución saturada de gas cloruro de hidrógeno en acetato de etilo (7 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 2 horas. Retirar el disolvente para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (180 mg, 98%). MS (m/z): 342 (M+1).

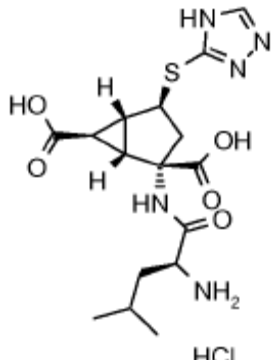
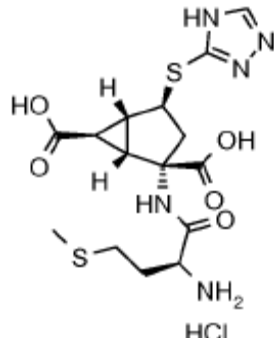
Los siguientes compuestos en la Tabla 13 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento del Ejemplo 22.

Tabla 13

Nº Ej.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
23	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-(L-alanilamino)-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6- dicarboxílico		356 (M+1), 378 (M+23)

20

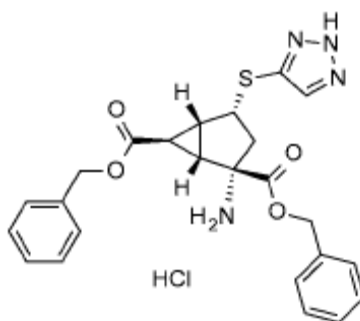
(Cont.)

24	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-(L-leucilamino)-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico	 <p style="text-align: center;">HCl</p>	398 (M+1)
25	Clorhidrato de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-(L-metionilamino)-4-(4H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico	 <p style="text-align: center;">HCl</p>	416 (M+1)

Ejemplo 26

Clorhidrato de (1R,2S,4R,5R,6R)-2-amino-4-(1H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dibencilo

5



10

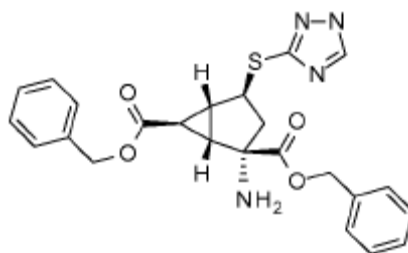
Añadir ácido trifluoroacético (3 ml, 40 mmol) a una solución de éster dibencilico de ácido (1R,2S,4R,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-(1H-[1,2,3]triazol-4-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico (0,4 g, 0,71 mmol) en diclorometano (12 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 4,5 h. Concentrar la mezcla de reacción bajo presión reducida, disolver en acetonitrilo (10 ml) y cargar en un cartucho SCX-2 de 10 g (preacondicionado con acetonitrilo). Lavar el cartucho con acetonitrilo (20 ml) a continuación eluir con una solución de 90:10 v/v acetonitrilo/hidróxido de amonio (fracciones 5x20 ml). Evaporar las fracciones que contienen el producto y purificar mediante cromatografía en gel de sílice (12 g columna de sílice) eluyendo con 90:10:1 diclorometano/metanol/hidróxido de amonio para obtener el producto base libre como una goma incolora. Disolver la goma en diclorometano (10 ml), añadir ácido clorhídrico (0,25 ml de una solución 2M en éter dietílico; 0,5 mmol), y evaporar el disolvente para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (0,2 g, 56,3%). MS (m/z) 465 (M+1).

15

20

Ejemplo 27

(1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de dibencilo



5

En un tubo sellado, añadir ácido p-toluensulfónico (5 eq) a una solución agitada de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ylsulfanyl)bicyclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo (1,00 g, 2,01 mmol) en alcohol bencílico (0,15 M). Calentar la mezcla de reacción con agitación a 80°C durante 4 días. Enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Purificar nuevamente mediante columna SCX-2 (10 g). Cargar la mezcla de reacción en una columna pre-acondicionada con metanol, lavar con metanol (x3) para eliminar el exceso de alcohol bencílico correspondiente, y eluir con solución de amoníaco 2N en metanol. Evaporar el disolvente bajo presión reducida para dar un aceite. Disolver el aceite resultante en acetato de etilo y lavar con una solución saturada de carbonato de sodio para eliminar el monoéster formado en la reacción. Secar la capa orgánica y concentrar para dar un aceite. Purificar el aceite mediante cromatografía flash eluyendo con diclorometano/amonio:metanol 2N (98:2) para dar el compuesto del título como un sólido. (270 mg, 28%) MS (m/z): 465 (M+1).

10

15

El siguiente compuesto en la Tabla 14 se prepara esencialmente siguiendo el procedimiento del Ejemplo 27.

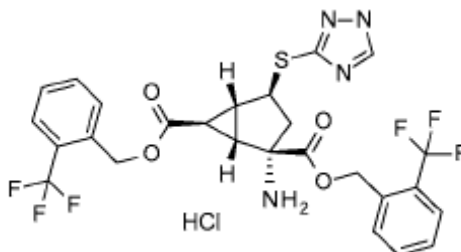
Tabla 14

Nº Ej.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
28	(1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ylsulfanyl)bicyclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis[4-(trifluorometil)fenil]metilo]		601 (M+1)

20 Ejemplo 29

Clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ylsulfanyl)bicyclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis[2-(trifluorometil)fenil]metilo]

25



30

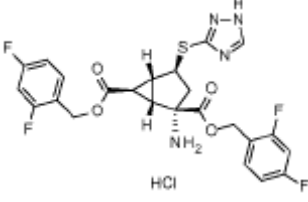
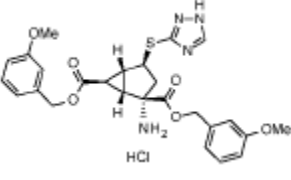
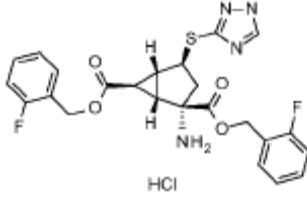
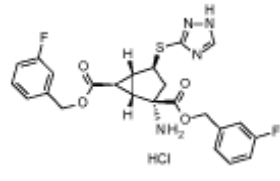
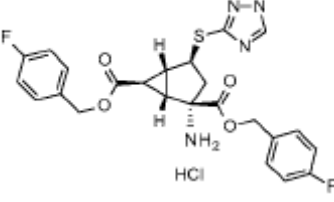
En un tubo sellado, añadir ácido p-toluensulfónico (3 eq) a una solución agitada de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ylsulfanyl)bicyclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de ditert-butilo (500 mg, 1,01 mmol) en alcohol 2-trifluorometilbencílico (30 eq). Calentar la mezcla de reacción con agitación a 88°C durante 4 horas. Enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Cargar la mezcla de reacción en una columna SCX-2 (10 g) pre-acondicionada con metanol, lavar con metanol (x3) para eliminar el exceso de alcohol bencílico correspondiente, a continuación eluir con solución amoníaco 2N en metanol. Evaporar el disolvente bajo presión reducida para dar un aceite.

Tratar el aceite con acetato de etilo resultando en un sólido precipitado, el cual es el monoéster. Filtrar la parte sólida y concentrar la parte filtrada bajo presión reducida para dar un aceite. Purificar el aceite mediante cromatografía flash eluyendo con diclorometano:metanol (95:5) para dar el compuesto del título como un aceite (40 mg, 6%).

- 5 Disolver (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis[[2-(trifluorometil)fenil]metilo] (0,07 mmol) en una solución saturada de gas cloruro de hidrógeno en acetato de etilo (1 ml). Agitar la mezcla (30 min) a temperatura ambiente. Retirar el disolvente bajo presión reducida y secar la parte sólida resultante en un horno a vacío a 50°C durante la noche. (30 mg, 65%) MS (m/z): 601 (M+1).

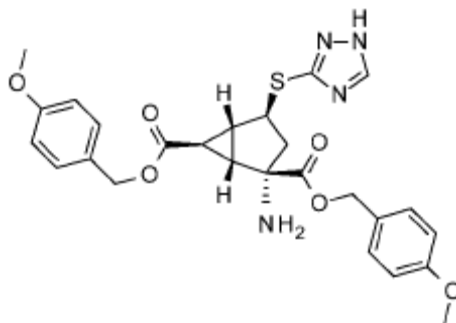
Los siguientes compuestos en la Tabla 15 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento del Ejemplo 29.

Tabla 15

Nº Ej.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
30	Clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis[(2,4-difluorofenil)metilo]		537 (M+1)
31	Clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis[(3-metoxifenil)metilo]		525 (M+1)
32	Clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo]		501 (M+1)
33	Clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis[(3-fluorofenil)metilo]		501 (M+1)
34	Clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis[(4-fluorofenil)metilo]		501 (M+1)

Ejemplo 35

(1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis(4-metoxibencilo)



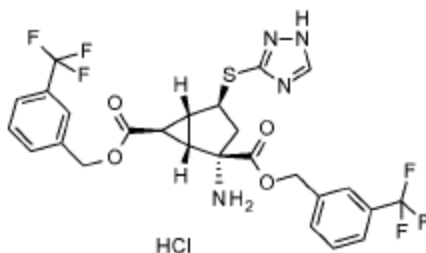
5

10 Disolver (1R,2S,4S,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis-(4- metoxi-bencilo) (102 mg, 163,3 μmol) en una solución saturada de gas cloruro de hidrógeno en acetato de etilo (0,5 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 10 min. Retirar el disolvente. Cargar la mezcla de reacción en una columna SCX pre-acondicionada con acetonitrilo, lavar con acetonitrilo (x2) después eluir con solución de amoníaco 2N en metanol:acetonitrilo (2 volúmenes en columna), a continuación evaporar el disolvente bajo presión reducida. Purificar el residuo crudo mediante cromatografía en gel de sílice (4 g), eluyendo con un gradiente de diclorometano/solución amoníaco al 6% 2N en metanol para proporcionar el compuesto del título (30 mg, 37%). MS (m/z): 525 (M+1).

15

Ejemplo 36

Clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3 1,0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis(3-(trifluorometil)bencilo]



20

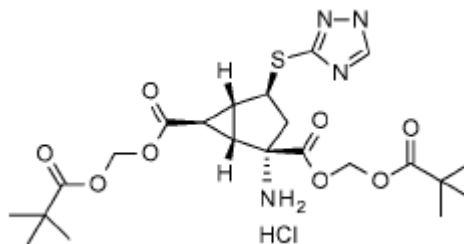
25

Disolver bis-(3-trifluorometil-bencil) éster de ácido (1R,2S,4S,5R,6R)-2-tert-butoxicarbonilamino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxílico (200 mg, 285 μmol) en una solución saturada de gas cloruro de hidrógeno en acetato de etilo (2 ml) y agitar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la conversión al producto deseado es total. Por lo tanto, el disolvente se elimina en vacío. Lavar la parte sólida con acetato de etilo y secar a 50°C en vacío durante la noche para dar el título, 0,17g (94%), (%). MS (m/z): 601 (M+1).

30

Ejemplo 37

(1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis-(2,2-dimetilpropioniloximetilo)



35

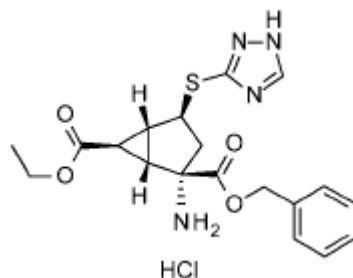
40 Disolver (1R,2S,4S,5R,6R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de bis(2,2-dimetilpropanoiloximetilo) (98 mg, 156 μmol) en una solución saturada de gas cloruro de hidrógeno en acetato

40

de etilo (2 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 2 horas. Retirar el disolvente. Se obtiene un sólido blanco para el compuesto deseado (68 mg, 79%). MS (m/z): 399 (M+1).

Ejemplo 38

Clorhidrato de (1R,2S,4S,5R,6R)-2-amino-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de 4-bencil-6-etilo



Disolver (1R,2S,4S,5R,6R)-2-ter-butoxicarbonilamino-4-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil)-biciclo[3.1.0]hexan-2,6-dicarboxilato de 2-bencil-6-etilo (78 mg, 155,20 μ mol) en una solución saturada de gas cloruro de hidrógeno en acetato de etilo (2 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 2 horas. Retirar el disolvente. El compuesto del título se obtiene como un sólido blanco (60 mg, 91%). MS (m/z): 403 (M+1).

Los receptores de mGlu son receptores acoplados a la proteína G que modulan la excitabilidad neuronal. Aunque la neurotransmisión de glutamato desregulada ha estado ligada a la esquizofrenia, todos los antipsicóticos prescritos comúnmente actúan sobre los receptores de dopamina. Varios estudios apoyan la activación del receptor mGlu del Grupo II (que incluye mGlu2, mGlu3 o ambos) para el tratamiento de esquizofrenia. En particular, datos recientes demuestran que un agonista del receptor mGlu 2/3 tiene propiedades antipsicóticas y puede proporcionar una nueva alternativa para el tratamiento de esquizofrenia (Patil et al., Nature Medicine (2007) 13(3), 1102-1107). Estudios preclínicos usando ratones con depleción génica sugieren que las actividades de tipo antipsicótico de los agonistas de mGlu2/3 están mediadas por el receptor mGlu2. Los modelos de eficacia preclínica adicionales indican propiedades ansiolíticas, antidepresivas y neuroprotectoras de los agonistas de receptor mGlu2/3. Por lo tanto, los agonistas de mGlu2 pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos psiquiátricos, tales como trastorno bipolar, esquizofrenia, depresión y trastorno de ansiedad generalizada.

Ensayo FLIPR® con agonista de mGlu2 humano

Para estos estudios, se usan líneas celulares AV-12, derivadas de fibroblastos de Hámster Sirio y que expresan establemente el receptor mGlu2 humano y co-transfectadas con el transportador de glutamato de rata EAAT 1 (Transportador de Aminoácido Excitatorio 1) y la subunidad G α 15. La expresión de G α 15 permite que los receptores acoplados a Gi emitan señales a través de la trayectoria de fosfolipasa C, resultando en la capacidad para medir la activación del receptor mediante un ensayo fluorométrico de respuesta de calcio. Las líneas celulares son mantenidas mediante cultivo en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con alta glucosa y clorhidrato de piridoxina suplementado con 5% de suero fetal bovino dializado, piruvato de sodio 1 mM, HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetansulfónico) 10 mM, L-glutamina 1 mM y 5 μ g/ml de blasticidina (todos los medios se adquieren en Invitrogen). Los cultivos confluentes son pasados cada dos semanas usando una solución de disociación libre de enzima (Chemicon S-004-B). Las células son recolectadas 24 horas antes del ensayo y son dispensadas usando un dispositivo de siembra celular Matrix Well-Mate a 85.000 (mGlu2) o 115.000 (mGlu3) células por cavidad en placas recubiertas con poli-D-lisina, de pared negra, de 96 pocillos (BD BioCoat #354640) en medio que contiene solo 250 (mGlu2) o 125 (mGlu3) μ M de L-glutamina (añadida recientemente).

Los niveles de calcio intracelular se supervisan antes y después de la adición de compuestos usando un lector de placa de formación de imágenes fluorométricas (FLIPR®, Molecular Devices). El tampón de ensayo comprende solución de sal amortiguada de Hank (HBSS; Sigma) suplementado con HEPES 20 mM. El medio es retirado y las células son incubadas con 8 μ M de Fluo-3AM (Molecular Probes, F-1241; 50 μ l por cavidad) en tampón de ensayo durante 90 minutos a 25°C. La solución de tinte es retirada y remplazada con tampón de ensayo fresco (50 μ l por cavidad). Se lleva a cabo un ensayo FLIPR® de adición única que genera una curva de respuesta de concentración de 11 puntos (diluciones 3X empezando con 10 μ M) para el glutamato agonista (Fisher A125-100) antes de cada experimento para confirmar la respuesta EC₅₀ típica. Los resultados se analizan usando PRISM® v4.03 (Software GraphPad). Los compuestos ejemplificados de la presente invención se ensayan en un ensayo FLIPR® de adición única usando un perfil de respuesta de concentración de 10 puntos usando diluciones 3X comenzando con una concentración final de 25 μ M. Los compuestos ejemplificados de la presente invención se solubilizan como soluciones base de 10 mM en NaOH 0,1N y se almacenan a -20C. Se diluyen a

través de una serie de dilución de tres partes en tampón de ensayo. Después de tomar una lectura fluorescente inicial de 5 segundos en el instrumento FLIPR®, se añade un compuesto de la invención a la placa celular (50 µl por cavidad). Los datos se recogen cada segundos durante los primeros 30 segundos y después cada 3 segundos durante un total de 90 segundos para detectar actividad agonista. La respuesta máxima se define como la inducida por EC_{max} (glutamato 100 µM). El efecto del compuesto se mide como alturas de pico máxima menos mínima en unidades fluorescentes relativas (RFUs) corregidas para fluorescencia basal medida en ausencia de glutamato. Se realizan determinaciones usando las placas individuales. Los efectos agonistas se cuantifican como porcentaje de estimulación inducido solo por el compuesto con relación a la respuesta de glutamato máxima. Todos los datos se calculan como valores EC₅₀ relativos usando un programa de ajuste de curva logística de cuatro parámetros (ACTIVITY BASE® v5.3.1.22).

Los compuestos ejemplificados en la presente memoria se ensayaron esencialmente tal como se ha descrito anteriormente y exhibieron un valor EC₅₀ relativo en el ensayo FLIPR® de hMGLUR2 menor de 0,5 µM.

Los siguientes compuestos ejemplificados en la Tabla 16 se ensayaron esencialmente tal como se ha descrito anteriormente y exhibieron la actividad siguiente:

Tabla 16

Sumario de ensayo FLIPR® de hMGLUR2		
Nº Ej.	EC ₅₀ Relativo (nM)	% de eficacia relativa
1	46	92,6
2	57,2	78,5
10	69,1	89,0
12	5,18	92,1

15

Estos datos resumen la actividad de los compuestos de la Tabla 16 para actividad agonista funcional en el ensayo FLIPR® de hmGlu2 y demuestran que los compuestos son agonistas de mGlu2.

Reversión de la actividad hiperlocomotora inducida por fenciclidina (PCP) en ratas

La administración de agonistas del receptor NMDA, tales como cetamina o fenciclidina (PCP), produce efectos de tipo psicotomimético en humanos que son similares a los síntomas observados en pacientes con esquizofrenia. La capacidad de los agentes para revertir los efectos estimulantes locomotores de antagonistas de NMDA se usa frecuentemente como un modelo animal de psicosis, demostrando buena validez predictiva para detectar eficacia clínica de medicaciones para esquizofrenia y trastorno bipolar.

La actividad motora es supervisada colocando ratas macho Sprague-Dawley individuales (Harlan, Indianápolis, IN) en jaulas de cajas de zapato de plástico, transparentes, de las dimensiones 45 x 25 x 20cm, con una profundidad de 1 cm de virutas de madera como cama, y una rejilla de metal en la parte superior de la jaula. Los monitores motores (Kinder Scientific) consisten en un bastidor rectangular de 12 fotohaces dispuestos en una formación 8 x 4, (o una agrupación de alta densidad de 22 en un patrón de 15x7) a una altura de 5 cm, con un segundo bastidor (para medir los comportamientos de cultivo) a una altura de 15 cm. La jaula de caja de zapatos es colocada dentro de estos bastidores, con los bastidores sobre la parte superior de la mesa de 91 cm (3 pies) de alto en una habitación aislada. Un compuesto de la presente invención es dosificado (ruta intraperitoneal (i.p., sin profármaco) dentro de un intervalo de 0,3 - 10 mg/kg, 30 minutos antes de una dosis de estimulación de 5 mg/kg de fenciclidina (PCP). Un compuesto de la presente invención es dosificado (ruta oral, profármaco) dentro de un intervalo de 0,3 - 30 mg/kg, en ratas sometidas a ayuno durante la noche, 4 horas antes de una dosis de estimulación de 5 mg/kg de PCP. El día del ensayo, las ratas se colocan en la jaula de ensayo y se les deja aclimatarse durante 30 minutos antes de la estimulación de PCP; las ratas se supervisan durante unos 60 minutos adicionales después de la administración de PCP.

Los análisis de datos y los cálculos de ED₅₀ se realizan usando GraphPad PRISM® (San Diego, CA. USA). Los análisis de potencia han determinado que se necesitan 8-10 ratas por grupo para tener una potencia estadística apropiada para detectar diferencias de tratamiento (potencia = 0,8). Se realiza un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un ensayo de comparación múltiple de Dunnett post-hoc sobre la actividad locomotora de un total de 60 minutos. Los cálculos de ED₅₀ se realizan usando un ajuste de curva de regresión no lineal sobre los datos transformados del porcentaje de reversión para cada dosis.

40

El compuesto del Ejemplo 10 y sus profármacos correspondientes (Ejemplo 25) se midieron en este ensayo, realizado sustancialmente como anteriormente, y resultó en valores ED₅₀ de 0,9 mg/kg (administración i.p.) y 6,4 mg/kg (administración oral), respectivamente. Estos resultados demuestran que el precursor activo y su forma de profármaco exhiben una fuerte eficacia en este modelo farmacológico predictivo de eficacia en pacientes que padecen esquizofrenia y trastorno bipolar.

Reversión de actividad hiperlocomotora inducida por fenciclidina (PCP) en ratones

Este ensayo para reversión de la actividad hiperlocomotora inducida por fenciclidina (PCP) en ratones es realizado sustancialmente como el ensayo de reversión de actividad hiperlocomotora inducida por fenciclidina (PCP) en ratas proporcionado anteriormente, usando ratones en lugar de ratas y con los cambios indicados a continuación.

La actividad motora es supervisada colocando ratones macho ICR individuales (CD-1) (Harlan, Indianápolis, IN) en jaulas de cajas de zapato de plástico, transparentes, de las dimensiones 45 x 25 x 20cm, con una profundidad de 0,5 cm de virutas de madera como cama, y una tapa de plástico sobre la jaula. Los monitores motores (Kinder Scientific) consisten en un bastidor rectangular de 12 fotohaces dispuestos en una formación 8 x 4, (o una agrupación de alta densidad de 22 en un patrón 15x7) a una altura de 2,5 cm. La jaula de caja de zapatos es colocada dentro de estos bastidores, con los bastidores sobre la parte superior de una mesa de 91 cm (3 pies) de alto en una habitación aislada. Un compuesto de la presente invención es dosificado (ruta intraperitoneal, sin profármaco) normalmente dentro de un intervalo de 0,3 - 30 mg/kg: aunque pueden usarse dosis superiores, 30 minutos antes de una dosis de estimulación de 7,5 mg/kg de fenciclidina (PCP). El día del ensayo, los ratones se colocan en la jaula de ensayo y se les permite aclimatarse durante 45 minutos antes de la estimulación de PCP; los ratones se supervisan durante 60 minutos adicionales después de la administración de PCP.

Los análisis de potencia han determinado que se necesitan 7-8 ratones por grupo para tener potencia estadística apropiada para detectar diferencias de tratamiento (potencia = 0,8).

Se realizaron experimentos de respuesta de dosis en los Ejemplos 1, 2, 3 y 11 después de la administración i.p. Los valores ED₅₀ fueron los siguientes: Ejemplo 1 = 18,4 mg/kg; Ejemplo 2 = 14,4 y 14,3 (2 experimentos independientes); Ejemplo 3 = 17,1 mg/kg; Ejemplo 11 = 1,2 mg/kg. Finalmente, el Ejemplo 8 revirtió la actividad locomotora inducida por PCT en un 52% después de una única dosis de 10 mg/kg. Estos resultados demuestran que compuestos ejemplificados dentro del alcance de la presente invención son medicamentos útiles para la esquizofrenia y el trastorno bipolar.

Atenuación de hipertermia inducida por estrés en ratas

La hipertermia, una elevación en la temperatura corporal nuclear, es un fenómeno natural que ha sido demostrado de manera fiable en muchos mamíferos, incluyendo seres humanos, en respuesta al estrés. En muchos trastornos de ansiedad, la hipertermia ocurre como parte de la patología y se considera un síntoma de la enfermedad. Se cree que los compuestos que atenúan la hipertermia inducida por estrés en animales son útiles en el tratamiento de trastornos de ansiedad en seres humanos. El trastorno de ansiedad generalizada es un ejemplo de dichos trastornos que pueden ser tratados con dichos compuestos. El procedimiento mínimamente invasivo y convencional para analizar la hipotermia inducida por estrés es midiendo la temperatura corporal, y los incrementos inducidos por estrés en la temperatura corporal mediante termómetro rectal. Se ensayaron ratas macho Fischer F-344 (Harlan, Indianápolis, IN, USA) con un peso entre 275 - 350 g. Todos los animales se alojan individualmente con alimento y agua automatizados disponibles "ad libitum", y se mantienen en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (luces activadas a las 6:00). Los animales se someten a ayuno aproximadamente 12-18 horas antes del experimento, el cual es conducido durante la fase de luz. Se administra una dosis a las ratas una hora antes del experimento por vía de administración intraperitoneal (i.p.) en un volumen de dosis de 1 ml/kg. El vehículo usado fue agua con NaOH añadido suficiente para conseguir un pH de entre 5-7. El antagonista de mGluR5 MTEP (3-[(2-metil-1,3-tiazol-4-il)etil]piridina), y agonista de mGlu2/3 LY317206 se usaron como controles de calidad, ya que producen una eficacia fiable en este modelo inmediatamente después de la dosificación, las ratas son devueltas a sus jaulas, y el experimentador apaga las luces y abandona la habitación. La habitación de dosificación permanece a oscuras durante el periodo de pretratamiento restante de 1 hora.

Después del periodo de pretratamiento, las ratas son llevadas individualmente a una habitación adyacente iluminada brillantemente donde se determinan las temperaturas corporales de línea base mediante inserción de una sonda rectal lubricada con aceite mineral. La temperatura corporal es valorada usando un termómetro Microprobe PHYSITEMP BAT-12® con una sonda rectal PHYSITEMP RET-2® (Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, USA) para ratas. La sonda se inserta aproximadamente 2 cm en el recto, para medir la temperatura corporal nuclear (esta es la temperatura corporal de línea base, T1, en grados Celsius). Diez minutos más tarde, se registra una segunda medición de temperatura corporal (T2). La diferencia en temperatura corporal (T2 - T1) se define como la respuesta hipertérmica inducida por estrés. La dosis a la que un compuesto de la invención produce una reducción del 35% en la respuesta hipertérmica inducida por estrés, con relación a la respuesta del vehículo, se define como la dosis T₃₅.

En este ensayo realizado sustancialmente tal como se ha indicado anteriormente, se midió que el compuesto del Ejemplo 10 tenía un T35 de 1,7 mg/kg y una reducción máxima de la hipertemia inducida por estrés del 75% a 10 mg/kg. En comparación, MTEP (3 mg/kg) y LY317206 (20 mg/kg) redujeron la hipertemia inducida por estrés en un 53% y un 32%, respectivamente. Estos resultados demuestran que la actividad agonista de mGlu2 produce un efecto de tipo ansiolítico en este modelo de rata de ansiedad inducida por estrés y son consistentes con la actividad ansiolítica informada de agonistas de mGlu2/3 en estudios preclínicos (Imre (2007) CNS Drug Rev. 13: 444-464) y clínicos (Dunayevich et al., (2008) Neuropsychopharm. 33: 1603-1610). Estos resultados sugieren una utilidad clínica potencial del agonismo de mGlu2 para el tratamiento de los trastornos de ansiedad.

Ensayo de nado forzado en roedores

El ensayo de prueba de nado forzado en roedores está bien caracterizado y presenta una buena validez predictiva para detectar actividad de tipo antidepresiva de medicaciones actuales para trastorno depresivo mayor. En este ensayo, los mecanismos con supuesta actividad de tipo antidepresivo disminuyen la inmovilidad en un breve episodio de nado forzado ineludible.

El ensayo de nado forzado se realizó sobre ratones (ratones macho, NIH-Swiss, de 20-25 g, Harlan Sprague-Dawley, Indianápolis, IN). Los ratones se colocaron en cilindros de plástico (diámetro 10 cm; altura: 25 cm) llenos hasta 6 cm con agua a 22-25°C durante seis minutos. La duración de la inmovilidad se registra durante los últimos 4 minutos de un ensayo de seis minutos. Los compuestos de los Ejemplos 2, 3, 8, 11 y 12 son ensayados después de la dosificación interaperitoneal, 60 minutos antes del ensayo. La imipramina se usa como un control positivo para estos estudios. Los compuestos se formulan en un vehículo acuoso, con NaOH mínimo añadido. La cantidad de tiempo inmóvil consumido (definida como movimientos solo necesarios para mantener la cabeza del sujeto por encima del agua) es la medida dependiente y es registrada por un observador que ignora el tratamiento con fármaco de los sujetos. Los datos se analizan mediante ensayo Dunnett post-hoc con nivel alfa ajustado a 0,05. Se calcula un valor ED₆₀ (60% de la cantidad de inmovilidad relativa con relación a los controles de vehículo) para estimar la potencia de los compuestos de ensayo.

El Ejemplo 2 se ensayó en dos experimentos independientes y produjo valores ED₆₀ de 9,8 y 4,2 mg/kg. El Ejemplo 3 era más potente y se estimó que el valor ED₆₀ era menor que la dosis más baja ensayada de 3 mg/kg. El ED₆₀ para el Ejemplo 8 fue de 7,95 mg/kg. El Ejemplo 11 tenía un ED₆₀ de 0,88 mg/kg; sin embargo, la eficacia se perdió en un segundo estudio en el que se evaluaron dosis superiores (3 - 30 mg/kg). El Ejemplo 12 produjo un ED₆₀ de 3,31 mg/kg. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones potencialmente útiles para la depresión.

Tamiz de inhibición de GlySar PepT1 *in vitro* y determinación de IC₅₀

Se establecieron ensayos PepT1 para examinar la capacidad de los compuestos de profármacos de aminoácido para interactuar con el vehículo de absorción intestinal PepT1.

Se cultivan células HeLa, derivadas de células de cáncer humano, (American Type Culture Collection) en medio Hyclone (Invitrogen, Cat# SH30243) que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS), aminoácidos no esenciales (NEAA) 0,1 mM y 100 unidades/ml de penicilina con 100 µg/ml de estreptomina a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. La línea celular se usa en hasta 40 pasos y después se desecha. Células congeladas en viales de 1 ml se descongelan en baño de agua durante 1-2 minutos y se añaden a 5 ml de medio celular a 37°C. A cada uno de los matraces T, se proporcionan 8,5 ml del medio fresco y 1,5 ml de la solución base celular. Las células son pasadas dos veces durante una semana. Esto se consigue enjuagando los matraces con 10 ml de solución salina amortiguada con fosfato-ácido etilendiaminatetraacético (PBS-EDTA), añadiendo 2 ml de tripsina durante 2-5 minutos, para separar las células y añadiendo 8 ml de medio fresco para inhibir la actividad adicional de la tripsina. Cada nuevo matraz recibe una combinación de 8,5 ml de medio fresco y 1,5 ml de solución base celular, para obtener una dilución celular 1:6. Las células se incuban a 37°C, hasta que están preparadas para el estudio de captación.

Las células que son 70-80% confluentes en los matraces-T son colocadas en placas 1 día antes del procedimiento de transfección. El matraz con la solución base celular se trata con PBS-EDTA y tripsina para separar las células, y el medio de transfección se usa a partir de este punto. El medio de transfección consiste de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) + NEAA. A cada pocillo, se añaden 0,5 ml de mezcla celular (la concentración celular deseada es de 1,3x10⁵) y las células se incuban a 37°C durante la noche. Veinticuatro horas antes del ensayo, las células son transfectadas con PEPT1. La mezcla de transfección se prepara mezclando 600 µl de medio de transfección libre de suero, 18 µl de FUGENE6® (Roche Diagnostica) y 11 µg de ADN de PepT1. El complejo reactivo de transfección-ADN se incuba durante 20 minutos y se añaden 24 µl del complejo reactivo-ADN a cada pocillo.

La inhibición de la actividad de captación de [glicil-1-2-¹⁴C]gliclisarcosina (GlySar) mediada por PEPT1 se mide en las células cultivadas en las placas de 24 pocillos 24 horas post-transfección tal como se ha publicado anteriormente (Zhang et al. 2004. J. Pharm. Exper Ther. 310:437-445). Para medir la capacidad de un compuesto de la presente invención para

inhibir la captación de [¹⁴C]Gly-Sar, los compuestos de profármacos se incuban con células HeLa temporalmente transfectadas con PePT1 confluyente 80 a 90% a 5 mM en de medio de captación pH 6,0 en presencia de 5 μM de [¹⁴C]Gly-Sar (Moravek Biochemicals) y Gly-Sar 20 μM frío. El medio de captación consiste en NaCl 140 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgSO₄ 0,8 mM, glucosa 5 mM, tampón tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) 25 mM. A continuación, la solución se lleva a pH 6,0 usando ácido 2-(N-morfolin)etansulfónico. El volumen de incubación es 500 μl y es realizado a temperatura ambiente durante 3 minutos. Para detener la captación en la conclusión del tiempo de incubación, el medio de captación se aspira de la monocapa celular y 500 μl de PBS enfriado en hielo se añaden al pocillo. Las células se lavan 3 veces con 500 μl de PBS a temperatura ambiente sin Ca⁺² y Mg⁺². A continuación, las células son lisadas con 300 μl de 1% de solución de TRITON® X100 H₂O, Se retira una alícuota de 200 μl y se determina la radioactividad por conteo de escintilación líquida para medir el [¹⁴C]Gly-Sar presente en cada uno de los pocillos de incubación. Se establece un control sin inhibidor y se calcula el porcentaje de inhibición de cada profármaco con respecto a este control. Se realizan un control negativo (Glicina) y dos controles positivos (cefadroxil y cefalexina) en paralelo en cada experimento para demostrar la viabilidad del sistema de ensayo. Los compuestos profármacos con inhibición de captación de GlySar igual o mejor que la cefalexina se consideran aceptables. Los valores medios ± desviación estándar son 10,1±9,5% (n=19) para Glicina, 53,2 ± 13,2 % (n=19) para Cefadroxil, y 37,5±14,7% (n=18) para Cefalexina.

Para el ensayo de IC₅₀ de PepT, los compuestos de profármaco se incuban a un rango de concentraciones (0,0625 a 25 mM) en presencia de [¹⁴C]Gly-Sar 5 μM y Gly-Sar frío 20 μM. Los procedimientos de incubación y muestreo son exactamente los mismos que para el tamiz PepT1 descrito anteriormente. Se evalúan los datos de captación de [¹⁴C]Gly-Sar para cada una de las concentraciones del compuesto de profármaco y se calculan los valores IC₅₀.

Los siguientes compuestos se ensayaron esencialmente tal como se ha descrito anteriormente y exhibieron la actividad siguiente:

Tabla 17

Ejemplo	% de Inhibición de captación de medio GlySar
16	53,9%
21	57,4%
22	46,7%
24	47,1%

Estos resultados demuestran que los compuestos de la Tabla 17 son capaces de ser absorbidos oralmente vía el vehículo PepT1 y son tan buenos como o mejores que cefadroxil y cefalexina (Zhang et al, 2004. JPET 310:437-445), que es predictivo de la absorción oral humana vía el vehículo PepT1,

Ensayo de hidrólisis de profármaco intestinal *in vitro*

Se obtienen homogenados intestinales de duodeno humano congelados (relación tejido:tampón 1:2 usando tampón Fosfato Tris 100 mM, pH 7,4) de Celsius In Vitro Technologies (Baltimore, MD) que estaban libres tanto de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) como de EDTA.

Cada lote de duodeno humano se obtiene de un único donante y el intestino es raspado y las secciones se congelan por separado. Todas las recolecciones de tejido original se realizan a 4°C y se congelan inmediatamente a -70°C. Los homogenados intestinales humanos se descongelan y diluyen a una concentración de proteína final de 0,5 mg/ml en tampón PBS 100 mM, pH 7,4 inmediatamente antes de las incubaciones.

Las incubaciones se realizan en placas de 96 pocillos y todos los compuestos de profármaco se ensayan en por duplicado cada día. Las soluciones base de compuesto de profármaco se preparan en agua a una concentración de 1 mM. Se colocan una alícuota de 200 μl de 0,5 mg/ml de homogenado intestinal y 196 μl de tampón PBS 100 mM en una placa de 96 pocillos en un baño de agua a 37°C. Para asegurar que la hidrólisis no es debida a la inestabilidad química, los compuestos de profármaco se incuban también con tampón PBS solo sin homogenado intestinal. Usando un pipeteador de 96 pocillos, se transfieren 4 μl de solución 1 mM del compuesto de profármaco en el homogenado. Inmediatamente después de la adición del compuesto de profármaco (tiempo cero) y después de 1 hora de incubación, se retiran 50 μl de las muestras de incubación usando un pipeteador de 96 pocillos simultáneo desechable automatizado y se añaden directamente a 200 μl de solución de inactivación de metanol que contiene 100 ng/ml de estándar interno. A continuación, las muestras se centrifugan a 3.500 rpm durante 5 minutos a 10°C. El sobrenadante (200 μl) se transfiere a una placa

final de PCR de 96 pocillos y se sella para un análisis mediante LC/MS/MS.

Las concentraciones de compuestos hidrolizados de la presente invención en las mezclas de incubación se determinan usando detección LC/MS/MS en un espectrómetro de masas cuadrupolo Sciex API 4000™ con Analyst versión 1.4.2, TURBOIONSPRAY®, ionización positiva y supervisión de reacción seleccionada (SRM). Se usa una columna de HPLC Waters ATLANTIS® T3 (20 x 2,1 mm, 5 µM) a temperatura ambiente con un caudal de 1,0 ml/min y un gradiente de fase móvil del 0,1% de fase móvil A al 99% de fase móvil A. La fase móvil A es 1.000:5 agua:ácido heptafluorobutérico y la fase móvil B es 1:1 metanol:ácido acético helado.

Las concentraciones de compuestos hidrolizados de la presente invención en las mezclas de incubación intestinal se determinan a partir de curvas estándares preparadas mediante dilución replicada de dos partes partiendo de 10 µM en 100 mM de PBS pH 7,4 e inactivadas subsecuentemente con solución estándar interna-metanol idénticas a las muestras. Los promedios y desviaciones estándares se calculan usando MICROSOFT® Office EXCEL® 2007. La cantidad de hidrólisis se determina como un porcentaje molar de compuesto formado con relación a la concentración de compuesto de fármaco añadido. La hidrólisis del control positivo, compuesto de fármaco interno A al compuesto interno de fármaco A, realizada en cada lote promedió un 75,3% (n=20). A continuación, los valores finales son normalizados con relación a la formación del compuesto interno de fármaco A.

Los siguientes compuestos se ensayaron esencialmente tal como se ha descrito anteriormente y exhibieron la siguiente actividad:

Tabla 18

Nº Ej.	% de hidrólisis intestinal humana in vitro (con relación al control positivo)
17	63,3%
18	65,5%
19	58,1%
21	63,8%

Estos resultados demuestran que los compuestos de la Tabla 18 son capaces de ser hidrolizados en el intestino humano.

Ensayo de hidrólisis de homogenado s-9 de hígado humano in vitro

Se obtuvieron fracciones S9 de hígado de Xenotech LLC (Lenexa, MO). El lote es de una combinación de dos donantes, uno masculino y uno femenino. La fracción S9 de hígado se prepara y diluye usando un tampón de homogenización que consiste en Tris 50mM, pH 7,4 a 4°C y cloruro de potasio 150mM sin EDTA. Los compuestos de fármacos se incuban en el homogenado de hígado durante 2 horas a 37°C, después de lo cual la concentración del compuesto se determina mediante LC/MS/MS. La hidrólisis de clopidogrel a ácido carboxílico de clopidogrel se utiliza como un control de ensayo positivo.

Las incubaciones se realizan en un formato de 96 pocillos y todos los compuestos de fármaco se ensayan por duplicado cada día. Las soluciones base del compuesto de fármaco se preparan en agua a una concentración de 1 mM. La fracción S9 de hígado humano se diluye a una concentración final de proteína de 0,5mg/ml en tampón de PBS100mM, pH 7,4.

Se colocan una alícuota de 200 µl de 0,5mg/ml de homogenado S-9 de hígado humano y 196 µl de tampón de PBS 100 mM en una placa de 96 pocillos en un baño de agua a 37°C. Usando un pipeteador de 96 pocillos, se transfieren 4 µl de la solución de fármaco 1 mM al homogenado. Para asegurar que la hidrólisis no es debida a la inestabilidad química, los compuestos de fármaco se incuban también con tampón de PBS solo sin S-9 de hígado. Inmediatamente después de la adición del compuesto de fármaco (tiempo cero) y después de 1 hora de incubación, se retiran 50 µl de muestra de la mezcla de incubación usando un pipeteador de 96 pocillos simultáneo desechable automatizado y se añaden directamente a 200 µl de metanol de solución de inactivación que contiene 100 ng/ml de estándar interno. A continuación, las muestras se centrifugan a 3.500 rpm durante 5 minutos a 10°C. El sobrenadante (200 µl) se transfiere a una placa final de PCR de 96 pocillos y se sella para un análisis mediante LC/MS/MS.

La cuantificación LC/MS/MS del compuesto formado durante la incubación se realiza en un Sciex API 4000, Analyst versión 1.4.2, TURBOIONSPRAY®, ionización positiva y supervisión de reacción seleccionada (SRM). La columna de HPLC usada es una columna Waters ATLANTIS® T3 (20 x 2,1 mm, 5 µm) a temperatura ambiente con un caudal de fase

móvil de 1,0 ml/min. La fase móvil A es 1000:5 agua: ácido heptafluorobutérico y la fase móvil B es 1:1 metanol/ácido acético helado. Se utiliza un gradiente de fase móvil partiendo de la relación de fase móvil A/B de 99,9/0,1 y terminando en 1/99.

- 5 Las concentraciones de compuesto hidrolizado en las mezclas de incubación se determinan a partir de curvas estándares preparadas mediante dilución replicada dos veces comenzando con 10 μ M en 100 mM de PBS pH 7,4 e inactivadas subsecuentemente con solución de estándar interno-metanol idéntica a las muestras. Los promedios y desviaciones estándares se calculan usando MICROSOFT® Office EXCEL® 2007. Los valores finales se presentan como un porcentaje molar de compuesto formado con relación a la concentración de compuesto de profármaco añadido. La hidrólisis de clopidogrel a ácido carboxílico de clopidogrel se usa como el control positivo y promedia el 73,0% (n=27).
- 10 Los siguientes compuestos se ensayaron esencialmente tal como se ha descrito anteriormente y exhibieron la siguiente actividad:

Tabla 19

Nº Ej.	% de hidrólisis en S9 de hígado humano in vitro
26	41,2%
30	15,9%
32	19,6%
37	32,7%

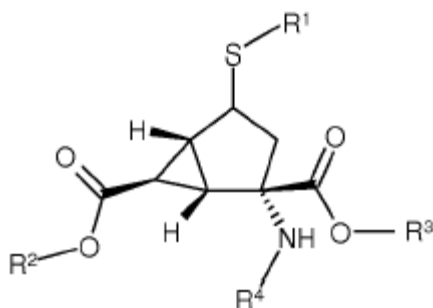
Estos resultados demuestran que los compuestos de la Tabla 19 son capaces de ser hidrolizados en el hígado humano.

- 15 Los compuestos de la presente invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas que usan uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables y administrados por una diversidad de rutas. Preferiblemente, dichas composiciones son para administración oral o intravenosa. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos de preparación de las mismas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, et al., eds., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005).
- 20 Los compuestos de la presente invención son en general efectivos sobre un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente caen dentro del intervalo de aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo indicado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras en otros casos pueden emplearse dosis todavía más grandes y, por lo tanto, el intervalo de dosificación anterior no pretende limitar, en modo alguno, el alcance de la invención. Se entenderá que la cantidad del compuesto administrada realmente será determinada por un especialista, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a ser tratada, la ruta de administración elegida, el compuesto real o los compuestos administrados, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula

5

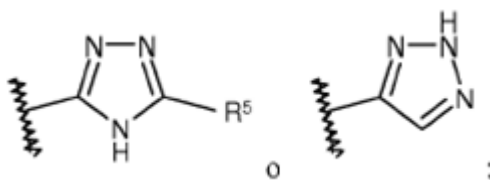


10

en la que

R¹ es

15



R² es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo, en el que bencilo está opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, o alcoxi C₁-C₃;

20

R³ es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo, en el que bencilo está opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, o alcoxi C₁-C₃;

R⁴ es hidrógeno, (2S)-2-amino-propanoilo, (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4-metil-pentanoilo o 2-aminoacetilo;

R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo;

25

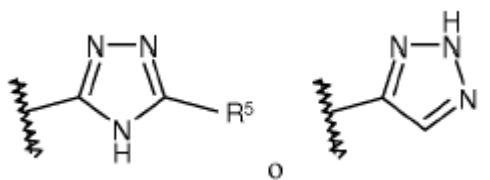
con la condición de que cuando R² y/o R³ no son hidrógeno, entonces R⁴ es hidrógeno; con la condición de que cuando R⁴ no es hidrógeno, entonces R y/o R son hidrógeno; y

con la condición de que R⁵ puede ser hidrógeno cuando el átomo de azufre está unido al sistema anillo biciclo[3.1.0]hexano en la configuración S; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que

R¹ es

30



35

R² es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo, en el que bencilo está opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor o alcoxi C₁-C₃;

R³ es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo, en el que bencilo está opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor o alcoxi C₁-C₃;

R⁴ es hidrógeno, (2S)-2-aminopropanoilo, (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, (2S)-2-amino-4-metil-pentanoilo o 2-aminoacetilo;

R⁵ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con 1 a 3 átomos de flúor, -NH₂ o ciclopropilo;

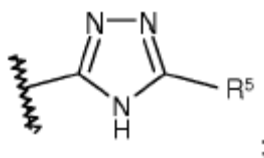
5 con la condición de que cuando R² y/o R³ no son hidrógeno, entonces R⁴ es hidrógeno; con la condición de que cuando R⁴ no es hidrógeno, entonces R² y/o R³ son hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que

R² es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃; y

10 R³ es hidrógeno, 2,2-dimetil-propioniloximetilo o bencilo opcionalmente sustituido con uno a dos átomos de flúor, -CF₃ u -OCH₃; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R¹ es



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R² es hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que R³ es hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R⁴ es hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un trastorno psiquiátrico seleccionado de entre el grupo que consiste en trastorno bipolar, esquizofrenia y trastorno de ansiedad generalizada.

30 11. Compuesto para su uso según la reivindicación 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del trastorno bipolar.

12. Compuesto según la reivindicación 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la esquizofrenia.

35 13. Compuesto según la reivindicación 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del trastorno de ansiedad generalizada.