

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 166**

51 Int. Cl.:

C07C 271/24	(2006.01)	C07C 233/52	(2006.01)
C07C 229/50	(2006.01)	C07K 5/06	(2006.01)
C07C 237/12	(2006.01)		
A61K 31/16	(2006.01)		
A61K 31/325	(2006.01)		
A61K 31/195	(2006.01)		
A61K 31/215	(2006.01)		
A61P 25/18	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)		
C07C 323/60	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2013 PCT/US2013/023529**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116174**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2013 E 13702872 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2809647**

54 Título: **Agonistas de mGLU2/3**

30 Prioridad:

01.02.2012 EP 12382038
02.04.2012 US 201261619139 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BAKER, STEPHEN, RICHARD;
BEADLE, CHRISTOPHER DAVID;
CLARK, BARRY PETER;
MONN, JAMES ALLEN y
PRIETO, LOURDES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 592 166 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

Agonistas de mGlu2/3

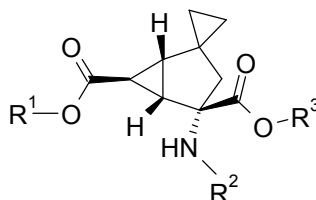
La presente invención se refiere a agonistas de mGlu2/3, más específicamente, a novedosos biciclo[3.1.0]hexanos sustituidos en 4, sus composiciones farmacéuticas y sus usos terapéuticos.

El L-glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central y se refiere como un aminoácido excitador. Los receptores de glutamato metabotrópicos (mGlu) son receptores acoplados a proteínas G que modulan la excitabilidad neuronal. El tratamiento de trastornos neurológicos o psiquiátricos se ha relacionado con la activación selectiva de los receptores de aminoácidos excitadores mGlu. Más particularmente, los estudios demuestran que los agonistas de mGlu2/3 tienen propiedades analgésicas, antipsicóticas, ansiolíticas, antidepresivas y neuroprotectoras. Por lo tanto, estas propiedades de los agonistas de mGlu2/3 pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos neurológicos, tales como afecciones de dolor crónico, o de trastornos psiquiátricos, tales como esquizofrenia, trastorno bipolar, también conocido como trastorno maniaco depresivo, trastorno de ansiedad generalizada y trastorno de estrés postraumático.

El documento WO9717952 da a conocer algunos compuestos de biciclo[3.1.0]hexano sustituidos en 4 que se afirma que son antagonistas de receptores de aminoácidos excitadores. M.J. O'Neil y col., Drugs of the Future 2010,35(4), 307-324 da a conocer ciertos compuestos de biciclo[3.1.0]hexano como agonistas de mGlu2/3.

Un tono glutamatérgico excesivo se ha implicado en muchos estados de enfermedad del sistema nervioso central; sin embargo, en la práctica clínica se carece de agentes eficaces para corregir tales estados patofisiológicos. En particular, la aplicación clínica no se ha realizado debido a la falta de agonistas de mGlu2/3 con propiedades de tipo fármaco apropiadas. Por tanto, sigue existiendo una necesidad de agonistas de mGlu2/3 eficaces, potentes. La presente invención proporciona biciclo[3.1.0]hexanos sustituidos en 4 novedosos, que son agonistas de mGlu2/3 potentes y eficaces. Los profármacos particulares dentro del alcance de la presente invención se absorben bien tras la administración oral y posteriormente se hidrolizan para liberar el metabolito activo en la circulación sistémica y por lo tanto, son adecuados para el desarrollo clínico. Tales compuestos nuevos de la presente invención podrían abordar la necesidad de tratamientos eficaces, potentes para trastornos neurológicos, tales como afecciones de dolor crónico, incluyendo dolor persistente, dolor neuropático, dolor inflamatorio crónico o dolor visceral, o de trastornos psiquiátricos, tales como esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno de ansiedad generalizada o trastorno de estrés postraumático.

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula I



Fórmula I

en la que

R¹ es hidrógeno, R² es hidrógeno y R³ es hidrógeno;

R¹ es hidrógeno, R² es (2S)-2-aminopropanoilo y R³ es hidrógeno;

R¹ es hidrógeno, R² es (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo y R³ es hidrógeno;

R¹ es hidrógeno, R² es 2-aminoacetilo y R³ es hidrógeno;

R¹ es bencilo, R² es hidrógeno y R³ es bencilo; o

R¹ es (2-fluorofenil)metilo, R² es hidrógeno y R³ es (2-fluorofenil)metilo;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La presente invención proporciona ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Como una realización particular, la presente invención proporciona ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

Como una realización particular, la presente invención proporciona la sal ácida de clorhidrato del ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

La presente invención proporciona ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-aminopropanoilo]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Como una realización particular, la presente invención proporciona clorhidrato del ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-

aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

Como una realización particular, la presente invención proporciona ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico; 1,4-dioxano (1:0,5); clorhidrato.

- 5 La presente invención proporciona ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Como una realización particular, la presente invención proporciona clorhidrato del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

- 10 La presente invención proporciona ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Como una realización particular, la presente invención proporciona clorhidrato del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

- 15 La presente invención proporciona (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Como una realización particular, la presente invención proporciona (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo; 1,4-dioxano; clorhidrato.

La presente invención proporciona (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo] o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 20 Como una realización particular, la presente invención proporciona clorhidrato del (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo].

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-

- 25 dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o el (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo], o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

- 30 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o el (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo], o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

- 35 La presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno neurológico o psiquiátrico que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, del (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o del (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo], o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 45 La presente invención proporciona el uso del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, del (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o del (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo], o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para la fabricación de

un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico o psiquiátrico.

La presente invención proporciona el ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-aminopropanoilo]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o el (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo], o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en terapia. La presente invención proporciona también el ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-aminopropanoilo]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o el (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo] o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico o psiquiátrico.

Además, la presente invención proporciona realizaciones preferidas de los procedimientos y usos como se describe en el presente documento, en las que el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en dolor persistente, dolor neuropático, dolor inflamatorio crónico y dolor visceral y el trastorno psiquiátrico se selecciona del grupo que consiste en esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno de ansiedad generalizada y trastorno de estrés postraumático.

Como se usa anteriormente y a lo largo de la descripción de la invención, se entenderá que los siguientes términos y expresiones, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

Un "profármaco" es una clase de fármacos, inicialmente en forma inactiva, que se convierte en forma activa en el organismo mediante procesos metabólicos normales, en el que en la fórmula I R^1 es hidrógeno, R^2 es (2S)-2-aminopropanoilo y R^3 es hidrógeno; R^1 es hidrógeno, R^2 es (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo y R^3 es hidrógeno; R^1 es hidrógeno, R^2 es 2-aminoacetilo y R^3 es hidrógeno; R^1 es bencilo, R^2 es hidrógeno y R^3 es bencilo; o R^1 es (2-fluorofenil)metilo, R^2 es hidrógeno y R^3 es (2-fluorofenil)metilo. Un "compuesto activo" o "activo" es otro nombre para una forma activa que se administra al organismo, por ejemplo, por vía intravenosa o intraperitoneal, en el que R^1 , R^2 y R^3 de la fórmula I son hidrógeno. Un "metabolito activo" es otro nombre para una forma activa resultante de una conversión tal de un profármaco en el organismo mediante procesos metabólicos normales, en el que R^1 , R^2 y R^3 de la fórmula I son hidrógeno.

Un "vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" es un medio aceptado en general en la técnica para la administración de agentes biológicamente activos a mamíferos, p. ej., seres humanos.

"Sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas, de los compuestos de la presente invención.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" quiere decir la cantidad del compuesto, o su sal farmacéuticamente aceptable, de la presente invención o una composición farmacéutica que contiene un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de o el efecto terapéutico deseado sobre un tejido, sistema, animal, mamífero o ser humano buscado por el investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico.

Los términos "tratamiento", "tratar", "tratando" y similares pretenden incluir la ralentización o la reversión de la progresión de un trastorno. Estos términos también incluyen el alivio, la mejora, la atenuación, la eliminación o la reducción de uno o más síntomas de un trastorno o afección, incluso si el trastorno o afección no se elimina realmente e incluso si la progresión del trastorno o la afección mismos no se ralentiza o revierte.

De acuerdo con la nomenclatura estándar usada a lo largo de esta divulgación, la porción terminal de la cadena lateral designada se describe en primer lugar, seguida de la funcionalidad adyacente hacia el punto de unión. Por ejemplo, un sustituyente metilsulfonilo equivale a $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-}$.

Los compuestos de la presente invención son capaces de reaccionar, por ejemplo, con varios ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácido o sales de adición de base farmacéuticamente aceptables. Tales sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas se conocen bien en la técnica. Véase, p. ej., P. Stahl y col., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCH/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge y col., "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 66, N.º 1, enero de 1977.

Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas usando un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y se administran por una diversidad de vías. Preferentemente, tales composiciones son para administración oral o intravenosa. Tales composiciones farmacéuticas y los procedimientos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro y col., ed., 21ª ed., Mack Publishing Co., 2005).

El compuesto de la presente invención administrado realmente se determinará por un médico en función de las circunstancias pertinentes, incluyendo la afección que se va a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto o compuestos reales de la presente invención administrados, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual y la gravedad de los síntomas del paciente. Las dosificaciones por día entran dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 300 mg. En algunos casos, pueden ser más adecuados los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis incluso más grandes.

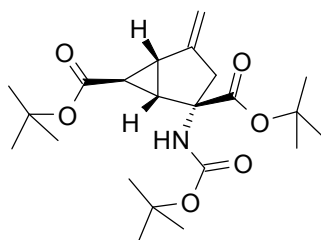
Los compuestos de la presente invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, así como mediante los descritos en las preparaciones y ejemplos que aparecen más adelante. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las vías descritas se pueden combinar de diferentes maneras para preparar los compuestos de la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son según se definen anteriormente. En general, los reactivos y los materiales de partida están fácilmente disponibles para el experto en la técnica. Se pueden preparar otros mediante técnicas estándar de química orgánica y heterocíclica, técnicas que son análogas a las síntesis de compuestos activos estructuralmente similares conocidos y los procedimientos descritos en las preparaciones y ejemplos que aparecen a continuación incluyendo cualquier procedimiento novedoso. La denominación de las siguientes preparaciones y ejemplos se realiza usando Symyx Draw 3.1.

Como se usan en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados indicados: "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alta presión; "CL" se refiere a cromatografía líquida; "EM (ES+)" se refiere a espectroscopía de masas usando ionización por electropulverización; "EM" designa espectroscopía de masas; "SFC" se refiere a cromatografía de fluidos supercríticos; "RMN" se refiere a resonancia magnética nuclear; "CCF" se refiere a cromatografía en capa fina; "TR" se refiere a tiempo de retención; "UV" se refiere a luz ultravioleta; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "PBS" se refiere a una solución salina tamponada con fosfato; "PCR" se refiere a reacción en cadena de la polimerasa; "SCX" se refiere intercambio catiónico fuerte; y "HLB" se refiere a equilibrio hidrófilo-lipófilo.

Preparación 1

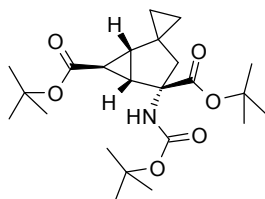
(1S,2S,5R,6S)-2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo



Se carga un matraz de fondo redondo de 250 ml secado al horno con bromuro de metiltrifenilfosfonio (5,41 g, 14,9 mmol) y tetrahidrofurano (93 ml). Se enfría la suspensión hasta 0 °C y se añade, gota a gota, una solución 1M de bis(trimetilsilil)amida de sodio en tetrahidrofurano (16,08 ml, 16,08 mmol). Se agita la mezcla amarilla brillante resultante a 0 °C durante 20 minutos antes de añadir una solución de (1S,2S,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo (5,09 g, 12,4 mmol, véase el documento WO03/104217/A2 para los detalles de la síntesis) en tetrahidrofurano (31 ml). Se deja calentar la reacción hasta temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. Se reparte la mezcla entre acetato de etilo (500 ml) y agua (350 ml). Se descarta la fase acuosa y se lava la fase orgánica con salmuera (200 ml). Se seca la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra a presión reducida. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (5:95 hasta 20:80) proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco (4,84 g, 11,2 mmol). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 1,45 (m, 27H), 1,87 (t, J = 2,9 Hz, 1H), 1,98 (m, 1H), 2,43 (m, 2H), 3,07 (m ancho, 1H), 4,86 (s ancho, 1H), 5,03 (d, J = 2 Hz, 1H), 5,1-5,3 (s ancho, 1H).

Preparación 2

(1S,2S,5R,6S)-2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo



Se prepara una solución exenta de etanol de diazometano en éter dietílico cargando el colector frío de un aparato mini-Diazald de Aldrich con hielo seco y llenando el mismo con *iso*-propanol una tercera parte. En la porción de reacción del aparato se coloca una solución de hidróxido potásico (740 mg, 13,2 mmol) en agua (1,5 ml). A esta

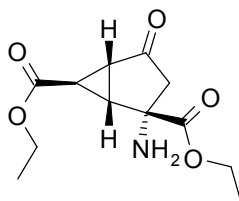
solución se añade una mezcla de éter monoetílico de dietilenglicol (4 ml) y éter dietílico (2,4 ml). Se disuelve *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (1 g, 6,8 mmol) en una mezcla de éter dietílico (13 ml) y éter monoetílico de dietilenglicol (4 ml). Se coloca esta solución en un embudo de adición con uniones de vidrio suaves y se ajusta al aparato mini-Diazald. Se calienta la solución de hidróxido potásico en un baño de agua mantenido a 70 °C, asegurándose de que el matraz colector y un burbujeador lleno con éter dietílico en la salida del aparato están ambos enfriados en un baño de hielo seco/*iso*-propanol. Se deja que la solución de *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina sea añadida a una velocidad igual a la de la destilación resultante. Una vez completada la destilación, se añade más éter dietílico gota a gota a través de un embudo de adición hasta que el condensado del colector frío es incoloro. Se almacena la solución resultante en un baño de hielo seco/*iso*-propanol hasta que es necesario. Se suspende acetato de paladio (17,2 mg; 76,5 µmol) en éter dietílico (10 ml). Se decanta y se filtra la solución marrón pálido resultante y se añade cuidadosamente a una mezcla de la solución en diazometano de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*terc*-butilo (330 mg, 765,5 µmol) y éter dietílico (10 ml) a la que se había dejado alcanzar la temperatura ambiente. Una vez ha cesado la generación de gas, se filtra la suspensión resultante y se concentra a presión reducida proporcionando 260 mg de una mezcla de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*terc*-butilo sin reaccionar y compuesto del título.

Se prepara una solución exenta de etanol de diazometano en éter dietílico a partir de una solución de hidróxido de potasio (2,5 g, 44,6 mmol) en agua (4 ml), éter monoetílico de dietilenglicol (14 ml) y éter dietílico (8 ml) y *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (4 g, 27,2 mmol) en una mezcla de éter dietílico (30 ml) y éter monoetílico de dietilenglicol (15 ml). Se toma la solución resultante de diazometano y se añade la misma en varias porciones durante 30 minutos a una suspensión de acetato de paladio (20 mg, 89,1 µmol) en una solución de la mezcla preparada anteriormente del (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*terc*-butilo sin reaccionar y de compuesto del título (260 mg) en éter dietílico (3 ml). Una vez ha cesado la generación de gas, se deja reposar durante la noche, luego se filtra a través de una frita de separación de fases y se concentra a presión reducida proporcionando un aceite oscuro. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (0:100 hasta 75:25) proporcionando 185 mg de una mezcla de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*terc*-butilo sin reaccionar y compuesto del título.

Se prepara una solución exenta en etanol de diazometano en éter dietílico a partir de una solución de hidróxido de potasio (3,2 g, 57 mmol) en agua (5 ml), éter monoetílico de dietilenglicol (4 ml) y éter dietílico (10 ml) y *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (5 g, 34 mmol) en una mezcla de éter dietílico (35 ml) y éter monoetílico de dietilenglicol (15 ml). Se toma la solución resultante de diazometano y se añade la misma en porciones durante 60 minutos a una suspensión de acetato de paladio (20 mg, 89,1 µmol) en una solución de la mezcla recién preparada de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*terc*-butilo sin reaccionar y compuesto del título (185 mg) en éter dietílico (2 ml). Una vez ha cesado la generación de gas, se deja reposar durante 30 minutos, se filtra y se concentra a presión reducida proporcionando un aceite amarillo. Se purifica por HPLC guiada por masas (TR = 6,4 minutos (UV), 6,37 minutos (EM); Columna de CL: Waters XBridge™ 30 mm x 100 mm 5 µm; agua con ácido fórmico al 0,1 %; gradiente: acetonitrilo al 28-62 % con ácido fórmico al 0,1 % en 1,35 minutos luego 62-95 % en 6,65 minutos, luego mantenida a 95 % durante 3,55 minutos. Temperatura de la columna: ambiente; caudal: 45 ml/minuto) proporcionando el compuesto del título como un aceite incoloro (55,3 mg, 130,6 µmol). EM (m/z): 446 (M+23).

Preparación 3

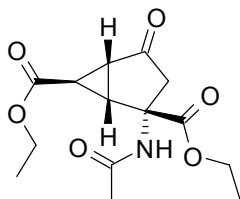
(1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-Amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo.



Se carga un matraz de tres bocas de 500 ml equipado con un condensador, entrada de nitrógeno y un termómetro con (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*terc*-butilo (15 g, 36,4 mmol) en etanol (365 ml). Se añade cloruro de tionilo (13,3 ml, 182,3 mmol) a una solución agitada a temperatura ambiente mediante jeringa (pequeña exotermia) y luego se calienta hasta reflujo. Después de 24 horas se enfría la reacción hasta temperatura ambiente y se concentra al vacío. Se disuelve el residuo en diclorometano (50 ml) y luego se concentra en un evaporador rotatorio (repetir 3 veces). Se reparte el residuo entre acetato de etilo (200 ml) e hidrógenocarbonato sódico saturado (150 ml). Se lava la fase orgánica con salmuera (150 ml), se seca sobre sulfato sódico, se filtra y luego se concentra hasta sequedad dando el compuesto del título como un aceite (8,24 g, 32,3 mmol). EM (m/z): 256 (M+1).

Preparación 4

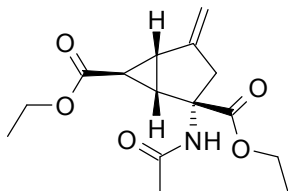
(1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-Acetamido-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo.



Se añade anhídrido del ácido acético (5 ml, 50,8 mmol) a una solución agitada de (1S,2S,5R,6R)-2-amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (7,2 g, 28,2 mmol) y trietilamina (7,9 ml, 56,4 mmol) en diclorometano seco (72 ml) a temperatura ambiente. Después de 2 horas, se inactiva con agua (100 ml) y se agita intensamente durante 20 minutos. Se separa la fase de diclorometano mediante una frita hidrófoba y se evapora hasta un aceite marrón claro (9,6 g). Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (70:30 hasta 90:10) dando el compuesto del título como un vidrio amarillo pálido que se espumó al secar (6,53 g, 22 mmol). EM (m/z): 298 (M+1), 320 (M+23), 617 (2M+23).

Preparación 5

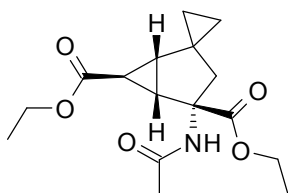
(1S,2S,5R,6S)-2-Acetamido-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo.



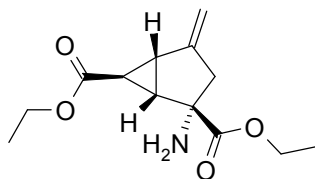
Se carga un matraz de fondo redondo de 250 ml secado al horno con bromuro de (metil)trifenilfosfonio (9,72 g, 26,7 mmol) y tetrahidrofurano seco (122 ml). Se enfría la suspensión hasta 0 a -5 °C y se trata con *bis*(trimetilsilil)amida de sodio 2M en tetrahidrofurano (13,3 ml, 26,7 mmol) gota a gota. Se agita la mezcla amarillo brillante resultante a 0 °C durante 20 minutos y luego se trata con una solución de (1S,2S,5R,6R)-2-acetamido-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (6,1 g, 20,5 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml). Se deja calentar la reacción lentamente hasta temperatura ambiente durante 3 horas. Después de agitar durante 20 horas a temperatura ambiente se inactiva con agua helada (200 ml) y se extrae con acetato de etilo (200 ml). Se lavan los extractos con agua (100 ml), salmuera (100 ml), se secan, se filtran y se evaporan hasta un aceite marrón oscuro. Se añade éter dietílico (70 ml) e *iso*-hexano (20 ml) y se siembra la solución con óxido de trifenilfosfina. Se deja reposar durante 2 horas, se decanta la solución, se añade sílice y se concentra al vacío. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (60:40 hasta 80:20) dando un aceite rosa (6,81 g) contaminado con óxido de trifenilfosfina. Se vuelve a purificar por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (60:40) dando el compuesto del título como un aceite amarillo viscoso (3,98 g, 13,5 mmol). EM (m/z): 296 (M+1), 318 (M+23), 613 (2M+23).

Preparación 6

(1S,2S,5R,6S)-2-Acetamidoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo



En atmósfera de nitrógeno, se añade una solución de ácido trifluoroacético (1,9 ml, 25 mmol) en diclorometano (12,5 ml) gota a gota muy lentamente a una solución agitada y enfriada (baño de hielo) de dietil cinc (1M en heptanos) (25 ml, 25 mmol) en diclorometano (12,5 ml). Después de 10 minutos, se añade una solución de diyodometano (2,01 ml, 25 mmol) en diclorometano (12,5 ml). Después de 10 minutos, se añade una solución de (1S,2S,5R,6S)-2-acetamido-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (2,46 g, 8,3 mmol) en diclorometano (12,5 ml). Después de 60 minutos se retira el baño de hielo y se deja la mezcla de reacción agitar durante la noche a temperatura ambiente. Se inactiva la reacción transparente mediante la adición gota a gota de la mezcla de reacción a ácido clorhídrico acuoso 0,2 M (200 ml) con agitación intensa. Después de 1 hora se separa la fase de diclorometano, se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra al vacío proporcionando el producto deseado contaminado con material de partida sin reaccionar (4,4 g). Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: ciclohexano (50:50 hasta 100:0) dando un aceite incoloro (3,1 g). Se purifica por SFC (TR = 2,48 minutos (UV, 200 nm); Columna HPLC: AD-H 30 mm x 250 mm 5 µm; gradiente de CO₂: alcohol *iso*-propílico al 5 % con dimetilamina al 0,2 % durante 0,5 minutos, luego 5 %-27 % en 2,2 minutos. Temperatura de la columna: 35 °C; presión: 100000 kPa; caudal: 210 ml/minuto) proporcionando (1S,2S,5R,6S)-2-acetamido-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo sin reaccionar. (580 mg, 2,0 mmol) y compuesto del título (1,82 g, 5,9 mmol). EM (m/z): 310 (M+1), 332 (M+23).

Preparación 7**(1S,2S,5R,6S)-2-Amino-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo.****Procedimiento 1:**

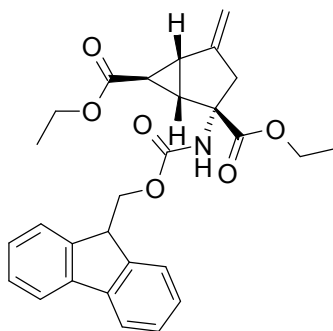
- 5 Se prepara una solución de aproximadamente cloruro de hidrógeno 1M en etanol mediante la adición gota a gota de cloruro de trimetilsililo (13,8 ml, 108 mmol) a etanol (110 ml). Se disuelve (1S,2S,5R,6S)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc-butilo* (7,4 g, 18,1 mmol) en esta solución ácida y se calienta hasta 60 °C durante 16 horas. Se evapora hasta un aceite amarillo viscoso, se vuelve a disolver en agua (50 ml) y se filtra la solución turbia para separar los restos de insolubles. Se neutraliza la solución
- 10 ácida acuosa con bicarbonato sódico (8,4 g, 0,1 mol) y se extrae con diclorometano (2 x 100 ml). Se secan las soluciones de diclorometano combinadas mediante una frita hidrófoba y se evapora hasta un líquido amarillo pálido (4,14 g). Se purifica por cromatografía sobre sílice unida a amino eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80 hasta 80:20) dando un líquido incoloro (3,6 g). Se vuelve a purificar por cromatografía sobre sílice unida a amino eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80) dando un líquido incoloro del producto del título (2,81 g, 61 %). EM (m/z): 254 (M+1).
- 15

Procedimiento 2:

- Se seca ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (6,97 g, 36,6 mmol) al vacío a 50 °C durante 3 días. Se añade a una solución agitada de (1S,2S,5R,6S)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*terc*-butilo (5,0 g, 12,2 mmol) en etanol (35,5 ml) y se calienta hasta 60 °C durante 3 días. Se elimina el
- 20 disolvente a presión reducida dando un residuo. Se recoge el residuo en agua (100 ml), se basicifica usando bicarbonato sódico y se extrae con diclorometano (3 x 100 ml). Se secan los extractos sobre sulfato sódico, se filtran y luego se concentran a presión reducida dando un residuo naranja del compuesto del título (1,52 g, 51 %). EM (m/z): 254 (M+1).

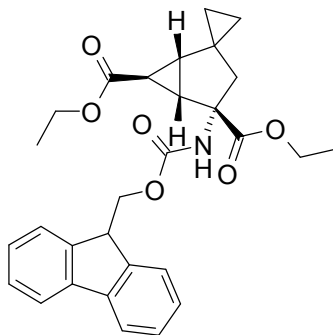
Preparación 8

- 25 **(1S,2S,5R,6S)-2-(9H-Fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo**



- Se añade cloroformiato de 9-fluorenilmetilo sólido (3,15 g, 12,2 mmol) en varias porciones durante 5 minutos a una solución agitada de (1S,2S,5R,6S)-2-amino-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (2,8 g, 11,1 mmol) y bicarbonato sódico (2,04 g, 24,3 mmol) en tetrahidrofurano (28 ml) y agua (8,4 ml) enfriada hasta 0-5 °C. Después de 1 hora, se añade agua (10 ml) y se extrae con acetato de etilo (50 ml). Se lava el extracto con solución de salmuera (20 ml), se seca, se filtra y se evapora hasta un aceite amarillo pálido (6,5 g). Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (10:90 hasta 20:80) dando un aceite viscoso incoloro (4,58 g). Se vuelve a purificar por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80) dando una espuma semisólida del compuesto del título (4,22 g, 80 %). EM (m/z): 476 (M+1).
- 30
- 35

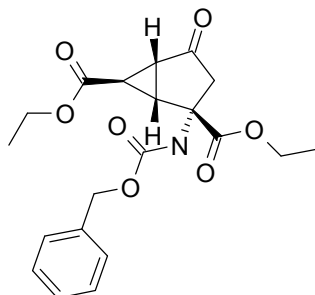
Preparación 9**(1S,2S,5R,6S)-2-(9H-Fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo**



Se añade una solución de ácido trifluoracético (2,66 g, 23,3 mmol) en diclorometano (11,7 ml) gota a gota durante 5 minutos a una solución agitada de dietil cinc 1M en heptanos (23,3 ml, 23,3 mmol) en diclorometano (11,7 ml) enfriado hasta 0-5 °C en atmósfera de nitrógeno (reacción exotérmica). Después de 10 minutos, se añade una solución de diiodometano (6,25 g, 23,3 mmol) en diclorometano (11,7 ml). Después de 10 minutos, se añade una solución de (1S,2S,5R,6S)-2-(9H-fluoren-9-ylmetoxycarbonylamino)-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (3,70 g, 7,8 mmol) en diclorometano (11,7 ml). Después de 2 horas a 0 °C, se deja calentar hasta temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. Se inactiva la mezcla de reacción con ácido clorhídrico 0,5M frío (50 ml) y diclorometano (20 ml) y se agita intensamente. Se separa la fase de diclorometano mediante una frita hidrófoba y luego se evapora hasta un aceite amarillo pálido. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (10:90 hasta 20:80) dando un aceite incoloro (3,49 g). Se vuelve a purificar por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80) tomando las fracciones de corte centrales dando una espuma incolora del compuesto del título (2,12 g, 56 %). EM (m/z): 490 (M+1). Repitiendo la cromatografía se obtiene un segundo lote de producto de las fracciones menos puras (363 mg, 9 % adicional).

Preparación 10

(1S,2S,5R,6R)-2-Benciloxycarbonylamino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo



Procedimiento 1:

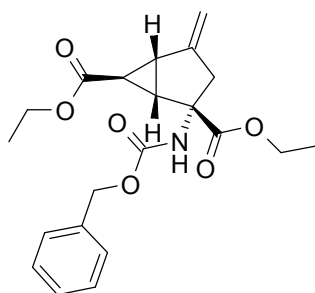
Se añade dicarbonato de dibencilo (18,6 ml, 76,1 mmol) a una solución de (1S,2S,5R,6R)-2-amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (16,2 g, 63,5 mmol) en diclorometano (500 ml) y luego se añade gota a gota trietilamina (10,6 ml, 76,1 mmol). Se agita la mezcla de reacción durante 30 minutos antes de lavar con ácido clorhídrico 1N (200 ml). Se lava la fase de diclorometano con salmuera, se separa y se concentra al vacío. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (0:100 hasta 75:25) proporcionando el compuesto del título (11,6 g, 47 %). EM (m/z): 388 (M+1), 410 (M+23).

Procedimiento 2:

Se añade a un matraz de fondo redondo clorhidrato de (1S,2S,5R,6R)-2-amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (226,86 g, 777,65 mmol), agua (1,13 l) y tetrahidrofurano (1,13 l). Se añade lentamente bicarbonato sódico (143,72 g, 1,71 mol) en 5 porciones (observando la generación de CO₂ y la temperatura interna desde 31 °C hasta 25 °C). Se añade entonces una solución de cloroformiato de bencilo (120,6 ml, 855,42 mmol) en tetrahidrofurano (226,9 ml) y se mantiene la temperatura interna por debajo de 28 °C (10 minutos) agitando la reacción a 25 °C durante 1 hora. Se vierte la mezcla en metil-*t*-butil éter (1,25 l). Se separan las fases, se extrae la acuosa con acetato de etilo (750 ml) y se descarta la fase acuosa. Se lava la mezcla con salmuera, se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra hasta sequedad dando el compuesto del título como un aceite incoloro (302,82 g, 777,65 mmol). EM (m/z): 388 (M+1).

Preparación 11

(1S,2S,5R,6S)-2-Benciloxycarbonylamino-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo

**Procedimiento 1:**

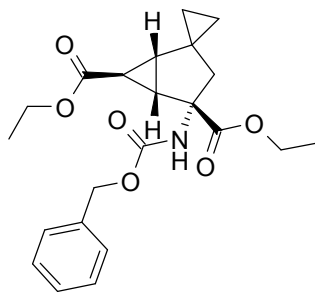
Se carga un matraz de fondo redondo de 500 ml secado al horno con bromuro de (metil)trifenilfosfonio (15,4 g, 43,1 mmol) y tetrahidrofurano seco (112 ml). Se enfría la suspensión hasta 0 a -5 °C y se trata con bis(trimetilsilil)amida de sodio 2M en tetrahidrofurano (23 ml, 46 mmol) gota a gota. Se agita la suspensión amarillo brillante resultante a 0 °C durante 30 minutos y luego se trata con una solución de (1S,2S,5R,6R)-2-benciloxicarbonilamino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (11,2 g, 28,8 mmol) en tetrahidrofurano (22,4 ml). Se deja calentar la reacción lentamente hasta temperatura ambiente. Después de 4 horas, se inactiva con hielo (120 g), salmuera (120 ml) y se extrae con acetato de etilo (250 ml). Se lavan los extractos con salmuera (2 x 100 ml), se secan, se filtran y se evaporan hasta un aceite rojo. Se vuelven a disolver en éter dietílico (100 ml) y se añade *iso*-hexano (80 ml) lentamente en porciones para precipitar óxido de trifenilfosfina como un semisólido rojo (5,2 g). Se trata la solución con sílice seca (~50 g) y se concentra hasta sequedad. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80) dando el compuesto del título como un aceite viscoso incoloro (7,37 g, 66 %). EM (m/z): 388 (M+1), 410 (M+23).

Procedimiento 2:

Se añade *tert*-butóxido potásico (104,72 g, 933,18 mmol) a una suspensión de bromuro de (metil)trifenilfosfonio (340,16 g, 933,18 mmol) en tetrahidrofurano (1,82 l) a temperatura ambiente (sin cambio en la temperatura interna). Luego se añade una solución de (1S,2S,5R,6R)-2-benciloxicarbonilamino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (302,82 g, 777,65 mmol) en tetrahidrofurano (1,82 l) manteniendo la temperatura a 24 °C. Se agita la mezcla a 50 °C durante 3 horas. Se diluye la reacción con acetato de etilo (1,5 l), se lava con agua (2 x 3 l) y salmuera. Se seca la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra proporcionando un aceite marrón oscuro. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: hexanos (9:1) dando el compuesto del título como un aceite incoloro (183,35 g, 473,25 mmol). EM (m/z): 388 (M+1), 410 (M+23).

Preparación 12

(1S,2S,5R,6S)-2-Benciloxicarbonilaminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo

**Procedimiento 1:**

Se añade una solución de dietil cinc 1M en heptanos (64,1 ml, 64,1 mmol) en diclorometano (14,6 ml) gota a gota y lentamente durante 10 minutos a una solución agitada de ácido trifluoracético (4,27 ml, 56,5 mmol) en diclorometano (73 ml) enfriado hasta 0-5 °C en atmósfera de nitrógeno. Después de 10 minutos, se añade una solución de diyodometano (4,6 ml, 56,5 mmol) en diclorometano (14,6 ml). Después de 10 minutos, se añade una solución de (1S,2S,5R,6S)-2-benciloxicarbonilamino-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (7,3 g, 18,8 mmol) en diclorometano (14,6 ml). Después de 1 hora, se retira el baño de hielo y se deja que la solución turbia se agite durante 20 horas a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se inactiva la mezcla de reacción con ácido clorhídrico acuoso 0,5M en hielo (160 ml, 80 mmol) y diclorometano (200 ml) y se agita la mezcla intensamente. Se separa la fase de diclorometano y luego se seca la fase de diclorometano filtrando a través de dos fritas hidrófobas. Se evapora hasta un aceite amarillo pálido que vira a marrón durante la noche. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80) dando el compuesto del título como una mezcla con (1S,2S,5R,6S)-2-benciloxicarbonilamino-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo sin reaccionar como un aceite incoloro (5,1 g).

Se añade una solución de ácido trifluoracético (2,93 ml, 38,7 mmol) en diclorometano (10 ml) gota a gota lentamente

durante 10 minutos a una solución agitada de dietil cinc 1M en heptanos (38,7 ml, 38,7 mmol) en diclorometano (50 ml) enfriado hasta 0-5 °C en atmósfera de nitrógeno. Después de 10 minutos, se añade una solución de diyodometano (3,12 ml, 38,7 mmol) en diclorometano (10 ml) a la mezcla de reacción. Después de 10 minutos, se
 5 añade una solución de la mezcla de olefina y (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-benciloxicarbonilaminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (5 g, 12,9 mmol) en diclorometano (10 ml). Después de 1 hora se retira el baño de hielo y se deja agitar la solución turbia durante 16 horas a temperatura ambiente. Después de 20 horas, se inactiva la mezcla de reacción con cloruro de hidrógeno 0,5M en hielo (140 ml, 70 mmol) y diclorometano (160 ml) y se agita la mezcla intensamente. Se lava la fase de diclorometano con ácido clorhídrico acuoso 0,5M (100 ml), se
 10 seca sobre sulfato sódico y luego se filtra a través de dos fritas hidrófobas. Se evapora hasta un aceite amarillo pálido (5,89 g). Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (15:85 hasta 25:75) dando el compuesto del título como un aceite incoloro (4,28 g) contaminado con una pequeña cantidad de reaccionante.

Se vuelve a disolver en acetona (40 ml), agua (20 ml), bicarbonato sódico (0,54 g, 6,45 mmol) y sulfato de magnesio (0,78 g, 6,45 mmol). Se enfría hasta 0 °C y se añade permanganato potásico (0,2 g, 1,29 mmol) dando una mezcla
 15 púrpura brillante. Después de 3 horas a temperatura ambiente, se inactiva con tiosulfato sódico sólido pentahidratado (0,32 g, 1,29 mmol) y se filtra la suspensión a través de una almohadilla de tierra de diatomeas, lavando concienzudamente con acetona. Se evapora hasta un pequeño volumen, se diluye con agua (20 ml) y se extrae con acetato de etilo (60 ml). Se lavan los extractos con salmuera, se secan, se filtran y se evaporan hasta un
 20 aceite. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (15:85 hasta 25:75) dando el compuesto del título como un aceite incoloro (3,62 g, 70 %). EM (m/z): 402 (M+1).

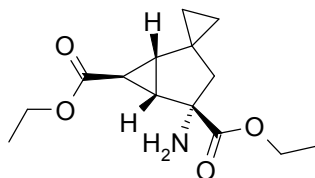
Procedimiento 2:

Se añade una solución de dietil cinc 1M en heptanos (1,6 l, 1,6 mol) mediante una cánula a diclorometano (870,9 ml) a 0 °C (temperatura del baño -5 °C), luego se añade lentamente una solución de ácido trifluoracético (121,02 ml, 1,6
 25 mol) en diclorometano (870,9 ml) manteniendo la temperatura por debajo de 3 °C. Después de 1 hora de adición se agita la mezcla durante 5 minutos y luego se añade diyodometano (130,3 ml, 1,6 mol) en una porción y se agita durante 15 minutos. Se añade una solución de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-benciloxicarbonilamino-4-metilenobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (183,35 g, 449,58 mmol) en diclorometano (348,4 ml) durante 10 minutos y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se enfría hasta 0 °C, se inactiva con ácido
 30 clorhídrico 0,5M (1,5 l) y se agita la mezcla intensamente. Se separa la fase orgánica, se lava con salmuera y se concentra hasta sequedad. Se disuelve en agua (733,4 ml) y acetona (733,4 ml), se enfría hasta 0 °C y luego se añade sulfato de magnesio (81,17 g, 674,37 mmol), bicarbonato sódico (56,65 g, 674,37 mmol) seguido por permanganato potásico (28,42 g, 179,83 mmol). Se agita la mezcla a temperatura ambiente. Después de 30 minutos se añade tiosulfato sódico pentahidratado (197,10 g, 311,03 mmol) seguido por tierra de diatomeas (100 g). Se agita durante 30 minutos y se filtra a través de una almohadilla de tierra de diatomeas. Se lava la almohadilla con metil-*t*-butil éter y se extrae la fase acuosa con metil-*t*-butil éter. Se seca la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se
 35 filtra y se concentra al vacío. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con hexanos: metil-*t*-butil éter (10:90 hasta 50:50) proporcionando el compuesto del título como un aceite incoloro (92,67 g, 51 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 0,39-0,52 (m, 1H), 0,55-0,78 (m, 3H), 1,25 (t ancho, *J* = 7,1 Hz, 6H), 1,58 (dd ancho, *J* = 2,9 y 6,3 Hz, 1H), 1,64-1,73 (m, 1H), 1,95 (t ancho, *J* = 2,9 Hz, 1H), 2,03-2,17 (m, 1H), 2,52 (dd, *J* = 2,7 y 6,3 Hz, 1H), 4,09 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H), 4,16-4,32 (m, 2H), 5,08 (s ancho, 2H), 5,44 (s ancho, 1H), 7,28-7,41 (m, 5H).

También se obtiene (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(benciloxicarbonil(metil)amino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo como subproducto (22,67 g, 5,46 mmol). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 0,37-0,52 (m, 1H), 0,54-0,80 (m, 3H), 1,26 (t ancho, *J* = 7,1 Hz, 6H), 1,55-1,68 (m, 1H), 1,64-1,73 (m, 1H), 1,70-1,80 (m, 1H), 1,97 (t ancho, *J* = 3,1 Hz, 1H), 2,30 (dd, *J* = 3,1 y 6,3 Hz, 1H), 3,16 (s, 3H), 3,99-4,29 (m, 4H), 5,09 (s ancho, 2H), 7,38-7,62 (m, 5H).

Preparación 13

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-Aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo



Procedimiento 1:

Se añade piperidina (3,16 g, 37,2 mmol) a una solución agitada de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (2,10 g, 4,29 mmol) en diclorometano (10,5 ml) a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se evapora hasta un sólido amarillo. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (30:70 hasta 80:20) para eluir primero 1-(9*H*-fluoren-9-ilmetil)-piperidina y para eluir luego un líquido amarillo pálido del compuesto del título (1,07 g, 93 %). EM (m/z): 268 (M+1).

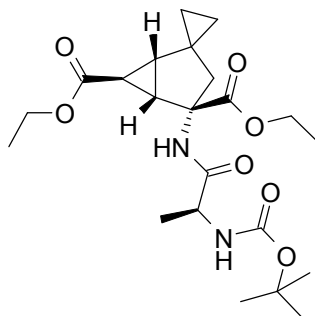
Procedimiento 2:

Se disuelve (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-benciloxicarbonilaminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (3,62 g, 9 mmol) en etanol (54 ml) y se añade solución hasta paladio al 10 % sobre carbono (tipo Degussa E101 NE/W, 0,18 g, 0,17 mmol). Se hidrogena en un aparato de Parr durante 4 horas a 345 kPa. Se filtra la reacción

a través de una almohadilla de tierra de diatomeas para retirar el catalizador, se lava con etanol y se evapora hasta un aceite incoloro como el compuesto del título (2,23 g, 93 %). EM (m/z): 268 (M+1).

Preparación 14

- 5 **(1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo**



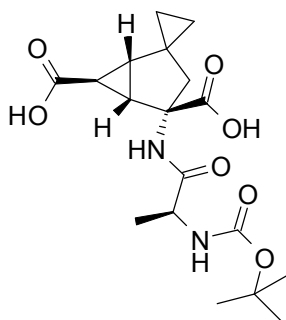
- 10 Se combina (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (1,92 g, 7,17 mmol), ácido (2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoico (1,92 g, 10 mmol), 4-dimetilaminopiridina (9 mg, 717 μmol) y 1-hidroxibenzotriazol (1,36 g, 10 mmol) en diclorometano (48 ml). Se añade trietilamina (1,5 ml, 10,8 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,92 g, 10 mmol) y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. Se diluye la reacción con acetato de etilo (200 ml), agua (50 ml) y salmuera (50 ml). Se agita intensamente y luego se separa la fase de acetato de etilo, se lava con ácido clorhídrico 0,2M (50 ml), agua (50 ml), hidrógenocarbonato sódico saturado (50 ml) y salmuera (50 ml). Se seca, se filtra y se concentra la solución dando un aceite amarillo (3,48 g). Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (15:85 hasta 25:75) luego (25:75 hasta 40:60) dando el material como un aceite. Se vuelve a disolver en diclorometano, se concentra y se seca al vacío dando el compuesto del título como un material espumado blanco (3,05 g, 6,95 mmol). EM (m/z): 461 (M+23).

Los siguientes compuestos se preparan básicamente por el procedimiento de la Preparación 14.

N.º de prep.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
15	(1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-(<i>tert</i> -Butoxicarbonilamino)-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo		EM (m/z): 499 (M+1), 521 (M+23)
16	(1S,2S,5R,6S)-2-[[2-(<i>tert</i> -Butoxicarbonilamino)acetil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo		EM (m/z): 447 (M+23).

- 20 **Preparación 17**

Ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico

**Procedimiento 1:**

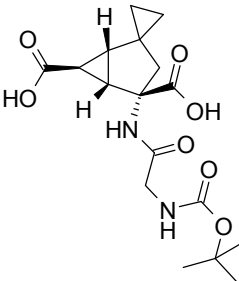
Se añade una solución de hidróxido de litio 2M en agua (27,8 ml, 55,6 mmol) a una solución agitada fría de (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoic acid]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexano-4,1'-cyclopropano]-2,6-dicarboxylic acid (3,05 g, 6,9 mmol) en tetrahydrofuran (36 ml) en atmósfera de nitrógeno. Se agita la solución bifásica a temperatura ambiente durante 20 horas. Se acidifica con ácido clorhídrico 2M (29 ml), hielo (~20 g) y se extrae con acetato de etilo (100 ml). Se lavan los extractos con salmuera (50 ml), se secan sobre sulfato sódico, se filtran y se evaporan hasta una espuma semisólida blanca. Se vuelve a disolver el material en acetato de etilo caliente (15 ml). Se filtra y se seca el material al vacío dando el compuesto del título como un sólido blanco (2,06 g, 5,4 mmol). EM (m/z): 405 (M+23).

Procedimiento 2:

Se disuelve (1S,2S,5R,6S)-2-benzyloxycarbonylaminoespiro[bicyclo[3.1.0]hexano-4,1'-cyclopropano]-2,6-dicarboxylic acid de dietilo (159 g, 396,05 mmol) en etanol (792,1 ml) y se añade paladio al 10 % sobre carbono (15,9 g, 14,94 mmol) seguido por una solución de ácido clorhídrico al 37,5 % p/p en agua (6,62 ml, 79,21 mmol). Se somete a hidrogenación en un aparato de Parr de 2 l a 413 kPa a temperatura ambiente. Después de 4 horas se filtra la mezcla a través de tierra de diatomeas y un filtro de microfibras de vidrio (Whatman) y se concentra al vacío. Se disuelve la materia prima en tetrahydrofuran (396 ml), se añade clorodimetoxitriazina (74,50 g, 415,86 mmol) y ácido (2S)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoic acid (79,88 g 415,86 mmol). Se enfría esta mezcla hasta 0 °C y se añade *N*-metilmorfolina (131,06 ml, 1,19 mol). Se agita la mezcla a temperatura ambiente. Después de 5 horas se filtra la materia prima a través de tierra de diatomeas y se lava la torta con tetrahydrofuran (200 ml). Se elimina el disolvente parcialmente al vacío y se enfría la solución naranja resultante hasta 0 °C. Se añade hidróxido sódico 2M en agua (792,1 ml, 1,58 mol) gota a gota. Se agita la mezcla durante la noche, dejando que la reacción llegue hasta temperatura ambiente. Se añade diclorometano (1 l) y se separan las fases. Se lava la fase orgánica con más agua (300 ml). Se acidifican las fases acuosas combinadas hasta pH = 2-3 con hidrógenosulfato potásico 1N y luego se extraen con acetato de etilo. Se seca la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtra y se evapora al vacío. Se disuelve la materia prima en tetrahydrofuran (600 ml) y se calienta hasta reflujo. Se añade heptano (2,1 l) y se enfría la solución. Se filtra el sólido y se seca al vacío dando el compuesto del título como un sólido blanco (149 g, 98 %). EM (m/z): 405 (M+23).

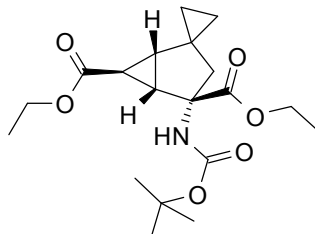
Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento 1 de la Preparación 17.

N.º de prep	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
18	Ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)-4-metilsulfanyl-butanoic acid]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexano-4,1'-cyclopropano]-2,6-dicarboxylic acid		EM (m/z): débil 465 (M+23)

N.º de prep	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
19	Ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)acetil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico		EM (m/z): 391 (M+23),

Preparación 20

(1S,2S,5R,6S)-2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo.

**5 Procedimiento 1:**

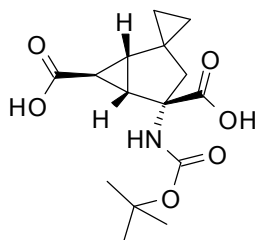
A una solución de (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (0,47 g, 722,38 µmol) en diclorometano (5 ml) se añade *di*iso-propil-etilamina soportada en polímero (1,02 g, 3,61 mmol) seguida por dicarbonato de *di*-*t*-butilo (0,41 g, 1,88 mmol) en diclorometano (6,00 ml) y se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añade dicarbonato de *di*-*t*-butilo adicional (0,32 g, 1,36 mmol) agitando durante otras 2 horas. Se diluye con etanol (20 ml) y se purifica por un cartucho de resina de intercambio iónico SCX-2 (10 g) pretratado con 2 volúmenes de columna de etanol. Después de cargar el cartucho se lava con 4 volúmenes de columna de etanol antes de concentrar el eluyente al vacío proporcionando el producto en bruto (808 mg). Se purifica la materia prima por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: ciclohexano (0:100 hasta 40:60) proporcionando el material deseado (100 mg). Se evacúa el cartucho con 2 volúmenes de columna de amoníaco 3M en metanol proporcionando un sólido amarillo (430 mg) de (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo en bruto sin reaccionar. Se añade dicarbonato de *di*-*t*-butilo (0,32 g, 1,44 mmol) al (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo recuperado en tetrahidrofurano (20 ml), se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se añade luego trietilamina (201,37 µl, 1,44 mmol) y dicarbonato de *di*-*t*-butilo adicional (0,32 g, 1,44 mmol) y se mantiene la agitación durante 72 horas. Se añade trietilamina en exceso (201,37 µl, 1,44 mmol), dicarbonato de *di*-*t*-butilo (0,32 g, 1,44 mmol) y *N,N*-dimetil-4-aminopiridina catalítica (40,93 µmol) y se agita durante la noche. Se diluye con etanol (30 ml) y se purifica la solución por un cartucho de resina de intercambio iónico SCX-2 (10 g) pretratado con 2 volúmenes de columna de etanol. Se lava con 4 volúmenes de columna de etanol y se concentra la solución al vacío proporcionando 757 mg del producto deseado en bruto. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: ciclohexano (0:100 hasta 40:60) proporcionando una segunda fracción del producto del título deseado (24 mg). Se combinan ambas fracciones proporcionando el compuesto del título (337,47 µmol, 47 %). EM (m/z): 390 (M+23), 757 (2M+23).

Procedimiento 2:

Se añade dicarbonato de *di*-*t*-butilo (0,88 g, 4,01 mmol) a una solución de (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (1,4 g, 5,24 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml) y se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche en atmósfera de nitrógeno. Se filtra a través de una fritada hidrófoba, se lava el gel incoloro, con acetato de etilo. Se concentran las fases orgánicas combinadas al vacío dando un aceite incoloro. Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (0:100 hasta 30:70) proporcionando 1,82 g de aceite. Se seca de nuevo en alto vacío proporcionando el compuesto del título (1,79 g, 93 %). EM (m/z): 390 (M+23), 757 (2M+23).

Preparación 21

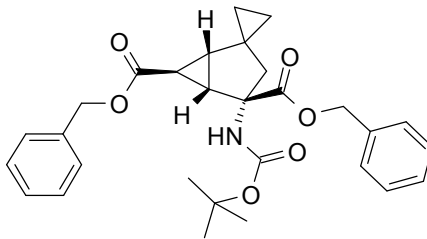
Ácido (1S,2S,5R,6S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico



Se añade (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)espiro[biciclo [3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (1,79 g, 4,87 mmol) en tetrahidrofurano (29,2 ml) a una solución recién preparada de hidróxido de litio monohidratado (1,64 g, 38,97 mmol) en agua (19,5 ml) y se agita durante la noche a 60 °C. Se diluye con agua (30 ml), se extrae con acetato de etilo (2 x 50 ml). Se separan las fases acuosa y orgánica. Se lava la fase orgánica con ácido clorhídrico 2M. Se lava la fase acuosa con ácido clorhídrico 2M (25 ml) luego se extrae con acetato de etilo (2 x 50 ml). Se combinan las fases orgánicas y se lavan con salmuera (15 ml). Se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran y se concentran hasta sequedad. Se vuelven a disolver en diclorometano y se concentran hasta sequedad dando el compuesto del título (1,49 g, 98 %). EM (m/z): 334 (M+23).

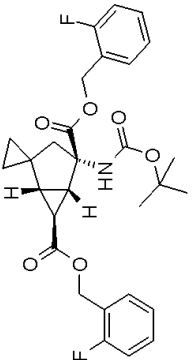
Preparación 22

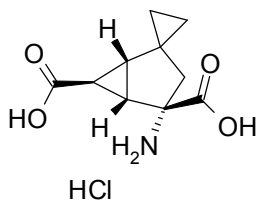
(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo



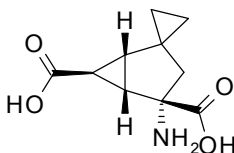
Se añade carbonato de cesio (0,24 g, 730,7 μ mol) y bromuro de bencilo (87,16 μ l, 730,7 μ mol) a una solución de ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico (0,09 g, 292,29 μ mol) en *N,N*-dimetilformamida (2 ml). Se agita a temperatura ambiente durante 1,5 horas en atmósfera de nitrógeno. Se inactiva con agua y se extrae con acetato de etilo. Se separan las fases y se filtran los productos orgánicos a través de una frita hidrófoba antes de concentrar hasta sequedad proporcionando el producto en bruto (134 mg). Se purifica por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (1:99 hasta 25:75) dando un aceite transparente. Se purifica de nuevo por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (1:99 10:90) proporcionando el producto del título (105 mg, 68 %) como un aceite transparente. EM (m/z): 514 (M+23).

El siguiente compuesto se prepara esencialmente por el procedimiento de la Preparación 22.

N.º de prep.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
23	(1S,2S,5R,6S)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-espiro[piciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo]		EM (m/z): 550 (M+23)

Ejemplo 1**Clorhidrato de ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico**

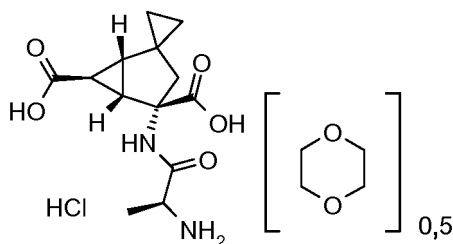
Se carga un ReactiVial de 5 ml con (1S,2S,5R,6S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (55 mg, 129,8 μ mol). A este se añade una solución acuosa de ácido clorhídrico 5N (3 ml; 20,8 mmol) y 1,4-dioxano (1 ml). Se agita la mezcla a 90 °C durante una hora. Se sella el ReactiVial y se continúa agitando a 90 °C durante 3 horas. Se enfría hasta temperatura ambiente y se deja en reposo durante 3 días. Se concentra a presión reducida hasta un sólido oscuro. Se prepara un cartucho Oasis® HLB Waters (1 g) lavando con 2 volúmenes de columna de metanol, seguido por 6 volúmenes de columna de agua. Se disuelve el sólido oscuro en agua y se carga en el cartucho. Se lava el cartucho con agua (2 volúmenes de columna) y se recoge el eluyente. Se liofiliza la solución proporcionando el compuesto del título (16,1 mg, 65 μ mol). EM (m/z): 212 (M+1). RMN de ^1H (D_2O) δ 0,45 (m, 1H), 0,53 (m, 1H), 0,64 (m, 1H), 0,74 (m, 1H), 1,72-1,78 (m, 2H) 1,86 (d, J = 14,2 Hz, 1H), 2,07 (m, 1H), 2,37 (m, 1H).

Ejemplo 2**Ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico**

Se añade hidróxido sódico 2M (11,5 ml, 23,1 mmol) con (1S,2S,5R,6S)-2-acetamidoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (1,19 g, 3,8 mmol). Tras la adición se calienta la mezcla de reacción hasta reflujo en una capa de nitrógeno. Después de 21 horas se añade exceso de hidróxido sódico 2M (5,8 ml, 11,5 mmol) y se vuelve a calentar durante 120 horas. Se purifica por cromatografía de intercambio catiónico (Dowex™ 50X8-100) como sigue. Se filtran cualesquiera partículas insolubles y se aclaran con agua de calidad HPLC. Se concentra la solución a la mitad. Se carga la solución sobre la resina, dejando fluir 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 caído hasta la superficie de la resina, se aclara la resina con agua de calidad HPLC (~ 1 a 2 volúmenes de columna) y se repite 3 veces. Se monitoriza el pH del efluente y se continúa aclarando con agua de calidad HPLC hasta la completa aplicación (se retorna el pH de nuevo hasta pH = 7). Una vez que se observa que se ha completado el ciclo de pH y el efluente ha vuelto a pH = 7, se lava la columna con al menos un volumen de columna cada uno de agua de calidad HPLC, agua de calidad HPLC: tetrahidrofurano (1:1), luego agua de calidad HPLC. Se desplaza el producto desde la resina con piridina al 10 %: agua de calidad HPLC y elución continua con piridina al 10 %: agua de calidad HPLC hasta que no se detectó producto adicional por TLC. Se combinan las fracciones que contienen el material deseado, se concentran hasta sequedad dando un sólido blanco. Se liofilizan proporcionando el compuesto del título (795 mg, 3,8 mmol). EM (m/z): 212 (M+1). RMN de ^1H (D_2O + d_5 -piridina al 5 %) δ : 0,38 (m, 1H), 0,45 (m, 1H), 0,55 (m, 1H), 0,69 (m, 1H), 1,50 (dd, J = 2,9 Hz, 1H), 1,62 (d, J = 13,7 Hz, 1H), 1,78 (m, 2H), 2,11 (dd, J = 2,9 Hz, 1H).

Ejemplo 3

Ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico; 1,4-dioxano (1: 0,5); clorhidrato.

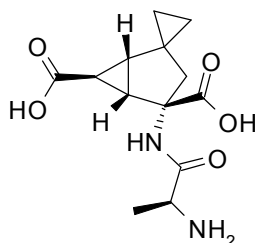


Se añade una solución de cloruro de hidrógeno 4M en 1,4-dioxano (1,57 ml, 6,3 mmol) a una suspensión agitada de ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico (0,16 g, 418,4 μ mol) en 1,4-dioxano (1,6 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Después de 16 horas se filtra un sólido blanco, se lava con 1,4-dioxano, se seca al vacío a 60 °C durante la noche proporcionando el compuesto del título (0,14 g): EM (m/z): 283 (M+1). RMN de ^1H (D_2O) δ 0,46 (m, 1H),

0,65 (m, 1H), 1,47 (d, $J = 7$ Hz, 3H), 1,70 (dd, $J = 2,7$ Hz, 1H), 1,81 (c, $J = 15$ Hz, 2H), 1,87 (t ancho, $J = 2,7$ y $2,9$ Hz, 1H), 2,65 (dd, $J = 2,7$ y $2,9$ Hz, 1H), 3,68 (s, 4H), 4,00 (c, $J = 7$ Hz, 1H), 4,70 (m, 2H).

Ejemplo 4

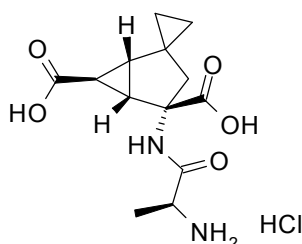
5 Ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico



10 Se añade ácido clorhídrico concentrado (36,94 ml, 430,11 mmol) a una solución de ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico (82,24 g, 215,06 mmol) en acetona (822,4 ml) y se agita la mezcla a 50 °C. Después de 1,5 horas se enfría la mezcla hasta 0 °C y se añade hidróxido sódico al 50 % en agua hasta pH = 3,6-3,8. Se agita el sólido obtenido durante 1 hora, se filtra y se lava con agua. Se seca al vacío durante 48 horas proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco (36 g, 127,53 mmol). EM (m/z): 283 (M+1).

Ejemplo 5

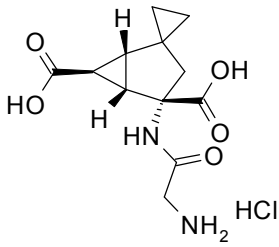
15 Clorhidrato del ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico



20 Se añade cloruro de hidrógeno 4M en 1,4-dioxano (20 ml, 80 mmol) a una suspensión agitada de ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico (2,06 g, 5,4 mmol) en 1,4-dioxano (21 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Se somete la mezcla de reacción a ultrasonidos varios minutos y luego se mantiene agitando 16 horas. Se filtra el sólido, se lava con 1,4-dioxano, se seca al vacío a 60 °C durante 6 horas dando 2,2 g de sólido blanco. Se vuelve a disolver el material en agua de calidad de HPLC (20 ml), se filtra para separar cualesquiera partículas insolubles y se liofiliza el filtrado proporcionando el compuesto del título (1,51 g, 4,75 mmol). EM (m/z): 283 (M+1). RMN de ^1H (D_2O) δ 0,46 (m, 1H), 0,65 (m, 1H), 1,46 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,69 (dd, $J = 2,9$ Hz, 1H), 1,81 (c, $J = 14,3$ Hz, 2H), 1,87 (t ancho, $J = 2,9$ Hz, 1H), 2,65 (dd, $J = 2,9$ Hz, 1H), 4,00 (c, $J = 7,02$ Hz, 1H), 4,70 (m, 2H).

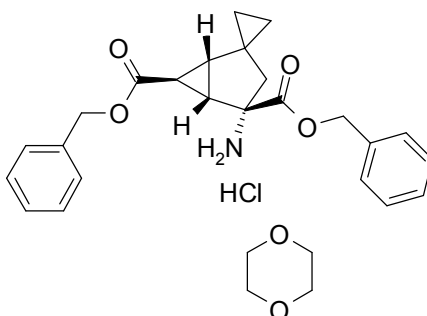
Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento del Ejemplo 4.

N.º de ej.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
6	Clorhidrato del ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico		EM (m/z): 343 (M+1)

N.º de ej.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
7	Clorhidrato del ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico		EM (m/z): 269 (M+1)

Ejemplo 8

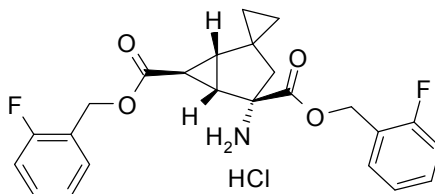
(1S,2S,5R,6S)-2-Aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo; 1,4-dioxano; clorhidrato



Se añade cloruro de hidrógeno 4M en 1,4-dioxano (493,30 µl, 1,97 mmol) a una suspensión agitada de (1S,2S,5R,6S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo (0,1 g, 0,2 mmol) en 1,4-dioxano (970 µl) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno y se agita durante 20 horas. Se añade exceso de solución 4M de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (493,30 µl, 1,97 mmol) y se calienta hasta 80 °C. Se concentra hasta sequedad, se tritura con acetonitrilo y se liofiliza la suspensión dando el compuesto del título como un sólido blanco (89,9 mg, 88 %) como un aducto (1:1) con 1,4-dioxano. EM (m/z): 392 (M+1).

Ejemplo 9

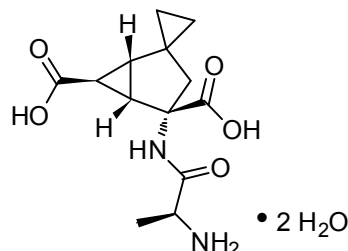
Clorhidrato de (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo]



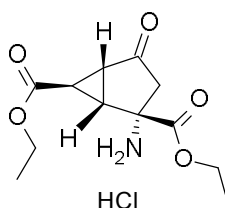
Se añade solución 4M de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (4,64 ml, 18,58 mmol) a una solución agitada de (1S,2S,5R,6S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo] (0,98 g, 1,86 mmol) en 1,4-dioxano (4,64 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno y se agita la solución durante 20 horas. Se concentra al vacío dando un aceite (0,93 g). Se disuelve en una mezcla de acetonitrilo (10 ml), agua (30 ml) y se liofiliza durante el fin de semana dando un sólido blanco (820 mg) como una mezcla del compuesto del título contaminado con ácido (1S,2S,5R,6S)-2-amino-2-[(2-fluorofenil)metoxicarbonil]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-6-carboxílico (~7-10 %). EM (m/z): 320 (M+H). Se disuelve el sólido blanco en acetonitrilo (8 ml) proporcionando una solución translúcida. Se deja en reposo durante 1 hora, antes de filtrar. El filtrado se concentra al vacío proporcionando una espuma pegajosa. Se vuelve a disolver en acetato de etilo, se lava con una solución saturada de hidrógenocarbonato sódico, se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra al vacío proporcionando 774 mg. Se vuelve a disolver en éter dietílico (11 ml), se añade cloruro de hidrógeno 1M en éter dietílico (1,86 ml, 1,86 mmol), se concentra al vacío proporcionando una espuma sólida blanca. Se seca adicionalmente durante la noche al vacío a 50 °C proporcionando el compuesto del título (0,74 g, 85 %). EM (m/z): 428 (M+1), 450 (M+23).

Ejemplo 10

Ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(2S)*-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico dihidratado

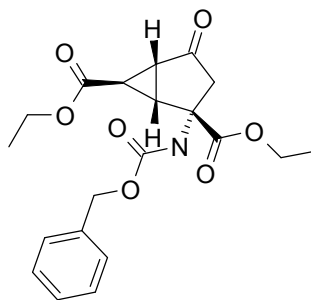


5 Etapa 1: clorhidrato de (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo



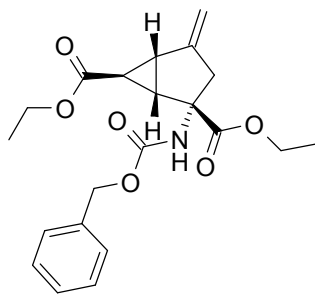
En una atmósfera de nitrógeno, se añade cloruro de acetilo (86,5 ml, 1,2 mol) a etanol absoluto (1,0 l, 17,2 mol) gota a gota manteniendo la temperatura interna de reacción por debajo de 30 °C. Se agita la mezcla resultante durante 15 minutos y se añade (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *di-t*-butilo (100 g, 0,24 mol) en una porción. Se calienta la mezcla resultante hasta reflujo durante 16-20 horas. Se concentra la mezcla de reacción hasta un aceite a presión reducida. Se disuelve el producto en bruto en cloruro de metileno (250 ml) y se concentra al vacío. Se repite el proceso de concentración con cloruro de metileno proporcionando una espuma blanca. Se añade acetato de etilo (150 ml) y se calienta la mezcla hasta 65 °C. Se añade metil *t*-butil éter (100 ml) y se agita la mezcla a 65 °C durante 15 minutos. Se añade metil *t*-butil éter (300 ml) durante 15 minutos, se agita a 65 °C durante 15 minutos, luego se interrumpe el calentamiento y se deja enfriar la suspensión hasta temperatura ambiente. Se filtra la mezcla y se lava la torta del filtro con metil *t*-butil éter (150 ml). Se transfiere la torta a un horno de vacío y se seca durante la noche a 25 °C proporcionando el producto en bruto (67,5 g). Se transfieren los sólidos a un matraz de fondo redondo, se diluye con acetato de etilo (170 ml) y se calienta la mezcla hasta 65 °C. Se agita la mezcla durante 1 hora, se añade tetrahidrofurano (68 ml) y etanol (3 ml). Se interrumpe la fuente de calor y se añade metil *t*-butil éter (272 ml) durante 20 minutos, dejando que la mezcla se enfríe hasta temperatura ambiente. Se filtra la suspensión, se lava la torta con metil *t*-butil éter/acetato de etilo 95/5 (2 x 75 ml) y se secan adicionalmente los sólidos en un horno de vacío durante la noche a 25 °C proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco (60,0 g, 98,0 %). EM (m/z): 256 (M+1).

Etapa 2: (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo



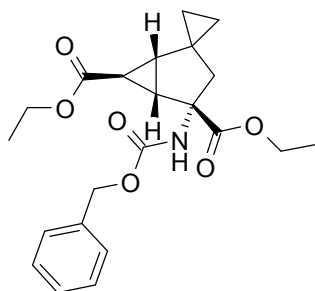
Se suspende clorhidrato de (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (55,0 g, 188,5 mmol) en tetrahidrofurano (220 ml), luego se añade agua (220 ml) y carbonato potásico (92,1 g, 659,9 mmol). Se agita la mezcla resultante durante 30 minutos. Se añade cloroformiato de bencilo (26,7 ml, 175,3 mmol) a la mezcla durante 45 minutos, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 25 °C. Se agita la mezcla de reacción durante 30 minutos, luego se diluye con acetato de etilo (550 ml) y agua (275 ml). Se separan las fases y se vuelve a extraer la fase acuosa con acetato de etilo (250 ml). Se combinan los productos orgánicos y se lavan secuencialmente con HCl acuoso (0,5N, 100 ml), NaHCO₃ saturado (100 ml) y salmuera (100 ml). Se seca la solución orgánica sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra al vacío proporcionando el compuesto del título como un aceite transparente (67,6 g, 92,1 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 1,24-1,26 (m, 6H), 2,36 (s ancho, 1H), 2,47(dd, 1H), 2,78 (dd, 1H), 2,90 (dd, 1H), 4,09-4,19 (m, 4H), 5,08 (s, 2H), 5,73 (s, 1H), 7,24-7,36 (m, 5H).

Etapa 3: (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-benciloxycarbonilamino-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo



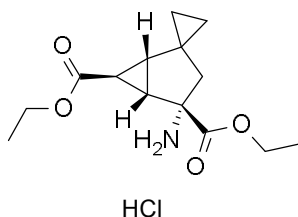
En una atmósfera de nitrógeno, se combinan bromuro de metil-trifenilfosfonio (67,4 g, 184,9 mmol) y tetrahidrofurano (300 ml) con agitación. Se añade una solución de *terc*-butoxido potásico (1M) en tetrahidrofurano, 184,9 ml, 184,9 mmol) a la mezcla de reacción durante 15 minutos y se agita la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Se disuelve (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-benciloxycarbonylamino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (12,3 kg, 31,6 mol) en tetrahidrofurano (120 ml) y se añade a la mezcla de reacción durante 1 hora, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 30 °C. Se agita la suspensión resultante durante la noche a temperatura ambiente, luego se diluye con acetato de etilo (600 ml) y se inactiva con agua (300 ml). Después de agitar la mezcla bifásica durante 30 minutos, se separan las fases y se lavan los productos orgánicos con agua (300 ml) seguida por HCl 0,25M (300 ml). Se secan los productos orgánicos sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran al vacío (45 °C) proporcionando el producto en bruto como un aceite oscuro (111,0 g). El material se purifica por cromatografía en lecho corto sobre gel de sílice (1 Kg Kieselgel-60, 4 l de EtOAc al 15 % en heptanos, luego 10 l de EtOAc al 30 % en heptanos) proporcionando el compuesto del título como un aceite transparente (37,3 g, 87,9 % de potencia, 54,9 %). EM (m/z): 388 (M+1).

Etapas 4: (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-benciloxycarbonylaminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo



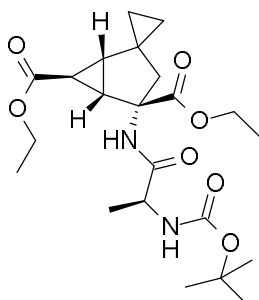
A un matraz de reacción con camisa conectado a una unidad de enfriamiento, se añade solución de dietil cinc (157,2 ml, 157,2 mmol, 1M en heptanos) en una atmósfera de nitrógeno. Se enfría la solución hasta -15 °C y se diluye con diclorometano seco frío (-15 °C) (157,2 ml). Se disuelve ácido trifluoracético (11,1 ml, 146,7 mmol) en dicloroetano (11,1 ml) y se añade al recipiente de reacción durante 50 minutos, manteniendo la temperatura interna por debajo de -10 °C. Se agita la suspensión resultante a -10 a -15 °C durante 30 minutos. Se disuelve diiodometano (12,7 ml, 42,1 g, 157,2 mmol) en dicloroetano (12,7 ml) y se añade a la mezcla de reacción durante 50 minutos, manteniendo la temperatura interna por debajo de -10 °C. Se agita la suspensión blanda y clara resultante a -10 a -15 °C durante 30 minutos. Se disuelve (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-benciloxycarbonylamino-4-metileno-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (20,3 g, 87,9 % de potencia, 46,0 mmol) en dicloroetano (30,4 ml) y se añade a la mezcla de reacción durante 10 minutos, manteniendo la temperatura interna por debajo de -10 °C. Se agita la solución amarillo pálido transparente a -10 °C durante 5 minutos y se monitorizan las exotermias latentes. Se cambia el punto de consigna en el enfriador a 0 °C y se agita la mezcla de reacción a esta temperatura durante 48 horas. Se inactiva la mezcla de reacción mediante adición de HCl 5N (62,9 ml, 314,4 mmol) durante 15 minutos, manteniendo la temperatura interna por debajo de 6 °C. Se agita la mezcla resultante a 0-5 °C durante 20 minutos, luego se transfiere a un embudo y se separan las fases. Se lava la fase orgánica con HCl 1N (2 x 50 ml) seguido por NaHCO₃ saturado/H₂O 1:1 (60 ml), Na₂CO₃ saturado/H₂O 1:1 (60 ml) y agua (50 ml). Se secan los productos orgánicos sobre Na₂SO₄ y se concentran al vacío proporcionando el compuesto del título como un aceite amarillo pálido (19,6 g, 60,3 % de potencia, rendimiento corregido 63,9 %). RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 0,37 (m, 2H), 0,52-0,55 (dm, 2H), 1,13-1,17 (m, 6H), 1,49-1,50 (m, 1H), 1,51-1,56 (m, 1H), 1,60-1,79 (m, 2H), 3,97-4,10 (m, 5H), 5,00 (s, 2H), 7,29-7,34 (m, 5H), 8,04 (s, 1H).

Etapas 5: clorhidrato de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo



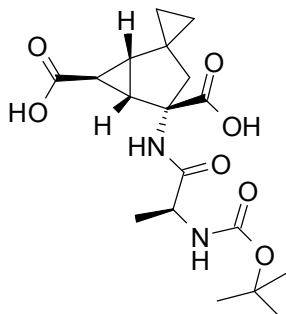
Se carga etanol absoluto (100 ml, 10 volúmenes), concentrado. HCl (2,1 ml, 1,0 N) y (1S,2S,5R,6S)-2-benciloxycarbonylaminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (9,7 g, 24,16 mmol) en un reactor HEL seguido por negro de Pd (3,9 g, 40 % en peso). Se purga el reactor tres veces con nitrógeno seguido por tres purgas con hidrógeno y presurización a $2,75 \times 10^5$ Pa (40 psi) de hidrógeno. Se deja agitar la reacción entre 20-30 °C durante al menos dos horas hasta que la finalización de la reacción se monitoriza por HPLC. Se filtra la suspensión resultante a través de una almohadilla de Hyflo Super Cel® y se lava la torta del filtro con etanol absoluto (2 x 30 ml, 3 volúmenes). El filtrado se transfiere a un reactor limpio y se desplaza el etanol con acetato de isopropilo hasta aproximadamente 5 volúmenes en base a rendimiento de producto *in-situ* a partir de una curva de calibración. Se enfría la suspensión resultante hasta 0-5 °C durante al menos 3 horas. Se filtra la suspensión resultante y se lava la torta del filtro con acetato de isopropilo frío (3 x 5 ml, 0,5 volúmenes). Se seca a presión reducida a 30 °C durante al menos 12 horas proporcionando el compuesto del título (4,66 g, 15,34 mmol, 63,5 %) RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 8,84 (s, 3H), 4,31-4,15 (m, 2H), 4,03 (c, J = 7,0, 2H), 2,42 (dd, J = 3,1, 2,6, 1H), 2,24 (dd, J = 6,2, 2,6, 1H), 1,94 (d, J = 14,1, 1H), 1,68 (d, J = 14,1, 1H), 1,63 (dd, J = 6,6, 3,1, 1H), 1,25 (t, J = 7,0, 3H), 1,17 (t, J = 7,0, 3H), 0,77-0,71 (m, 1H), 0,65-0,59 (m, 1H), 0,56-0,51 (m, 1H), 0,50-0,44 (m, 1H).

Etapas 6: (1S,2S,5R,6S)-2-[(2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo



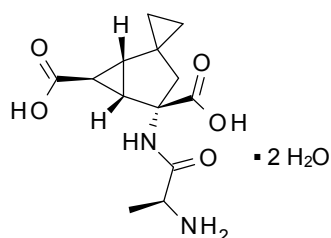
Se carga tetrahidrofurano (45 ml, 10 volúmenes) y ácido (2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoico (3,4 g, 1,2 equivalentes) a un reactor seguido por *N*-metilmorfolina (1,96 ml, 1,2 equivalentes) y 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (3,12 g, 1,2 equivalentes). Se agita la suspensión clara resultante entre 20-25 °C durante al menos 3 horas hasta que se completa la reacción HPLC. Se carga clorhidrato de (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (4,55 g, 14,81 mmol) en una porción entre 20-25 °C seguido por *N*-metilmorfolina (1,63 ml, 1,0 equivalentes) durante al menos 10 minutos manteniendo la temperatura entre 20-25 °C. Se agita la suspensión resultante entre 20-25 °C durante al menos 2 horas hasta que la reacción se completa por HPLC. Se filtran los sólidos resultantes y se lava la torta húmeda con tetrahidrofurano (2 x 10 ml, 2,2 volúmenes) proporcionando el compuesto del título suponiendo 100 % de rendimiento. Se usa la solución en tetrahidrofurano color ámbar pálido del compuesto del título sin posterior purificación suponiendo un rendimiento del 100 %. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 8,46 (s, 1H), 6,72 (d, J = 7,9, 1H), 4,08-3,92 (m, 5H), 2,42-2,37 (m, 1H), 1,81-1,64 (m, 3H), 1,47 (dd, J = 6,6, 3,1, 1H), 1,34 (s, 9H), 1,18-1,08 (m, 9H), 0,66-0,59 (m, 1H), 0,57-0,52 (m, 1H), 0,46-0,36 (m, 2H).

Etapas 7: ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico



Se carga NaOH 2 N (37 ml, 5,0 equivalentes) y (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (6,50 g, 14,81 mmol) en un reactor y se deja agitar durante al menos 12 horas entre 20-30 °C hasta que la reacción se completa por HPLC. La reacción se transfiere a un embudo de separación y se deja sedimentar durante al menos 10 minutos. Se separan las fases y se devuelve la fase acuosa inferior al reactor. Se añade acetato de etilo (90 ml, 13,8 volúmenes) a la mezcla y luego se añade NaHSO₄ 1N hasta que el pH llega a 2 a 2,5. Se separan las fases y se lava la fase orgánica con agua (45 ml, 6,9 volúmenes). Se elimina el agua en destilación atmosférica de la fase orgánica con acetato de etilo para eliminar el agua residual. Se enfría la suspensión resultante entre 20-30 °C durante al menos 2 horas y se deja granular a esta temperatura durante al menos 90 minutos. Se filtran los sólidos resultantes y se lava la torta húmeda con acetato de etilo (3 x 15 ml, 2,3 volúmenes). Se seca a presión reducida a 45 °C proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco (4,45 g, 11,64 mmol, 78,6 %) RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 50 °C): δ 12,01 (s, 2H), 8,22 (s, 1H), 6,49 (s ancho, 1H), 4,00 (s ancho, 1H), 2,43 (dd, J = 6,5, 2,8, 1H), 1,83 (d, J = 14,0, 1H), 1,68-1,62 (m, 2H), 1,42 (dd, J = 6,5, 2,8, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,15 (d, J = 7,1, 3H), 0,67-0,61 (m, 1H), 0,56-0,51 (m, 1H), 0,46-0,36 (m, 2H).

Etapla 8: ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico dihidratado



Se carga agua (32 ml, 8 volúmenes) y ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[[[(2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico (3,99 g, 10,4 mmol) a un reactor seguido por HCl concentrado (1,80 ml, 2,0 equivalentes) y luego se calienta la reacción hasta 45-55 °C hasta que se completa la reacción (se monitoriza por HPLC). La mezcla de reacción se enfría hasta 20-30 °C y se ajusta el pH a aproximadamente 3,6 con NaOH 5 N. Se añade etanol absoluto (15 ml, 3,75 volúmenes) durante al menos 30 minutos entre 20-30 °C a la suspensión resultante. Se deja granular la suspensión resultante entre 20-30 °C durante al menos 12 horas. Se enfría la mezcla entre -5-5 °C y se deja granular durante al menos 60 minutos. Se filtran los sólidos resultantes y se lava la torta con etanol absoluto al 30 % en agua (2 x 9 ml, 2,25 volúmenes). Los sólidos se secan a presión reducida a 35 °C durante al menos 12 horas y luego se dejan reposar los sólidos resultantes en la balanza hasta que no hay cambio de peso adicional durante al menos 2 horas proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco (2,71 g, 8,51 mmol, 81,6 %). RMN de ¹H (D₂O, 400 MHz): δ 3,90 (c, J = 7,2, 1H), 2,56 (dd, J = 6,5, 2,9, 1H), 1,74-1,66 (m, 2H), 1,62-1,54 (m, 2H), 1,39 (d, J = 7,1, 3H), 0,61-0,56 (m, 1H), 0,55-0,49 (m, 1H), 0,40-0,30 (m, 2H).

Los patrones de difracción en polvo de rayos X (DRX) de sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro en polvo de rayos X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente de CuKα (λ = 1,54060 Å) y un detector de Vantec, que funciona a 35 kV y a 50 mA. La muestra se explora entre 4 y 40° en 2θ, con un tamaño de paso de 0,0087° en 2θ y a una velocidad de exploración de 0,5 segundos/paso y con hendiduras de divergencia de 0,6 mm, antidispersión fijada de 5,28 mm y de detector de 9,5 mm. El polvo seco se envasa en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. El patrón de difracción se ajustó basándose en picos estándar de NIST 675 a 8,85 y 26,77 grados 2-teta. Se conoce bien en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma cristalina dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como el hábito cristalino y que las posiciones angulares de los picos pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden desplazarse debido a una variación en la temperatura o la humedad a las que se analiza una muestra, desplazamiento de la muestra. En el presente caso, una variabilidad de la posición del pico de ± 0,2 en 2θ tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin entorpecer la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina puede basarse en cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de ° 2θ), normalmente, de los picos más prominentes. Los patrones de difracción de forma cristalina se recogen a humedad relativa y temperatura ambiente.

Por tanto, una muestra preparada del ejemplo 10 se caracteriza mediante un patrón de DRX usando radiación CuKα como que tiene picos de difracción (valores de 2-teta) como se describe en la Tabla 1 siguiente. Específicamente, el patrón contiene un pico a 5,20 en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 10,45, 11,70, 15,75, 21,06 y 23,59 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 1: picos de difracción de rayos X en polvo del ejemplo 10

Pico	Angulo (° 2-teta)	Intensidad (%)
1	5,20	100
2	10,45	43,9
3	11,70	23,8

Pico	Ángulo (° 2-teta)	Intensidad (%)
4	13,09	24,1
5	15,75	45,9
6	16,80	56,4
7	20,49	15,3
8	21,06	79,3
9	23,58	96
10	26,44	20,9

Los receptores mGlu son receptores acoplados a proteínas G que modulan la excitabilidad neuronal. Más particularmente, la neurotransmisión de glutamato alterada se ha relacionado con trastornos neurológicos tales como afecciones de dolor crónico incluyendo dolor persistente, dolor neuropático, dolor inflamatorio crónico, o dolor visceral; trastornos psiquiátricos, tales como esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno de ansiedad generalizada o trastorno de estrés postraumático; o trastornos neurodegenerativos.

Dado que los compuestos de la presente invención son agonistas de mGlu2/3, pueden ser adecuados para el tratamiento de las afecciones mencionadas anteriormente.

Ensayo de FLIPR de los agonistas de mGlu2 y mGlu3 humanos

Para estos estudios se usan líneas celulares AV-12, derivadas de fibroblastos de hámster sirio y que expresan de forma estable los receptores mGlu2 o mGlu3 humanos y cotransfectadas con el transportador de glutamato EAAT 1 (transportador de aminoácidos excitadores 1) de rata y la subunidad Gα15. La expresión de Gα15 permite que los receptores acoplados a Gi señalicen a través de la ruta de la fosfolipasa C, dando como resultado la capacidad para medir la activación del receptor mediante un ensayo fluorimétrico de respuesta a calcio. Las líneas celulares se mantienen mediante cultivo en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con glucosa alta y clorhidrato de piridoxina suplementado con suero bovino fetal dializado al 5 %, piruvato sódico 1 mM, HEPES 10 mM (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etanosulfónico), L-glutamina 1 mM y 5 µg/ml de blasticidina (todos los medios se adquirieron de Invitrogen). Los cultivos confluentes se pasan bisemanalmente usando una solución de disociación libre de enzimas (Chemicon S-004-B). Las células se recogen 24 horas antes del ensayo y se dispensan usando un sembrador de células Matrix Well-Mate a 85.000 (mGlu2) o 115.000 (mGlu3) células por pocillo en placas de 96 pocillos, de paredes negras, recubiertas con poli-D-lisina (BD BioCoat n.º: 354640) en medio que contiene solo L-glutamina 250 (mGlu2) o 125 (mGlu3) µM (recién añadida). Los niveles de calcio intracelular se monitorizan antes y después de la adición de compuestos usando un lector de placas de imágenes fluorimétricas (FLIPR, Molecular Devices). El tampón de ensayo se compone de solución salina tamponada de Hank (HBSS; Sigma) suplementada con HEPES 20 mM. Se retira el medio y las células se incuban con Fluo-3AM 8 µM (Molecular Probes, F-1241; 50 µl por pocillo) en tampón de ensayo durante 90 minutos (mGlu2) o 120 minutos (mGlu3) a 25 °C. Se retira la solución de tinción y se sustituye con tampón de ensayo recién preparado (50 µl por pocillo). Se lleva a cabo un ensayo de FLIPR de adición única que genera una curva de respuesta a concentración de 11 puntos (diluciones 3X partiendo de 10 µM) para el glutamato agonista (Fisher A125-100) antes de cada experimento para confirmar la respuesta CE₅₀ típica. Los resultados se analizan usando Prism v4.03 (GraphPad Software). Se someten a prueba los compuestos de la invención en un ensayo de FLIPR de adición única usando un perfil de respuesta a concentración de 10 puntos usando diluciones 3X que parten de una concentración final de 25 µM. Los compuestos de la invención se solubilizan como reservas 10 mM en NaOH 0,1 N y se almacenan a -20 °C. Se diluyen a través de una serie de diluciones triples en tampón de ensayo. Después de tomar una lectura de fluorescencia inicial de 5 segundos en el instrumento FLIPR, se añade un compuesto de la invención a la placa de células (50 µl por pocillo). Con el fin de detectar la actividad agonista se recogen los datos cada segundo durante los primeros 30 segundos y después cada 3 segundos durante un total de 90 segundos. La respuesta máxima se define como la inducida por la CEmax (100 µM de glutamato). Se mide el efecto del compuesto como la altura de pico máxima menos la mínima en unidades de fluorescencia relativas (UFR) corregidas para la fluorescencia basal medida en ausencia de glutamato. Las determinaciones se llevan a cabo usando placas únicas. Los efectos agonistas se cuantifican como el porcentaje de estimulación inducida por el compuesto solo en relación con la respuesta a glutamato máxima. Se calculan todos los datos como valores relativos de CE₅₀ usando un programa de ajuste de curvas logísticas de cuatro parámetros (ActivityBase v5.3.1.22).

El ejemplo 2 se mide en el ensayo de FLIPR de hmGlu2 sustancialmente como antes para tener una CE₅₀ de 39,0 nM ± 5,9 (n = 3, error calculado como EEM). El ejemplo 2 también se mide en el ensayo de FLIPR de hmGlu3 sustancialmente como antes para tener una CE₅₀ de 285 nM ± 52,5 (n = 8, error calculado como EEM). Estos resultados demuestran que el ejemplo 2 es un agonista de mGlu2 y mGlu3 potente.

Reversión del dolor persistente inducido por inyección de formalina

La administración de formalina en la superficie plantar de la zarpa trasera de la rata da como resultado dos fases de comportamiento nocifensor (tales como lamer, morder y sacudir la zarpa inyectada): una fase temprana durante aproximadamente los 5 minutos posteriores a la administración de formalina y una fase tardía desde aproximadamente el minuto 10 hasta el minuto 60 posteriores a la inyección de formalina. Un periodo de inactividad

desde aproximadamente el minuto 5 hasta el minuto 10 separa las dos fases. La valoración de estos comportamientos inducidos por formalina se puede automatizar usando cámaras de sobresalto (SR-Lab, San Diego Instruments, San Diego, CA) que detectan los movimientos de las ratas mediante un acelerómetro. Se dosifica (por vía intraperitoneal) un compuesto de prueba (activo) en ratas Sprague-Dawley macho no sometidas a ayuno dentro de un intervalo de 0,3-10 mg/kg 1 hora antes de la inyección de formalina intraplantar. Después, se sitúa a las ratas individualmente en cilindros dentro de las cámaras de pruebas para que se aclimaten. Se dosifica por vía oral un compuesto de prueba (profármaco) en un intervalo de 0,45-15 mg/kg, en ratas Sprague-Dawley macho no sometidas a ayuno 1 hora antes de la inyección de formalina intraplantar. Después se coloca a las ratas individualmente en cilindros dentro de las cámaras de pruebas para que se aclimaten. En puntos temporales especificados, las ratas se retiran de los cilindros y se les administra formalina (50 µl de una solución al 5 % en solución salina) por vía subcutánea en la superficie plantar de la zarpa trasera derecha e inmediatamente se colocan de nuevo en los cilindros. Los cilindros se colocan sobre las células de carga del sistema de detección dentro de las cámaras de pruebas, permitiendo de este modo la monitorización continua de la respuesta durante 60 minutos en periodos de 1 segundo. El número de acontecimientos nocifensores [el número de intervalos de 1 segundo con > de 20 unidades de carga] se suma en intervalos de 5 minutos. El umbral de 20 unidades de carga es lo suficientemente grande para eliminar la inclusión de acontecimientos fisiológicos normales tales como la respiración o el olfateo, pero de una magnitud significativa para detectar acontecimientos nocifensores. Se convierten los datos determinando el número de acontecimientos por encima del umbral (20 unidades de carga) en cada segundo de tiempo durante los 60 minutos de recogida de datos. La valoración de la fase temprana es la suma de los acontecimientos mayores de 20 unidades de carga desde el tiempo 0 hasta 5 minutos. La valoración de la fase tardía se obtiene añadiendo el número total de acontecimientos mayores de 20 unidades de carga desde el minuto 11 hasta el minuto 40 del periodo de recogida de datos. Los datos de formalina se evalúan mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y los contrastes apropiados se analizan mediante la prueba de la 't' de Dunnett para comparaciones bilaterales usando el programa de análisis estadístico JMP (6.0.2) (SAS Institute Inc, Cary, NC). Las diferencias se consideran significativas si el valor de p es menor de 0,05. Se realizan los cálculos de DE₅₀ usando un ajuste de curva de regresión no lineal sobre los datos transformados de reversión en porcentaje para cada dosis.

En este ensayo se mide el ejemplo 2, realizándolo sustancialmente como antes, para tener una DE₅₀ de 0,7 mg/kg (i.p.). En este ensayo se mide el ejemplo 10, realizándolo sustancialmente como antes, para tener una DE₅₀ de 4,8 mg/kg (p.o.). Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones útiles para el dolor persistente.

Reversión de la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios L5/L6

La ligadura unilateral de los nervios que inervan la región de la pata trasera dará como resultado un dolor persistente crónico manifestado como alodinia táctil en ratas. Se realiza la ligadura de los nervios L5/L6 (Kim y col. *Pain* (1992) 50, 355-363). La lesión neuropática se produce por la ligadura ajustada de los nervios espinales izquierdos L5 y L6 con anestesia gaseosa con una mezcla de isoflurano (al 3 % para la inducción y al 2 % para mantenerla) y oxígeno. Después de un mínimo de 14 días tras la cirugía, se evalúa la alodinia táctil midiendo la sensibilidad táctil de la zarpa lesionada frente a filamentos de von Frey con fuerzas de flexión crecientes (de 0,3 a 15 g) (Chaplan y col. *J. of Neuroscience Methods* (1994) 53, 55-63). Se considera que las ratas son hipersensibles cuando demuestran alodinia táctil (retirada de la zarpa en respuesta a la aplicación de una fuerza de flexión de menos de 2 gramos). Los valores de referencia se determinan inmediatamente antes de la evaluación del compuesto de prueba. Se dosifica por vía oral un compuesto de prueba (profármaco) a 15 mg/kg y se mide el umbral táctil para la retirada de la zarpa a 1, 2 y 4 horas después de la dosificación. Los datos se expresan como umbral de respuesta en gramos (g) y los valores son con errores estándar medios (± EE medio) para cada punto temporal. Los datos se analizan usando un análisis de varianza seguido de un análisis de Dunnett a posteriori y representan un cambio absoluto en el umbral del dolor (Cmax = valor de referencia de respuesta máximo) y expresado como la media de [log (respuesta máxima) - log valoración predosis] (g).

En este ensayo se mide el ejemplo 10 dosificado por vía oral a 15 mg/kg (en el que n = 8; error calculado como EEM), realizado sustancialmente como antes, para tener un umbral mecánico incrementado de forma significativa a una, dos y cuatro horas. $9,06 \pm 2,26$, $12,31 \pm 1,86$ y $8,63 \pm 1,98$, respectivamente, comparados con los valores correspondientes tras el tratamiento con vehículo: $1,50 \pm 0,60$, $1,34 \pm 0,75$ y $2,35 \pm 0,62$ a una, dos y cuatro horas, respectivamente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones útiles para afecciones de dolor neuropático.

Reversión de la hiperalgesia mecánica inducida por ACF

La inducción de la inflamación local en la zarpa trasera de la rata provocará una hiperalgesia mecánica persistente que se puede medir determinando el umbral frente a los estímulos de presión para dar una respuesta dolorosa. El procedimiento para la hiperalgesia mecánica inducida por adyuvante completo de Freund (ACF) en ratas se describe ampliamente en Iadarola y col. *Brain Res.* (1988) 455, 205-212. Las ratas se someten a anestesia con isoflurano durante la inyección intraplantar de la zarpa derecha con 50 µl de ACF (Sigma C5881, 1 mg/ml de extracto de micobacterias en aceite de parafina al 85 %, monooleato de manitol al 15 %). Se deja que los animales se recuperen en cajas de lecho blando y los cambios en la hiperalgesia mecánica se miden 24 horas después de la inyección de ACF. Se determina la hiperalgesia mecánica (Prueba de Randall Selitto) sujetando con cuidado a la rata y colocando la zarpa entre la superficie y el elemento de presión (analgesímetro de Ugo Basile). Se registra la fuerza en gramos cuando el animal retira la zarpa. Se aplica una fuerza máxima de no más de 250 gramos y si la rata no retira la zarpa, se registra un valor de 250 gramos.

Se somete a las ratas a prueba para la respuesta de referencia antes de la inyección de ACF. Se somete a prueba la respuesta posterior a ACF a la mañana siguiente (aproximadamente 24 horas después de la inyección de ACF). Las ratas se distribuyen aleatoriamente en base a la respuesta posterior a ACF con cualquier rata que muestre una puntuación >150 gramos excluida de someterla a más pruebas. Se dosifica por vía oral un compuesto de prueba (profármaco) en un intervalo de 1,5 a 15 mg/kg y se mide el umbral mecánico para la retirada de la zarpa a 1, 2 y 4

horas después de la dosificación. La significación estadística se define como un valor de $p < 0,05$ en un análisis de covarianza seguido de una prueba de Dunnett a posteriori para cada punto temporal. La tabla 2 siguiente proporciona los resultados estadísticamente significativos para el ejemplo 10 realizado sustancialmente como antes. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención son medicaciones útiles para afecciones de dolor inflamatorio crónico tales como la osteoartritis o la artritis reumatoide.

Tabla 2

	Umbral de retirada de la zarpa (gramos, fuerza)			
	Valor de referencia (Antes de ACF)	24 horas (después de ACF)	Una hora (después de la dosificación)	Dos horas (después de la dosificación)
Vehículo (HEC al 1 %)	236 ± 7	112 ± 9	98 ± 7	109 ± 14
1,5 mg/kg p.o. del ejemplo 10	243 ± 5	113 ± 8	180 ± 14*	186 ± 19*
4,5 mg/kg p.o. del ejemplo 10	221 ± 10	114 ± 9	153 ± 20*	221 ± 20*
15 mg/kg p.o. del ejemplo 10	244 ± 4	108 ± 12	250 ± 0*	232 ± 15*
Los valores son la media ± EEM para N = 8-10 por grupo.				
* Valor de $p < 0,05$ frente a vehículo en el mismo punto temporal (ANOVA y prueba t de Dunnett)				

Reversión de comportamientos de dolor inducidos por distensión colorrectal.

Se puede inducir el dolor visceral en ratas por distensión de la cavidad colorrectal y se puede monitorizar el dolor accediendo a la contracción refleja de los músculos abdominales. Se realiza la medida de las contracciones reflejas de los músculos abdominales con dolor provocado por distensión colorrectal en la rata sustancialmente como se describe por Fioramonti y col. *Neurogastroenterology and Motility* (2003) 15, 363-369 y Urban *et al. J. of Pharmacology and Exp. Ther.* (1999) 290, 207-213. A ratas Sprague Dawley macho se les implantan quirúrgicamente electrodos electromiográficos (EMG) en el músculo abdominal oblicuo y se deja que se recuperen durante una semana, durante la que los animales se aclimatan a la manipulación y a restricción parcial para minimizar los efectos del estrés. Se recogen las medidas de los EMG de referencia y se registran después de la inserción en el recto (8 cm) de un balón de látex lubricado unido a un monitor/regulador de presión para variar la presión entre 20, 40 y 60 mm Hg durante una duración de 20 segundos con un periodo de reposo de 3 minutos entre ensayos. Se registra un conjunto de tres exposiciones en cada presión antes de variar la presión hasta el siguiente nivel. Los datos se recogen como el área bajo la curva para la lectura de EMG (μ voltios por segundo) durante las estimulaciones de presión y se realiza el promedio sobre los tres ensayos. Se dosifica por vía oral un compuesto de prueba (profármaco) dentro de un intervalo de 1,5 a 17 mg/kg, 90 minutos antes del comienzo de la distensión colorrectal. La significación estadística se define como un valor de $p < 0,05$ en un análisis de covarianza seguido de una prueba de Dunnett a posteriori. La tabla 3 siguiente proporciona los resultados estadísticamente significativos para el ejemplo 10 realizado sustancialmente como antes. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones útiles para afecciones de dolor visceral.

Tabla 3

	AUC de la lectura de los EMG para músculo abdominal (μ V/s) con 60 mm Hg de presión colorrectal	
	Valor de referencia (antes de la dosificación)	90 minutos (después de la dosificación)
AUC de la lectura de los EMG para músculo abdominal (μ V/s) con 60 mm Hg de presión colorrectal		
Vehículo (HEC al 1 %)	813 ± 101	849 ± 65
1,5 mg/kg p.o. del ejemplo 10	853 ± 142	618 ± 92
4,5 mg/kg p.o. del ejemplo 10	887 ± 152	531 ± 99*
17 mg/kg p.o. del ejemplo 10	773 ± 134	266 ± 87*
Los valores son la media ± EEM para N = 8-16 por grupo.		
* Valor de $p > 0,05$ frente a vehículo en el mismo punto temporal (ANOVA y prueba de la t de Dunnett)		

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

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

Se monitoriza la actividad motora colocando ratas Sprague-Dawley macho (Harlan, Indianápolis, IN) individuales en cajas tipo caja de zapatos de plástico, transparentes, de dimensiones 45 x 25 x 20 cm, con 1 cm de profundidad de virutas de madera como lecho y una rejilla metálica en la parte superior de la caja. Los monitores de actividad motora (Kinder Scientific) consisten en una gradilla rectangular de 12 haces de luz dispuestos en una formación de 8 x 4, (o una agrupación de alta densidad de 22 en un patrón de 15x7) a una altura de 5 cm, con una segunda gradilla (para medir comportamientos de cría) a una altura de 15 cm. Se sitúa la caja de tipo caja de zapatos dentro de estas gradillas, con las gradillas sobre un tablero de 3 pies (91,4 cm) de alto en una sala aislada. Se dosifica (vía intraperitoneal) un compuesto de la invención (activo) dentro de un intervalo de 0,3-10 mg/kg, 30 minutos antes de una dosis de exposición de 5 mg/kg de fenciclidina (PCP). Se dosifica por vía oral un compuesto de la invención (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 exposición de 5 mg/kg de PCP. El día de la prueba, se sitúan las ratas en la caja de prueba y se deja que se aclimaten durante 30 minutos antes de la exposición a PCP; se monitorizan las ratas durante 60 minutos adicionales después de administración de PCP.

Se realizan los análisis de datos y los cálculos de DE_{50} usando GraphPad Prism (San Diego, CA. EE.UU.). Los análisis de poder han determinado que se necesitan 8-10 ratas por grupo para tener un poder estadístico apropiado para detectar diferencias de tratamientos (poder = 0,8). Se lleva a cabo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una prueba de comparación múltiple de Dunnett a posteriori sobre el total de 60 minutos de actividad locomotora. Se realizan los cálculos de DE_{50} usando un ajuste de curva de regresión no lineal sobre los datos transformados de reversión en porcentaje para cada dosis.

En este ensayo se mide el ejemplo 2 realizándolo sustancialmente como antes para tener una DE_{50} de 1,46 mg/kg (i.p.). En este ensayo se miden los ejemplos 5 y 6 realizándolos sustancialmente como antes para tener 2,95 mg/kg (p.o.) y 4,31 mg/kg (p.o.), respectivamente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones útiles para la esquizofrenia y el trastorno bipolar.

Atenuación de la hipertermia inducida por estrés en ratas

La hipertermia, un aumento de la temperatura corporal central, es un fenómeno general que se ha demostrado de forma fiable en muchos mamíferos, incluyendo seres humanos, en respuesta al estrés. En muchos trastornos de ansiedad, la hipertermia se produce 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 y el trastorno de estrés postraumático están entre los trastornos que se pueden tratar con estos compuestos. El procedimiento convencional y mínimamente invasivo para analizar la hipertermia inducida por estrés se realiza midiendo la temperatura corporal y los incrementos inducidos por estrés en la temperatura corporal, por medio de un termómetro rectal. Se someten a prueba ratas Fisher F-344 macho (Harlan, Indianápolis, IN, EE.UU.) con un peso de entre 275–350 g. Se alojan de forma individual todos los animales con alimento y agua automatizada disponibles a voluntad y se mantienen en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (las luces se encienden a las 6:00). Se someten a ayuno los animales durante aproximadamente 12-18 horas antes del experimento, lo que se lleva a cabo durante la fase de luz. Se dosifica a las ratas por vía intraperitoneal (IP) a un volumen de dosis de 1 ml/kg con compuestos de la invención en el intervalo de 0,3, 1, 3 y 10 mg/kg. El vehículo es solución salina + NaOH añadido hasta lograr un pH de 5-7. Se usa el antagonista de mGluR5 MTEP (3-[(2-metil-1,3-tiazol-4-il)etinil]piridina), que ha demostrado una actividad de tipo ansiolítico fuerte en modelos preclínicos, como comparador (5 mg/kg, por vía i.p., disuelto en agua). Inmediatamente después de la dosificación, se devuelven las ratas a su caja de origen y el experimentador apaga las luces y sale de la sala. La sala de dosificación se oscurece durante el resto del periodo de pretratamiento de 1 h.

Después del periodo de pretratamiento, se llevan las ratas de forma individual a una sala adyacente bien iluminada en la que se determinan las temperaturas corporales de referencia por inserción de una sonda rectal lubricada con aceite mineral. Se evalúa la temperatura corporal usando un termómetro de microsonda PHYSITEMP BAT-12® con una sonda rectal para ratas PHYSITEMP RET-2® (Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, EE.UU.). Se inserta la sonda aproximadamente 2 cm en el recto, para medir la temperatura corporal central (esta es la temperatura corporal de referencia, T_1 , en grados Celsius). Diez minutos después, se registra una segunda medida de la temperatura corporal (T_2). La diferencia en la temperatura corporal ($T_2 - T_1$) se define como la respuesta hipertérmica inducida por estrés. La dosis a la que un compuesto de la invención produce una reducción de un 35 % en la respuesta hipertérmica inducida por estrés, con relación a la respuesta del vehículo, se define como la dosis T_{35} .

En este ensayo se mide el ejemplo 2 realizándolo sustancialmente como antes para tener una T_{35} de 0,57 mg/kg. En este ensayo se mide el ejemplo 5 realizándolo sustancialmente como antes para tener una T_{35} de 6,4 mg/kg. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones útiles para trastornos de ansiedad. Más en particular, los compuestos dentro del alcance de la presente invención pueden ser medicaciones útiles para el trastorno de ansiedad generalizada y/o el trastorno de estrés postraumático.

Análisis de la inhibición de PepT1 GlySar *in vitro* y determinación de CI_{50}

Se establecen ensayos de PepT1 para examinar la capacidad de los profármacos para interactuar con el transportador en la absorción intestinal PepT1.

Se hacen crecer células HeLa, derivadas de intestino humano, (American Type Culture Collection) en medio Hyclone

(Invitrogen, n.º de cat. SH30243) que contiene suero fetal bovino al 10 % (FBS), aminoácidos no esenciales (NEAA) 0,1 mM y 100 unidades/ml de penicilina con 100 µg/ml de estreptomicina a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Se usa la línea celular durante hasta 40 pasajes y después se descarta. Se descongelan células congeladas en viales de 1 ml en un baño de agua durante 1-2 minutos y se añaden a 5 ml de medio celular a 37 °C. Cada uno de los matraces T está provisto con 8,5 ml de medio recién preparado y 1,5 ml de reserva de células. Se pasan las células dos veces durante una semana. Esto se logra aclarando los matraces con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato-ácido etilen-diaminotetraacético (PBS-EDTA), añadiendo 2 ml de tripsina durante 2-5 minutos, para separar las células y añadiendo 8 ml de medio recién preparado para inhibir la actividad adicional de tripsina. Cada nuevo matraz recibe una combinación de 8,5 ml de medio recién preparado y 1,5 ml de reserva de células, para obtener una dilución de células de 1:6. Se incuban las células a 37°C, hasta que estén preparadas para el estudio de incorporación.

Se plaquean las células que son confluentes en un 70-80 % en los matraces T 1 día antes del procedimiento de transfección. Se trata el matraz con la reserva de células con PBS-EDTA y tripsina para separar las células y se usa medio de transfección a partir de este punto. El medio de transfección consiste en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) + NEAA. A cada pocillo, se añaden 0,5 ml de la mezcla de células ($1,3 \times 10^5$ es la concentración de células deseada) y se incuban las células a 37°C durante la noche. Veinticuatro horas antes del ensayo, se transfectan las células con PEPT1. Se prepara la mezcla de transfección mezclando 600 µl de medio de transfección libre de suero, 18 µl de FuGene6 (Roche Diagnostics) y 11 µg del ADN de PepT1. Se incuba el complejo de reactivo de transfección-ADN durante 20 minutos y se añaden 24 µl del complejo reactivo-ADN a cada pocillo.

Se mide la inhibición de la actividad de incorporación de [glicil-1-2-¹⁴C]Glicilsarcosina (GlySar) mediada por PEPT1 en las células cultivadas en las placas de 24 pocillos 24 horas después de la transfección, como se publicó previamente (Zhang y col. 2004. J. Pharm. Exper Ther. 310:437-445). Para medir la capacidad de un compuesto de la invención para inhibir la incorporación de [¹⁴C]Gly-Sar, se incuban profármacos con células HeLa transfectadas de forma transitoria con PepT1 con una confluencia de un 80 a un 90 % a 5 mM en medio de incorporación a pH 6,0 en presencia de [¹⁴C]Gly-Sar (Moravek Biochemicals) 5 µM y Gly-Sar fría 20 µM. El medio de incorporación 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. Después, se lleva la solución hasta pH 6,0 usando ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico. El volumen de incubación es de 500 µl y se realiza a temperatura ambiente durante 3 minutos. Para detener la incorporación al concluir el tiempo de incubación, se extrae por aspiración el medio de incorporación de la monocapa de células y se añaden 500 µl de PBS enfriado en hielo al pocillo. Se lavan las células 3 veces con 500 µl de PBS a temperatura ambiente sin Ca⁺² ni Mg⁺². Después se lisan las células con 300 µl de solución al 1 % de Triton X100 H₂O. Se retira una alícuota de 200 µl y se determina la radioactividad por recuento de centelleo líquido para medir la [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 (cefadroxilo y cefalexina) en paralelo con cada experimento para demostrar la viabilidad del sistema de ensayo. Los profármacos con inhibición de la incorporación de GlySar igual o mejor que cefalexina se consideran aceptables. Los valores medios ± la desviación estándar son 10,1 ± 9,5 % (n = 19) para glicina, 53,2 ± 13,2 % (n = 19) para cefadroxilo y 37,5 ± 14,7 % (n = 18) para cefalexina.

Para el ensayo de CI₅₀ de PepT, se incuban los profármacos en un intervalo de concentraciones (de 0,0625 a 25 mM) en presencia de [¹⁴C]Gly-Sar 5 µM y Gly-Sar fría 20 µM. Los procedimientos de incubación y muestreo son exactamente los mismos que el análisis de PepT1 descrito anteriormente. Se evalúan los datos de incorporación de [¹⁴C]Gly-Sar para cada una de las concentraciones de profármaco y se calculan los valores de CI₅₀.

En este ensayo se miden los ejemplos 5, 6 y 7 realizándolos sustancialmente como antes para tener una inhibición de la incorporación de [3H]Gly-Sar de hPepT1 a 5 mM de un 89 %, 87 % y 78 %, respectivamente. En este ensayo se miden los ejemplos 5 y 6 realizándolos sustancialmente como antes para tener una CI₅₀ de inhibición de la incorporación de [3H]Gly-Sar de hPepT1 de 1,98 mM y 0,25 mM, respectivamente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención se absorben por vía oral a través del transportador PepT1.

Ensayo de hidrólisis de profármaco intestinal *in vitro*

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

Se obtiene cada lote de duodeno humano a partir de un único donante y se raspa el intestino y se congelan las secciones por separado. Se realizan todas las recogidas de tejido original a 4°C y se congelan inmediatamente a -70 °C. Se descongelan los homogeneizados intestinales humanos y se diluyen hasta una concentración de proteína final de 0,5 mg/ml en tampón de PBS 100 mM, pH 7,4 inmediatamente antes de las incubaciones.

Se llevan a cabo incubaciones en placas de 96 pocillos y se realiza el ensayo con todos los profármacos por duplicado cada día. Se preparan soluciones de reserva de profármaco en agua a una concentración de 1 mM. Se sitúan una alícuota de 200 µl de 0,5 mg/ml de homogeneizado intestinal y 196 µl de tampón 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 profármaco 1 mM al homogeneizado. Inmediatamente después de la adición del profármaco (tiempo cero) y después de 1 hora de incubación, se retiran muestras de 50 µl de la mezcla de incubación usando un pipeteador de 96 pocillos simultáneo desechable automático y se añaden directamente a 200 µl de solución de desactivación de metanol que contenía 100 ng/ml de estándar interno. Después se centrifugan las muestras a 3500 rpm durante 5 minutos a 10 °C. Se transfiere el sobrenadante (200 µl) a una placa de PCR de 96 pocillos final y se sella para análisis por CL/EM/EM.

Se determinan las concentraciones del metabolito activo hidrolizado en las mezclas de incubación usando detección

CL/EM/EM en un espectrómetro de masas cuadrupolar Sciex API 4000 con la versión Analyst 1.4.2, TurbolonSpray, ionización positiva y monitorización 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 de un 0,1 % de fase móvil A a un 99 % de fase móvil A. La fase móvil A es 1000:5 agua: ácido heptafluorobutérico y la fase móvil B es metanol:ácido acético glacial 1:1.

Se determinan las concentraciones del metabolito activo hidrolizado en las mezclas de incubación intestinales a partir de curvas estándar preparadas por dilución de dos veces por duplicado comenzando a 10 µM en PBS 100 mM pH 7,4 y posteriormente desactivadas con solución de estándar interno de metanol idéntica a las muestras. Se calculan los promedios y desviaciones estándar usando Microsoft® Office Excel® 2007. Se determina la cantidad de hidrólisis como un porcentaje molar de metabolito activo formado con relación a la concentración de profármaco añadida. La hidrólisis del control positivo, profármaco interno A a fármaco de metabolito activo interno A, realizada en cada lote proporcionó un promedio de un 75,3 % (n = 20). Después se normalizan los valores finales con relación a la formación del fármaco de metabolito activo interno A.

En este ensayo se miden los ejemplos 5, 6 y 7 realizándolos sustancialmente como antes para tener una hidrólisis intestinal humana con relación al profármaco interno A de un 36 % (n = 3, DE = 2,7), 44 % (n = 3, DE = 4,1) y 34 % (n = 1), respectivamente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención se hidrolizan en el intestino humano.

Ensayo de hidrólisis de homogeneizado S-9 de hígado humano *in vitro*

Se obtienen fracciones S9 del hígado de Xenotech LLC (Lenexa, MO). El lote es de un grupo de dos donantes, un hombre y una mujer. Se prepara la fracción S9 del hígado y se diluye usando un tampón de homogeneización que consiste en Tris 50 mM, pH 7,4 a 4 °C y cloruro potásico 150 mM sin EDTA. Se incuban los profármacos en el homogeneizado de hígado durante 2 horas a 37 °C, después de lo que se determina la concentración del metabolito activo por CL/EM/EM. Se utiliza la hidrólisis del clopidogrel a ácido carboxílico de clopidogrel como un control positivo de ensayo.

Se llevan a cabo incubaciones en formato de 96 pocillos y se realiza el ensayo con todos los profármacos por duplicado cada día. Se preparan soluciones de reserva de profármaco en agua a una concentración de 1 mM. Se diluye la fracción S9 de hígado humano hasta una concentración de proteína final de 0,5 mg/ml en tampón de PBS 100 mM, pH 7,4.

Se sitúan una alícuota de 200 µl de 0,5 mg/ml de homogeneizado S-9 de hígado humano y 196 µl de tampón 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 profármaco 1 mM al homogeneizado. Para garantizar que la hidrólisis no se debe a inestabilidad química, también se incuban los profármacos con tampón PBS solo sin S-9 de hígado. Inmediatamente después de la adición del profármaco (tiempo cero) y después de 1 hora de incubación, se retiran muestras de 50 µl de la mezcla de incubación usando un pipeteador de 96 pocillos simultáneo desechable automático y se añaden directamente a 200 µl de solución de desactivación de metanol que contenía 100 ng/ml de estándar interno. Después se centrifugan las muestras a 3500 rpm durante 5 minutos a 10°C. Se transfiere el sobrenadante (200 µl) a una placa de PCR de 96 pocillos final y se sella para análisis por CL/EM/EM.

Se realiza la cuantificación de CL/EM/EM del metabolito activo formado durante la incubación en un Sciex API 4000, versión Analyst 1.4.2, TurbolonSpray, ionización positiva y monitorización de reacción seleccionada (SRM). La columna de HPLC usada es una 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 metanol/ácido acético glacial 1:1. Se utiliza un gradiente de fase móvil comenzando en una proporción de fase móvil A/B, de 99,9/0,1 y finalizando en 1/99.

Se determinan las concentraciones del metabolito activo hidrolizado en las mezclas de incubación a partir de curvas estándar preparadas por dilución de dos veces por duplicado comenzando a 10 µM en PBS 100 mM pH 7,4 y posteriormente desactivadas con solución de estándar interno de metanol idéntica a las muestras. Se calculan los promedios y desviaciones estándar usando Microsoft® Office Excel® 2007. Se presentan los valores finales como un porcentaje molar de metabolito activo formado con relación a la concentración de profármaco añadida. Se usa la hidrólisis de clopidogrel a ácido carboxílico de clopidogrel como el control positivo y proporciona un promedio de un 73,0 % (n = 28).

En este ensayo se miden los ejemplos 8 y 9 realizándolos sustancialmente como antes para tener hidrólisis de S9 de hígado humano de un 23 % y un 59,3 %, respectivamente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención se hidrolizan en el hígado humano.

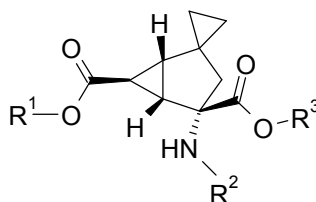
Los datos demuestran que los profármacos de aminoácidos ejemplificados inhiben la incorporación del sustrato de PepT1 GlySar tan bien como o mejor que cefadroxilo y cefalexina (Zhang y col., 2004. JPET 310:437-445), lo que sugiere un potencial para absorción oral humana por medio del transportador PepT1. Además de la absorción del profármaco, después de la entrada en el organismo, la hidrólisis de profármaco para proporcionar el metabolito activo es esencial. Los presentes estudios de hidrólisis *in vitro* sugieren que los profármacos de aminoácidos ejemplificados se pueden hidrolizar por el intestino humano. La hidrólisis de los profármacos de diéster ejemplificados se produce en homogeneizados de hígado humano lo que sugiere el potencial para los profármacos de diéster ejemplificados de producir hidrólisis en seres humanos después de exposición oral. En conjunto estos datos indican el potencial para los profármacos de aminoácidos ejemplificados y profármacos de diéster ejemplificados de hidrolizarse en seres humanos para liberar el metabolito activo.

Ensayo farmacocinético

- Se administra a ratas Sprague Dawley macho, sometidas a ayuno, el ejemplo 2 por vía intravenosa a 1 mg/kg o el ejemplo 5 por sonda nasogástrica oral a una dosis de 7,5 mg/kg (igual a 5 mg/kg de equivalentes molares del ejemplo 2) en un diseño cruzado estándar ($N = 3$ recibiendo cada rata tanto dosis intravenosa como oral). Para administración intravenosa, se disuelve el ejemplo 2 en agua y para la dosis oral se prepara el ejemplo 5 en un vehículo acuoso de hidroxietilcelulosa (1 %), polisorbato 80 (0,25 %) y antiespumante 1510-US (0,05 %). Se implantan quirúrgicamente cánulas para facilitar la recogida de sangre en serie. Se recoge la sangre en tubos de EDTA durante un periodo de 0-24 horas después de la dosificación, se centrifuga y se almacena el plasma congelado hasta el momento del análisis.
- Se descongelan las muestras de plasma, se transfieren alícuotas de 50 μ l a una placa de 96 pocillos, se añaden 50 μ l de solución de estándar interno y se mezclan las muestras. Después se añaden trescientos μ l de acetonitrilo, se agitan con vórtex las muestras durante 3 minutos y se centrifugan. Se transfiere una alícuota de 300 μ l del sobrenadante a una placa separada y se evapora en atmósfera de nitrógeno a 40 grados C. Se reconstituye el residuo en 100 μ l de ácido heptafluorobutírico al 0,5 % en agua, se agita con vórtex y se centrifuga. Se analiza posteriormente una alícuota de 20 μ l por CL/EM/EM usando un muestreador automático Shimadzu y un sistema de HPLC integrado con un espectrómetro de masas AB Sciex 4000 en modo Turbospray de iones positivos. Las transiciones EM/EM son 283,2 $\rightarrow$ 44,2 uma para el ejemplo de profármaco 5 y 212,1 $\rightarrow$ 103,1 uma para el ejemplo 2 de producto activo. Se utiliza una columna de HPLC de 5 micrómetros Atlantis T3, 50 x 2,1 mm a un caudal de fase móvil de 1,0 ml/minuto y fase móvil binaria de (A) ácido fórmico al 0,2 % en agua y (B) acetonitrilo-agua (1:1, v/v) y un gradiente de un 2 % de B a un 98 % de B durante 0,8 minutos. El tiempo de retención del ejemplo 2 es aproximadamente de 0,53 minutos.
- Se calculan los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos de concentración de plasma usando Watson para Windows (Thermo Scientific). Se determina la biodisponibilidad oral relativa comparando el área bajo la curva (AUC) de concentración de plasma con el tiempo del ejemplo 2 de producto activo después de administración por vía intravenosa con el AUC del metabolito activo después de la administración oral del ejemplo 5 de profármaco.
- Un profármaco exitoso debe tanto absorberse bien después de la administración oral como hidrolizarse posteriormente para liberar el metabolito activo en la circulación sistémica. La biodisponibilidad relativa incluye ambos parámetros comparando el AUC del metabolito activo después de la administración oral de profármaco con el AUC del producto activo después de la administración intravenosa del compuesto activo. En ratas macho, la biodisponibilidad relativa de metabolito activo después de la administración oral de profármaco del ejemplo 5 como se mide en este ensayo realizándose sustancialmente como antes es del 60 ± 14 % (media $\pm$ desviación estándar) demostrando que el ejemplo 5 de profármaco tanto se absorbe bien como se hidroliza ampliamente para proporcionar el metabolito activo in vivo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



Fórmula I

5 en la que

R¹ es hidrógeno, R² es hidrógeno y R³ es hidrógeno;

R¹ es hidrógeno, R² es (2S)-2-aminopropanoilo y R³ es hidrógeno;

R¹ es hidrógeno, R² es (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo y R³ es hidrógeno;

R¹ es hidrógeno, R² es 2-aminoacetilo y R³ es hidrógeno;

10 R¹ es bencilo, R² es hidrógeno y R³ es bencilo; o

R¹ es (2-fluorofenil)metilo, R² es hidrógeno y R³ es (2-fluorofenil)metilo;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es clorhidrato del ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

20 4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2S)-2-aminopropanoilo]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es clorhidrato del ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2S)-2-aminopropanoilo]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2S)-2-aminopropanoilo]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico dihidratado.

25 7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2S)-2-aminopropanoilo]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico; 1,4-dioxano (1:0,5); clorhidrato.

30 8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es clorhidrato del ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

35 10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es clorhidrato del ácido (1S,2S,5R,6S)-2-[(2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

40 13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo; 1,4-dioxano; clorhidrato.

14. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es (1S,2S,5R,6S)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo], o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es clorhidrato de (1S,2S,5R,6S)-2-

aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de bis[(2-fluorofenil)metilo].

16. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o la sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
17. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso en terapia.
- 5 18. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en dolor persistente, dolor neuropático, dolor inflamatorio crónico y dolor visceral.
19. El compuesto o sal para su uso según la reivindicación 18, en el que el trastorno neurológico es dolor persistente.
- 10 20. El compuesto o sal para su uso según la reivindicación 18, en el que el trastorno neurológico es dolor neuropático.
21. El compuesto o sal para su uso según la reivindicación 18, en el que el trastorno neurológico es dolor inflamatorio crónico.
22. El compuesto o sal para su uso según la reivindicación 18, en el que el trastorno neurológico es dolor visceral.
- 15 23. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso en el tratamiento de un trastorno psiquiátrico seleccionado del grupo que consiste en esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno de ansiedad generalizada y trastorno de estrés postraumático.
24. El compuesto o sal para su uso según la reivindicación 23, en el que el trastorno psiquiátrico es esquizofrenia.
- 20 25. El compuesto o sal para su uso según la reivindicación 23, en el que el trastorno psiquiátrico es trastorno bipolar.
26. El compuesto o sal para su uso según la reivindicación 23, en el que el trastorno psiquiátrico es trastorno de ansiedad generalizada.
27. El compuesto o sal para su uso según la reivindicación 23, en el que el trastorno psiquiátrico es trastorno de estrés postraumático.