

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 139**

51 Int. Cl.:

C07C 323/58 (2006.01)

A61K 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2011 PCT/US2011/060730**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12068067**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2011 E 11791692 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2640697**

54 Título: **Compuestos 3-fenilsulfanilmetil-biciclo[3.1.0]hexano 4-sustituidos como antagonistas de mGluR 2/3**

30 Prioridad:

18.11.2010 US 415121 P

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

17.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SMITH, STEPHON CORNELL;
LI, RENHUA;
MITCH, CHARLES HOWARD y
VETMAN, TATIANA NATALI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 650 139 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).

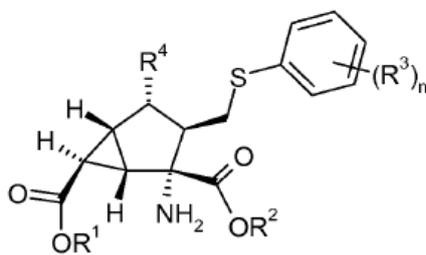
DESCRIPCIÓN

Compuestos 3-fenilsulfanilmetil-biciclo[3.1.0]hexano 4-sustituídos como antagonistas de mGluR 2/3

Glutamato es un neurotransmisor excitatorio mayor en el cerebro y está relacionado con una amplia variedad de procesos fisiológicos mediados a través de por lo menos 11 receptores diferenciados, cada uno de ellos con su propia farmacología. Los subtipos 2 y 3 de receptor metabotrópico de glutamato (cocidos como mGlu2 y mGlu3) se agrupan generalmente como receptores mGlu del Grupo II sobre la base de su homología de secuencia, un acoplamiento de segundo mensajero similar y características farmacológicas similares. Los antagonistas de receptores mGlu2/3 han presentado significativos efectos farmacológicos en modelos de animales para trastornos depresivos y trastornos de somnolencia excesiva. Como tales, los antagonistas de mGlu2/3 se consideran útiles en el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo trastorno depresivo mayor (TDM), depresión unipolar, distimia y/o ciclotimia y/o útiles en el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva, como por ejemplo somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnia asociada con sueño obstructivo, apnea y narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluyendo, pero sin limitarse a ellos trastorno del sueño por cambios del turno de trabajo, trastornos de desfase horario (jet lag), síndrome de la fase del sueño retrasada, síndrome del adelanto de la fase del sueño y trastorno por ciclo de sueño-vigilia diferente de 24 horas), hipersomnolencia idiopática y/o somnolencia excesiva asociada a sueño no reparador (SNR).

En la patente estadounidense US 5.916.920, se describen ciertos compuestos biciclo[3.1.0]hexano 3-monosustituídos como moduladores del receptor metabotrópico de glutamato útiles para el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo como agentes antidepresivos. En la patente estadounidense US 7.157.594, se describen varios compuestos biciclo[3.1.0]hexano 3-monosustituídos como antagonistas del receptor mGlu del Grupo II para su uso en el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo síntomas depresivos. En la patente estadounidense US 2007/0021394 A1, se describen diversos compuestos biciclo[3.1.0]hexano 3-monosustituídos como antagonistas de receptor mGlu del Grupo II y profármacos de los mismos para su uso en el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo depresión. En la patente estadounidense US 2006/0142388, se desvelan inhibidores de receptor de glutamato metabotrópico del grupo II de ácido 2-amino biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico. La presente invención proporciona una familia de compuestos 3-fenilsulfanilmetil-biciclo[3.1.0]hexano 4-sustituídos con una alta potencia antagonista para receptores mglu2 y mGlu3. Los compuestos de la presente invención son también selectivos para los receptores mGlu2 y mGlu3, en particular, contra otros receptores mGlu. Asimismo, se ha demostrado a través de modelos animales que los compuestos de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos depresivos (entre los que se pueden incluir trastorno depresivo mayor (TDM), depresión unipolar, distimia y/o ciclotimia y/o útiles en el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva, que pueden incluir somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnia asociada con sueño obstructivo, apnea y narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluyendo, pero sin limitarse a ellos trastorno del sueño por cambios del turno de trabajo, trastornos de desfase horario (jet lag), síndrome de la fase del sueño retrasada, síndrome del adelanto de la fase del sueño y trastorno por ciclo de sueño-vigilia diferente de 24 horas), hipersomnolencia idiopática y/o somnolencia excesiva asociada a sueño no reparador (SNR). Los efectos de tipo antidepresivo y de promoción de la vigilia de este mecanismo también predicen un impacto sobre los síntomas de trastornos depresivos como puedan ser la fatiga, que resultan difíciles de tratar de otro modo con los antidepresivos existentes.

La presente invención proporciona compuestos de Fórmula I:



I

en la que R^1 y R^2 son cada uno de ellos independientemente hidrógeno, alcóxicarboniloximetilo de C_1-C_3 , alquilcarboniloximetilo de C_1-C_5 o cicloalquilcarboniloximetilo de C_3-C_6 ; R^3 es independientemente cada vez que aparece metilo, flúor o cloro; R^4 es hidroxilo, amino, metilcarbonilamino o 1,2,4-triazoliltilio; y n es 1 o 2;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una característica de la presente invención es que los compuestos de Fórmula I en los que R^1 y R^2 son ambos hidrógeno (los compuestos di-ácido) son compuestos terapéuticamente activos *in vivo*, mientras que los compuestos en los que R^1 o R^2 o ambos son distintos a hidrógeno son profármacos de sus análogos di-ácido terapéuticamente

activos. Los compuestos en los que R¹ o R² o ambos son distintos a hidrógeno se hidrolizan *in vivo* para proporcionar el análogo di-ácido terapéuticamente activo. Los compuestos profármaco se administran por vía oral, en particular, los profármacos diéster proporcionan una mejor biodisponibilidad del metabolito diácido en comparación con la administración oral de los compuestos diácido (R¹ y R² ambos hidrógeno), pero los compuestos diácido proporcionan mejores actividades cuando se administran por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Asimismo, este aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica adaptada para el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo trastorno depresivo mayor, depresión unipolar, distimia y/o ciclotimia, que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables de la misma.

Otra realización más de este aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, en combinación con al menos un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. En otra realización más de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende además un segundo agente terapéutico que es un fármaco útil para el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo a inhibidor de recaptación de serotonina, como por ejemplo fluoxetina y/o citalopram.

En otra realización más aún de este aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica adaptada para el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva, como por ejemplo somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnia asociada con sueño obstructivo, apnea y narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluyendo, pero sin limitarse a ellos trastorno del sueño por cambios del turno de trabajo, trastornos de desfase horario (jet lag), síndrome de la fase del sueño retrasada, síndrome del adelanto de la fase del sueño y trastorno por ciclo de sueño-vigilia diferente de 24 horas), hipersomnolencia idiopática y/o somnolencia excesiva asociada a sueño no reparador (SNR), que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptable de los mismos.

La presente invención proporciona también un procedimiento de tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo trastorno depresivo mayor (TDM), depresión unipolar, distimia y/o ciclotimia, en un mamífero que comprende la administración a un mamífero que necesita dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización de este aspecto de la invención, el procedimiento comprende además la administración en combinación de forma simultánea, separada o secuencial con un segundo agente terapéutico que es un fármaco útil en el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo un inhibidor de recaptación de serotonina, como por ejemplo fluoxetina y/o citalopram.

Otras realizaciones de la invención proporcionan procedimientos de tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva que comprende la administración a un mamífero que necesita dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones de este aspecto de la invención, la somnolencia excesiva se debe a uno cualquiera o más de los siguientes: somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnia asociada con sueño obstructivo, apnea y narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluyendo, pero sin limitarse a ellos trastorno del sueño por cambios del turno de trabajo, trastornos de desfase horario (jet lag), síndrome de la fase del sueño retrasada, síndrome del adelanto de la fase del sueño y trastorno por ciclo de sueño-vigilia diferente de 24 horas), hipersomnolencia idiopática y/o somnolencia excesiva asociada a sueño no reparador (SNR).

En una realización en particular de dichos procedimientos de tratamiento, el mamífero es un ser humano.

La presente invención proporciona también un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en terapia. Dentro de este aspecto, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de trastornos depresivos. En otras realizaciones más, el trastorno depresivo es uno cualquiera entre trastorno depresivo mayor (TDM), depresión unipolar, distimia y/o ciclotimia. En otra realización de este aspecto de la invención, la invención proporciona un compuesto de acuerdo con Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para su uso en combinación de forma simultánea, por separado o secuencial con un inhibidor de recaptación de serotonina, como por ejemplo fluoxetina y/o citalopram, en el tratamiento de trastornos depresivos.

Asimismo, este aspecto de la invención incluye un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva. En realizaciones en particular de este aspecto de la invención, la somnolencia excesiva se debe a uno cualquiera o más de los siguientes: somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnia asociada con sueño obstructivo, apnea y narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluyendo, pero sin limitarse a ellos trastorno del sueño por cambios del turno de trabajo, trastornos de desfase horario (jet lag), síndrome de la fase del sueño retrasada, síndrome del adelanto de la fase del sueño y trastorno por ciclo de sueño-vigilia diferente de 24 horas), hipersomnolencia idiopática y/o

somnolencia excesiva asociada a sueño no reparador (SNR).

En una realización en particular de este aspecto de la invención, el uso es en mamíferos, en particular, seres humanos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo trastorno depresivo mayor (TDM), depresión unipolar, distimia y/o ciclotimia. Otra realización de este aspecto de la invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y un segundo agente terapéutico útil en el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo un inhibidor de recaptación de serotonina, como por ejemplo fluoxetina y/o citalopram, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos depresivos. Otra realización de la invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva. En realizaciones en particular de este aspecto de la invención, el medicamento es para el tratamiento de uno cualquiera o más de los siguientes: somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnia asociada con sueño obstructivo, apnea y narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluyendo, pero sin limitarse a ellos trastorno del sueño por cambios del turno de trabajo, trastornos de desfase horario (jet lag), síndrome de la fase del sueño retrasada, síndrome del adelanto de la fase del sueño y trastorno por ciclo de sueño-vigilia diferente de 24 horas), hipersomnolencia idiopática o somnolencia excesiva asociada a sueño no reparador (SNR).

Los compuestos de la presente invención tienen fracciones básicas y ácidas y, en consecuencia, reaccionan con una serie de bases y ácidos orgánicos e inorgánicos para formar sales farmacéuticamente aceptables. Dentro del ámbito de la presente solicitud se contemplan sales farmacéuticamente aceptables de cada uno de los compuestos de la presente invención. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier sal de un compuesto de la invención que no es sustancialmente tóxica para un organismo vivo. Dichas sales incluyen las enumeradas en Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977), conocida entre las personas especializadas en la técnica.

Las clases preferentes de compuestos de la presente invención son compuestos en los que:

- 1) R¹ y R² son ambos hidrógeno;
 - 2) R¹ o R² o ambos son distintos a hidrógeno;
 - 3) R¹ y R² son ambos distintos a hidrógeno;
 - 4) R¹ y R² son iguales y son distintos a hidrógeno;
 - 5) R¹ y R² son cada uno de ellos isopropoxicarboniloximetilo;
 - 6) n es 2;
 - 7) R³ es independientemente cada vez que aparece flúor o cloro;
 - 8) n es 2 y los grupos R³ están en las posiciones fenilo 3- y 4-;
 - 9) n es 2 y los grupos R³ son cada uno de ellos independientemente flúor o cloro y están en las posiciones fenilo 3- y 4-;
 - 10) n es 2, ambos grupos R³ son flúor y los grupos flúor están en las posiciones fenilo 3- y 4-;
 - 11) n es 2, y los grupos R³ junto con la fracción fenilo a la que están unidos forman 3-cloro-4-fluorofenilo;
 - 12) R⁴ es hidroxilo.
- Debe entenderse que otros compuestos preferentes son aquellos que combinan las selecciones preferentes citadas para un sustituyente dado con selecciones preferentes de otros sustituyentes. Entre los ejemplos de dichas combinaciones se incluyen, pero sin limitarse a ellas, las siguientes clases preferentes de compuestos:
- 13) Compuestos preferentes de uno cualquiera de los párrafos 1-5 (selecciones preferentes para R¹ y R²) en los que n es 2, ambos grupos R³ son flúor, y los grupos flúor están en las posiciones fenilo 3- y 4- (párrafo 10);
 - 14) Compuestos preferentes de uno cualquiera de los párrafos 1-5 (secciones preferentes para R¹ y R²) en los que n es 2, y los grupos R³ junto con la fracción fenilo a la que están unidos forman 3-cloro-4-fluorofenil (párrafo 11);
 - 15) Compuestos preferentes de uno cualquiera de los párrafos 1-5 (secciones preferentes para R¹ y R²) en los que R⁴ es hidroxilo (párrafo 12);
 - 16) Compuestos preferentes de uno cualquiera de los párrafos 13-14 en los que R⁴ es hidroxilo (párrafo 12).

Como compuestos preferentes concretos se pueden mencionar los descritos en los Ejemplos, incluyendo sus bases libres y las sales de los mismos farmacéuticamente aceptables.

Ciertos compuestos aceptables son:

- ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable;
- ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable;
- (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis{[(1-metiletoxi)carbonil]oxi}metilo); o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([[1-metiletoxi]carbonil]oxi) metilo) o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable (es decir, los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 12, 22 y 32, y sales de los mismos farmacéuticamente aceptable alternativas).

5 Las abreviaturas utilizadas en el presente documento se definen del siguiente modo:

- "BSA" significa albúmina de suero bovino.
- "DCG IV" significa (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxiciclopropil)glicina.
- "DMEM" significa Medio de Eagle Mínimo modificado con Dulbecco
- "DMSO" significa sulfóxido de dimetilo.
- 10 "DPBS" significa solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
- "EDTA" significa ácido etilen diamina tetraacético
- "GTP" significa trifosfato de guanosina
- "HBSS" significa solución salina tamponada con Hank
- "HEPES" significa ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfónico
- 15 "HPLC" significa cromatografía de líquidos de alta presión
- "IBMX" significa 3-isobutil-1-metilxantina
- "IC₅₀" significa la concentración a la que se consigue un 50 % de la máxima inhibición
- "i.v." significa intravenoso o por vía intravenosa
- "i.p." significa intraperitoneal
- 20 "L-AP-4" significa ácido L-(+)-2-amino-4-fosfonobutírico
- "CL/EM" significa cromatografía líquida seguida de espectroscopia de masa
- "PNFr" significa prueba de natación forzada con ratones; un modelo animal para determinar la actividad antidepressiva
- "EM" significa espectroscopia de masa
- 25 "EM (iEN+)" significa espectroscopia de masa utilizando ionización por electronebulización
- "RMN" significa resonancia magnética nuclear
- "p.o." significa *per os*, por vía oral
- "tBu" significa una fracción *tert*-butilo

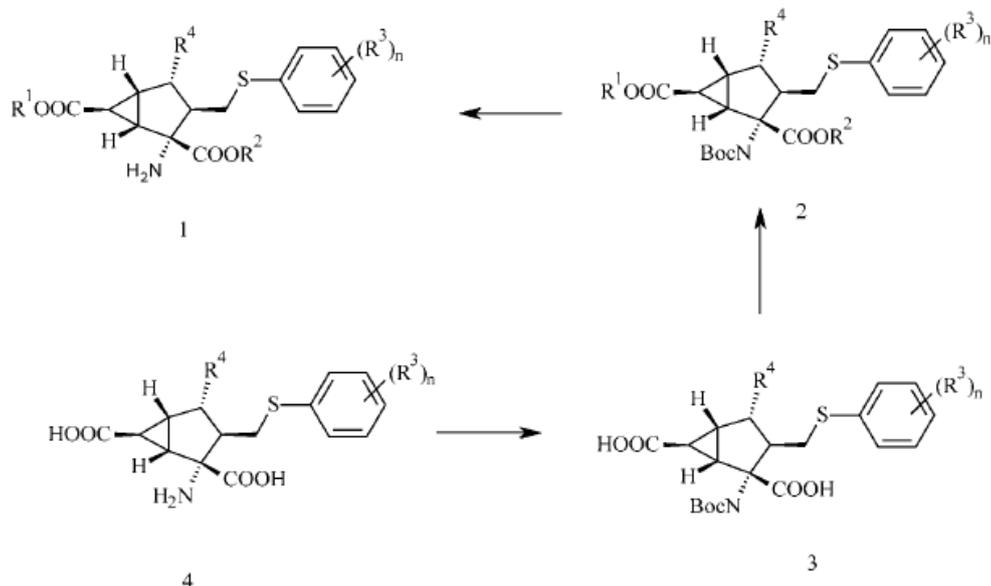
Química general

- 30 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los siguientes esquemas de síntesis a través de procedimientos muy conocidos y reconocidos en la técnica. Las condiciones de reacción adecuadas para las etapas de estos esquemas son muy conocidas en la técnica y las sustituciones de disolventes y co-reactivos adecuadas entran dentro de la destreza en la técnica. Igualmente, las personas especializadas en la técnica podrán apreciar que los productos intermedios de síntesis se pueden aislar y/o purificar a través de diversas técnicas muy conocidas, según sea necesario o se desee y, frecuentemente, será posible utilizar varios productos intermedios directamente en etapas de síntesis subsiguientes con escasa purificación o ninguna en absoluto. Asimismo, las personas especializadas en la técnica apreciarán que en algunas circunstancias, el orden en el que se introducen las fracciones no es crítico. El orden de las etapas en particular necesarias para producir los compuestos de la presente invención depende del compuesto que se vaya a sintetizar en particular, el compuesto de partida y la susceptibilidad de las fracciones sustituidas, tal como podrán apreciar las personas especializadas en química. Todos los sustituyentes, a no ser que se indique de otro modo, son como se han definido, y todos los reactivos son conocidos y reconocidos en la técnica.
- 35
- 40

Se puede preparar el compuesto profármaco 1 tal como se ilustra en el Esquema I, en el que R¹, R², R³, R⁴ y n son como se han definido y R¹ y R² no son ambos hidrógeno.

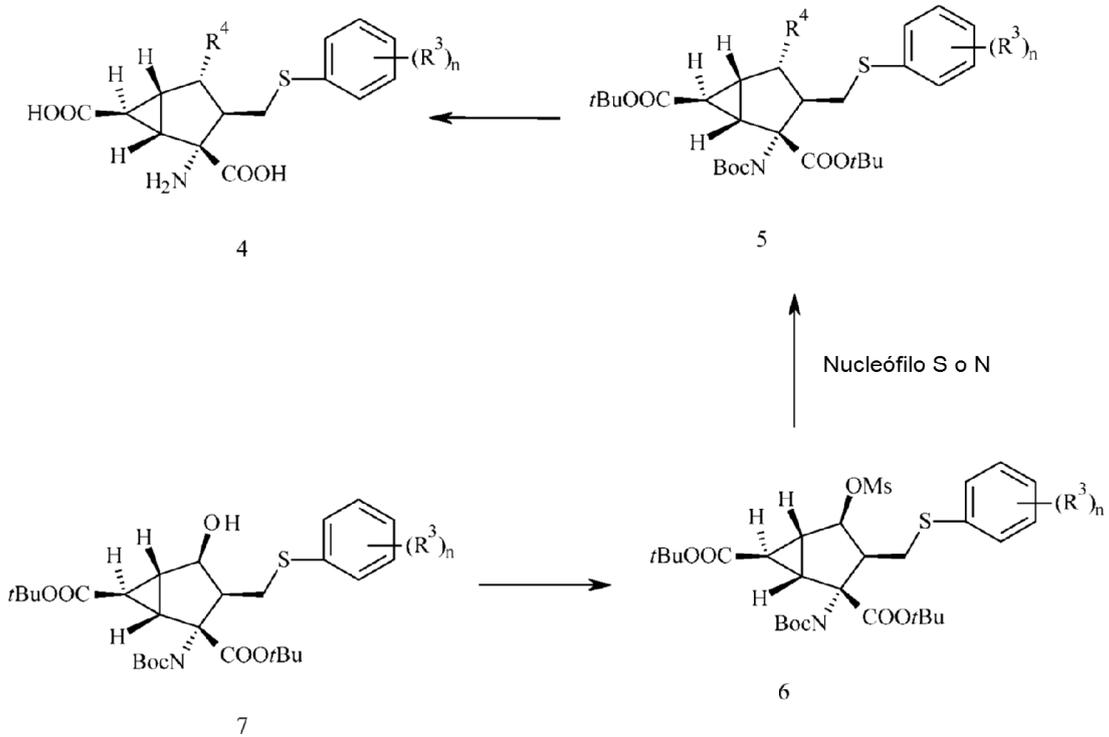
45

Esquema I



Se hace reaccionar el compuesto 4 se hace reaccionar con un reactivo protector del amino como *di-terc*-butildicarbonato en condiciones muy conocidas entre las personas especializadas en la técnica para proporcionar el compuesto 3. Cuando los grupos R^1 y R^2 son idénticos en el compuesto 2, se hace reaccionar el compuesto 3 con una cantidad suficiente alquil carbonato de clorometilo apropiada y reactivos apropiados como yoduro sódico y carbonato de cesio en un disolvente adecuado como dimetilformamida para dar el di-éster compuesto 2 deseado con R^1 y R^2 iguales. Cuando R^1 y R^2 son diferentes en el compuesto 2, controlando la cantidad del primer alquil carbonato de clorometilo a aproximadamente un equivalente, se puede convertir el ácido carboxílico en el anillo de cinco miembros a un mono éster R^2 primero. Se puede hacer reaccionar además el compuesto mono éster R^2 con un equivalente de un alquil carbonato diferente. A continuación, se puede convertir el grupo ácido carboxílico libre en el anillo de tres miembros a un éster R^1 para proporcionar el di-éster deseado con diferentes R^1 y R^2 . Para obtener un mono éster R^2 en el anillo de cinco miembros del compuesto 2, se hace reaccionar el compuesto 3 con aproximadamente un equivalente del alquil carbonato de clorometilo apropiado y reactivos apropiados como yoduro sódico y carbonato de cesio en un disolvente adecuado como dimetilformamida para dar el compuesto 2 mono éster R^2 deseado, en el que R^1 es hidrógeno. Para obtener un mono éster R^1 en el anillo de tres miembros, se debería proteger el grupo ácido carboxílico en el anillo de cinco miembros primero ya que es más reactivo en condiciones básicas. Más específicamente, se puede hacer reaccionar el grupo ácido carboxílico en el anillo de cinco miembros en el compuesto 3 con alfa-cloro-4-metoxitolueno, yoduro sódico y bicarbonato sódico en un disolvente adecuado como dimetilformamida para proporcionar un mono éster 4-metoxibencilo. El grupo ácido carboxílico libre en el anillo de tres miembros del compuesto mono éster 4-metoxibencilo protegido se hace reaccionar entonces con un alquil carbonato de clorometilo apropiado para dar el éster R^1 apropiado en el anillo de tres miembros. Se trata el diéster con un ácido apropiado como ácido trifluoroacético para desproteger el 4-metoxibencilo y el grupo *N-terc*-butoxicarbonilo para dar el compuesto 1 mono éster R^1 deseado, en el que R^2 es hidrógeno. A continuación, se desprotege el compuesto 2, que incluye el mono éster R^2 y el diéster con R^1 y R^2 iguales o diferentes con un ácido apropiado como ácido clorhídrico en dioxano para dar el compuesto 1 deseado o una sal farmacéuticamente aceptable.

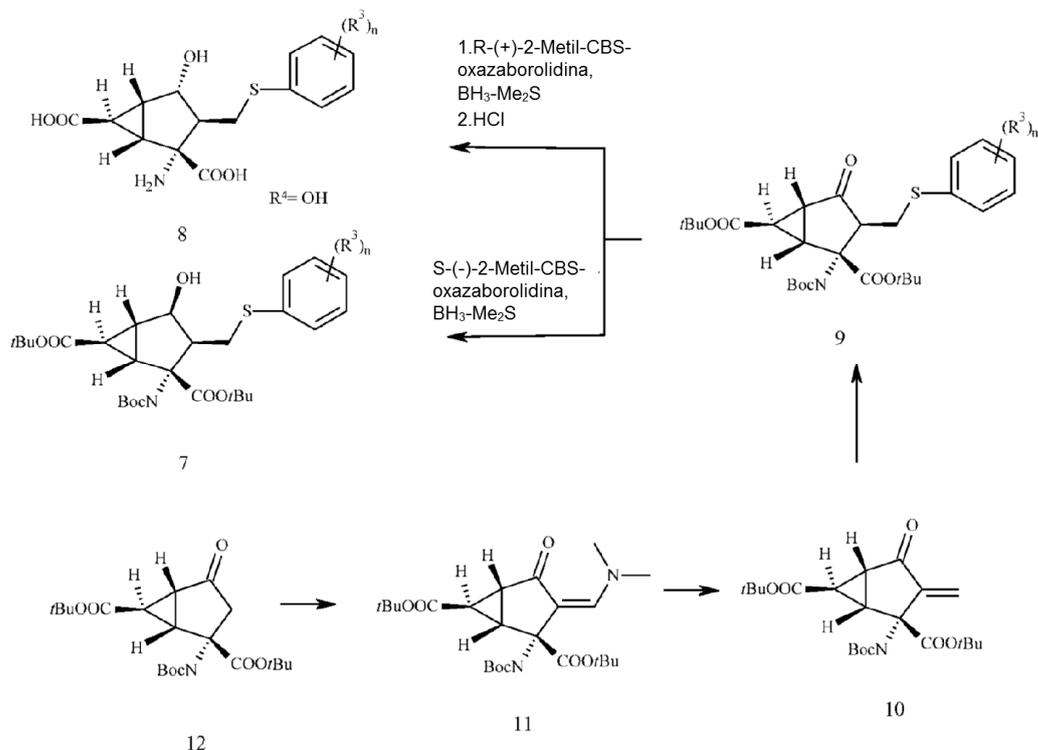
Esquema II



Se puede preparar un compuesto parental activo 4 en el que R^4 no es un grupo hidroxilo tal como se ilustra en el Esquema II.

- 5 Se hace reaccionar el compuesto 7 con cloruro de metanosulfonilo y una base apropiada como piridina para dar el mesilato compuesto 6. Se puede hacer reaccionar el compuesto 6 con heterociclo tior como 1H-1,2,4-triazol-3-tiol y una base adecuada como carbonato de cesio en un disolvente como dimetilformamida para dar el compuesto 5 deseado, en el que R^4 es un heterociclo unido al tior deseado. Se puede hacer reaccionar el compuesto 6 con azida sólida para dar un producto intermedio azida que se reduce a continuación con un reactivo de reducción como 1,3-propaneditiol en un disolvente adecuado como metanol para proporcionar el compuesto 5 en el que R^4 es un grupo amino. La amina resultante puede formar posteriormente una amida a través de los procedimientos conocidos entre las personas especializadas para dar el compuesto 5, en el que R^4 es la amida deseada. A continuación, se desprotege el compuesto 5 con el ácido apropiado, como ácido clorhídrico o ácido acético para dar el compuesto 4.
- 10

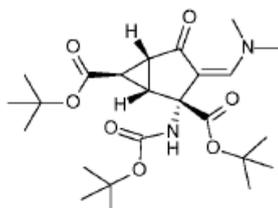
Esquema III



Se puede preparar el compuesto parental activo 8 en el que R⁴ es un grupo hidroxilo y el compuesto intermedio clave, compuesto 7 en el que R⁴ es un grupo distinto a un grupo hidroxilo, tal como se ilustra en el Esquema III.

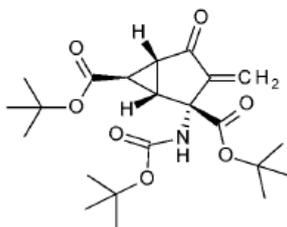
- 5 Se hace reaccionar el compuesto 12 (véase el documento WO03/104217/A2 para los detalles de la síntesis) con *tert*-butoxibis(dimetilamino)metano en tolueno para proporcionar el compuesto 11. Se trata el compuesto 11 en un disolvente adecuado como tetrahidrofurano con una base apropiada como trietilamina y un reactivo de reducción apropiado como hidruro de diisobutilaluminio a menor temperatura para dar el compuesto 10. A continuación, se hace reaccionar el compuesto 10 con trietilamina y un bencenotiol apropiadamente sustituido, como 3,4-difluorobencenotiol en un disolvente adecuado como tolueno para dar el compuesto 9. Se puede reducir selectivamente el grupo cetona del compuesto 9 para dar el compuesto (S) hidroxilo o (R) hidroxilo deseado utilizando (R)-metil oxazaborolidina o (S)-metil oxazaborolidina, respectivamente. Se desprotege el producto intermedio (S) hidroxilo con un ácido apropiado como ácido clorhídrico en un disolvente como dioxano para proporcionar el compuesto parental activo 8 deseado en el que R⁴ es un grupo (S) hidroxilo. El producto intermedio 7 (R) hidroxilo se puede convertir al producto deseado a través del procedimiento ilustrado en el Esquema II.
- 10
- 15

Preparación 1: (1S,2R,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-(dimetilaminometil)-4-oxo-biciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



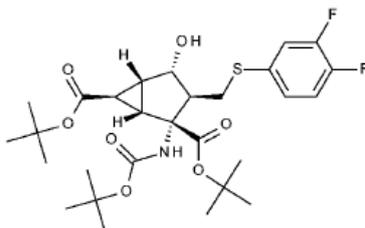
- 20 Se añade a una solución de (1S,2S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-oxobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (15,15 g, 36,82 mmoles, Véase el documento WO03/104217/A2 para los detalles de la síntesis) en tolueno (90,90 ml) *tert*-butoxibis(dimetilamino)metano (12,83 g, 73,63 mmoles). A continuación, se calienta esta mezcla a 80 °C durante 1 hora y, a continuación, se deja enfriar a temperatura ambiente. Se reduce el volumen del disolvente a aproximadamente 35 ml. Se agita la mezcla con éter dietílico y hexano para hacer que se forme el precipitado. Se recogen los sólidos por filtración, se lavan con hexanos y se secan al aire para obtener el compuesto del título (16,7 g, 35,79 mmoles, 97,2 % de rendimiento). EM (m/z): 467,2 (M+H).
- 25

Preparación 2: (1S,2R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-metiliden-4-oxobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



Se añade a una solución de (1S,2R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-(dimetilaminometileno)-4-oxobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (15,7 g, 33,8 mmoles) en tetrahidrofurano (340 ml) trietilamina (6,6 ml, 47,32 mmoles). Se enfría la mezcla a -78 °C. Se añade hidruro de diisobutilaluminio (1N en tolueno, 50 ml, 50 mmoles) durante una hora. Se agita la mezcla durante dos horas más. A continuación, se añaden 30 ml de cloruro de amonio saturado acuoso. Se deja templar la mezcla a temperatura ambiente. Se transfiere la mezcla a un embudo de separación y se lava con salmuera. Se seca la capa orgánica sobre MgSO₄, se filtra y se concentra a presión reducida para dar un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía ultrarrápida (de 0 a 50 % de acetato de etilo/hexanos) para dar el compuesto del título (12 g, 33,34 mmoles, 83,8 % rendimiento). EM (m/z): 422 (M-H).

Preparación 3: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[3-(4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxibicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo

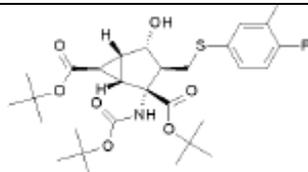
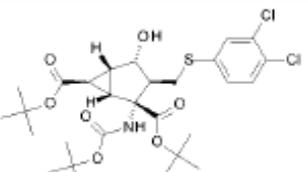
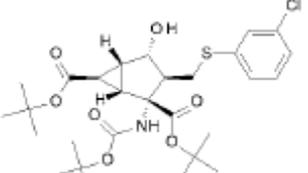
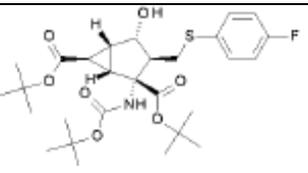
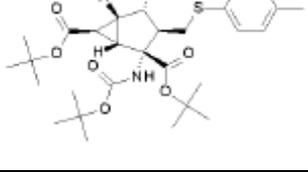


Se introducen burbujas de gas nitrógeno en (1S,2R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-metilideno-4-oxobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (1,03 g, 2,43 mmoles) en éter dietílico (100 ml) durante 10 minutos. Se añaden 3,4-difluorobencenotiol (0,36 g, 2,43 mmoles) y trietilamina (0,01 ml, 0,05 μmoles). Se templar la mezcla a 40 °C y se agita durante 15 minutos. A continuación se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se transfiere a un embudo de separación, se diluye con hexano (40 ml), se lava con KOH acuoso 2N (1 x 30 ml), se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra a presión reducida para dar (1S,2R,3S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[3-(4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-oxobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (1,35 g, 2,37 mmoles): EM (m/z): 567,8 (M-H). Se absorbe todo este material en 120 ml de éter dietílico y se añade lentamente durante 2 horas a una solución de éter de 200 ml a -10°C que contiene R-(+)-2-metil-CBS-oxazaborolidina (981,72 mg, 3,54 mmoles) y complejo de borano-sulfuro de metilo (2M en tetrahidrofurano, 5,02 ml, 10,04 mmoles). Se agita la mezcla durante una hora más tras la adición final de (1S,2R,3S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[3-(4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-oxobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo. Se añade gel de sílice (30 g) durante 30 minutos y se templar gradualmente la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se filtra la suspensión y se lava con 300 ml de éter dietílico. Se concentra el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con (de 0 a 15 % acetato de etilo/hexanos) para dar el compuesto del título (0,844 g, 1,48 mmoles, 60,7 % rendimiento): EM (m/z): 569,8 (M-H).

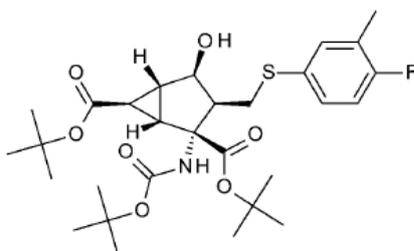
Se preparan los siguientes compuestos esencialmente siguiendo el procedimiento de Preparación 3:

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
4	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino]-3-[[3-(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxibicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di- <i>tert</i> -butilo		84,0	(M+H): 585,8

(continuación)

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
5	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanilmetil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di- <i>tert</i> -butilo		73,5	(M+Na): 590,0
6	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-diclorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di- <i>tert</i> -butilo		75,2	(M+Na): 625,8
7	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3-clorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di- <i>tert</i> -butilo		82,6	(M-H): 567,8
8	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di- <i>tert</i> -butilo		50,3	(M+Na): 576,0
9	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-3-(<i>p</i> -tolilsulfanilmetil)biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di- <i>tert</i> -butilo		77,0	(M+Na): 572,2

Preparación 10: (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



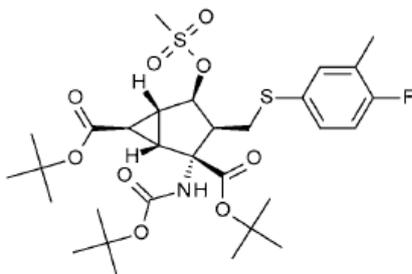
5

10

Se introducen burbujas de gas nitrógeno en (1S,2R,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-metileno-4-oxobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (8 g, 18,9 mmoles) en éter dietílico (80 ml) durante 10 minutos. Se añaden 4-fluoro-3-metil-bencenotiol (2,7 g, 18,9 mmoles) y trietilamina (0,26 ml, 1,89 mmoles). Se templata la mezcla a 40 °C y se agita durante 15 minutos. A continuación se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se transfiere a un embudo de adición y se añade lentamente durante 2 horas a una solución de 200 ml de éter a -10 °C que contiene S-(-)-2-metil-CBS-oxazaborolidina (1M en tetrahidrofurano) (5,67 ml, 5,67 mmoles) y complejo de borano-sulfuro de metilo (2M en tetrahidrofurano, 8,5 ml, 17 mmoles). Se agita la mezcla durante una hora más tras

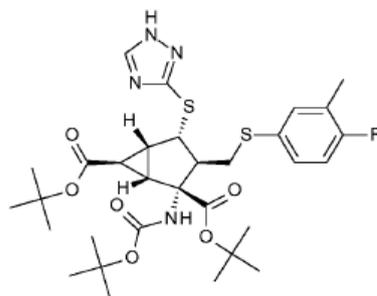
la adición final. Se añade gel de sílice (40 g) durante 30 minutos y se temple gradualmente la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se filtra la suspensión y se lava con 300 ml de éter dietílico. Se concentra el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía ultrarrápida, eluyendo (de 0 a 25 % acetato de etilo /hexanos) para dar el compuesto del título (9,8 g, 17,3 mmoles, 91,5% rendimiento). EM (m/z): 565,8 (M-H).

Preparación 11: (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-metil sulfoniloxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



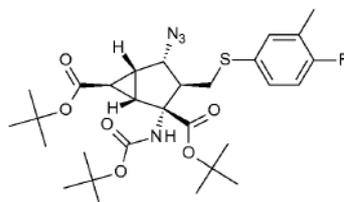
Se enfría (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo [3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (4,6 g, 8,10 mmoles) en piridina (60 ml) a 0 °C. Se añade a esta mezcla cloruro de metanosulfonilo (1,88 ml, 24,31 mmoles). Se temple la mezcla a 40 °C y se agita durante 1 hora y se enfría a temperatura ambiente y se deja en agitación durante 18 horas. Se concentra la mezcla a presión reducida para dar un residuo. Se reparte el residuo entre acetato de etilo y HCl 1N acuoso (2 x 50 ml). Se separa la capa orgánica, se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra a presión reducida para dar el compuesto del título (5,2 g, 8,05 mmoles, 99,4 % rendimiento): EM (m/z): 643,6 (M-H).

Preparación 12: (1R,2R,3R,4S,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



Se disuelve (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-metil sulfoniloxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (5,3 g, 8,21 mmoles) en dimetilformamida (100 ml). Se añade a esta mezcla carbonato de cesio (5,40 g, 16,41 mmoles), 1H-1,2,4-triazol-3-tiol (3,42 g, 32,83 mmoles) y triacetoxiborohidruro de sodio (906 mg, 4,10 mmoles). Se agita la mezcla a 40 °C durante 72 horas. Se enfría la reacción y se apaga con agua y NH₄Cl acuoso. Se transfiere la mezcla a un embudo de separación y se extrae con éter dietílico, se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra a presión reducida para dar un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía ultrarrápida (de 0 a 50 % acetato de etilo/hexanos) para dar el compuesto del título (0,88 g, 1,35 mmoles, 16,5 % rendimiento). EM (m/z): 651 (M+H).

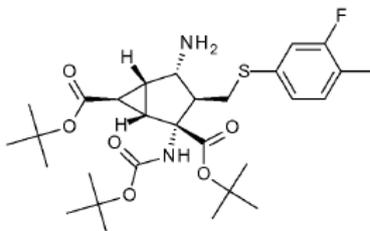
Preparación 13: (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-azido-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil] biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



Se disuelve (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-metilsulfoniloxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (5,9 g, 9,14 mmoles) en sulfóxido de dimetilo (30 ml). Se añade a esta mezcla azida sódica (2,5 g, 38,37 mmoles). Se agita la mezcla a 100 °C durante 18 horas. Se elimina el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se suspende el residuo en éter dietílico (100 ml) y

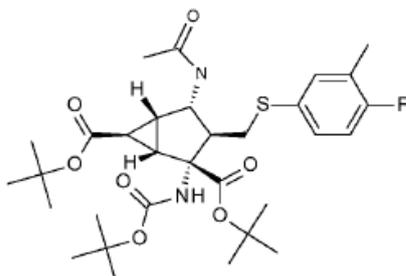
se filtra. Se transfiere la capa orgánica a un embudo separador y se lava con agua y salmuera, se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra a presión reducida para dar un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía ultrarrápida (de 0 a 15 % acetato de etilo/hexanos) para dar el compuesto del título (3,14 g, 5,30 mmoles, 58 % rendimiento). EM (m/z): 591 (M-H).

- 5 Preparación 14: (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-amino-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanilmetil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



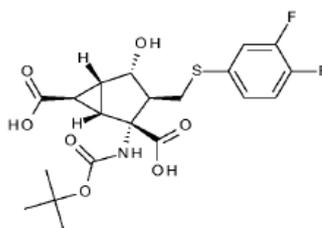
- 10 Se disuelve (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-amino-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (1,88 g, 3,17 mmoles) en metanol (1,86 ml). Se añade a esta mezcla trietilamina (1,77 ml, 12,7 mmoles) y 1,3-propaneditiol (1,28 ml, 12,69 mmoles). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. Se vierte la mezcla en agua y se extrae con acetato de etilo, se seca sobre sulfato sódico, se filtra y se concentra a presión reducida para dar un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía ultrarrápida (de 50 a 100 % acetato de etilo/hexanos) para dar el compuesto del título (1,2 g, 2,12 mmoles, 66,76% rendimiento). EM (m/z): 567,2 (M+1).

- 15 Preparación 15: (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-acetamido-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanilmetil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



- 20 Se disuelve (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-amino-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (0,15 g, 264,67 μ moles) en diclorometano (10 ml). Se añade a esta mezcla trietilamina (55,34 μ l, 397,01 μ moles) y cloruro de acetilo (28,25 μ l, 397,01 μ moles). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se elimina el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía ultrarrápida (de 10 % a 100 % acetato de etilo/ hexanos) para dar el compuesto del título (100 mg, 164,27 μ moles, 62,06 % rendimiento); ^1H RMN (CD_3Cl) δ 1,44 (t, 27H), 1,95 (s, 3H), 2,16 (m, 1H), 2,22 (s, 3H), 2,60 (dd, 1H), 2,78 (bs, 1H), 3,10 (dd, 1H), 4,59 (m, 1H), 5,50 (d, 1H), 6,92 (t, 1H), 7,06 (m, 1H), 7,11 (d, 1H).

- 25 Preparación 16: ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico



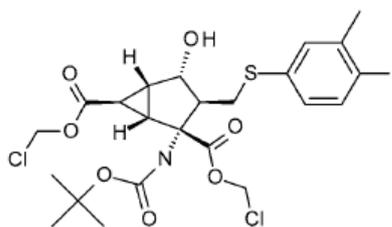
- 30 Se pesa (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (4,11 g, 7,19 mmoles) en un matraz de fondo redondo de 1 litro con barra de agitación. Se añade cloruro de hidrógeno (4N en dioxano, 120 ml, 480,0 mmoles). Se temple la mezcla a 70 °C durante 2 horas y a continuación se deja enfriar a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se disuelve el residuo en diclorometano (200 ml) y se elimina el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se repite la misma operación dos veces más para dar hidrocloreto de ácido

(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico. Se extrae este material en tetrahidrofurano (100 ml) como una suspensión. Se añade a esta suspensión trietilamina (40,08 ml, 287,57 mmoles). Se agita la suspensión durante 10 minutos y, a continuación, se añade metanol (50 ml). Se añade a la reacción di-t-butildicarbonato (4,71 g, 21,57 mmoles) y se calienta la mezcla a 80 °C durante 2 horas. Se deja que la mezcla alcance la temperatura ambiente y se elimina el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se disuelve el residuo en acetonitrilo (50 ml), se transfiere a un embudo de separación y se lava con hexanos. Se separa la capa de acetonitrilo y se elimina a presión reducida para dar a residuo. Se suspende el residuo en éter dietílico, se transfiere a un embudo de separación, se lava con HCl 1N acuoso, se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra a presión reducida para dar el compuesto del título (3 g, 6,53 mmoles, 90,82 % rendimiento). EM (m/z): 457,8 (M-H).

Se preparan los siguientes compuestos esencialmente según el procedimiento de preparación 16:

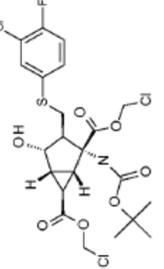
Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
17	Ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxiciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico		76,2	(M+H): 476,0
18	Ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanilmetil]-4-hidroxiciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico		94,6	(M-H): 453,8
19	Ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-dimetilfenil)sulfanilmetil]-4-hidroxiciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico		92,3	(M+H): 450,2
20	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3-clorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di- <i>tert</i> -butilo		95,6	(M-H): 440,0

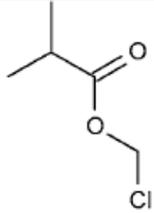
Preparación 21: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil) sulfanil metil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(clorometilo)



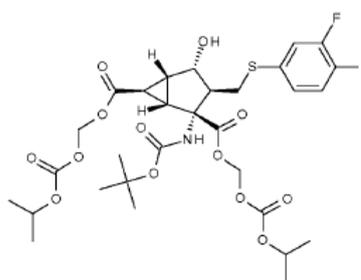
- 5 Se añade a una mezcla en agitación de ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (2,4 g, 5,27 mmoles), bisulfato de tetra(n-butil)amonio (178,90 mg, 526,89 μ moles), y bicarbonato sódico (3,54 g, 42,15 mmoles) en diclorometano (13,2 ml) y agua (13,2 ml) clorosulfato de clorometilo (1,20 ml, 11,59 mmoles). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. Se vierte la reacción sobre agua y se extrae con diclorometano. Se seca la fase orgánica combinada sobre sulfato de magnesio y se concentra para dar un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía ultrarrápida (20-35 % acetato de etilo/hexano) para dar el compuesto del título (1,37g, 2,48 mmoles, 47 % rendimiento). EM (m/z): 574,0 (M+Na).
- 10

Se preparan los siguientes compuestos esencialmente siguiendo el procedimiento de Preparación 21:

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z) RMIN (M+Na): 593,97
22	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxilato de (Bis(clorometilo))		31,2	

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
23	2-metilpropanoato de clorometilo		95,8	$^1\text{H RMN (CD}_3\text{Cl) } \delta$ 1,17 (d, 6H), 2,58 (m, 1H), 2,48 (d, 1H), 5,67 (s, 2H)

Preparación 24: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-1 [(3,4-difluorofenil) sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(1-metiletoxi)carbonil]oxi]metilo)



5

Se añade carbonato potásico (668,43 mg, 4,79 mmoles), yoduro sódico (75,03 mg, 500,58 μ moles) a ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (1 g, 2,18 mmoles) en dimetilformamida (13,06 ml). Se agita la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añade isopropil carbonato de clorometilo (1 g, 6,53 mmoles). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añade ácido acético (4 ml) y se agita la mezcla durante 10 minutos. Se reduce el volumen de disolvente a aproximadamente 10 ml a presión reducida para dar un residuo viscoso. Se diluye el residuo con éter dietílico y se agita durante 10 minutos. Se pasa la solución a través de un filtro y se elimina el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se deja en condiciones de alto vacío el residuo durante 1 hora. Se purifica el residuo por cromatografía ultrarrápida, se eluye con (de 0 a 35 % tetrahidrofurano /hexanos) para dar el compuesto del título (0,88 g, 1,27 mmoles, 58,5% rendimiento). EM (m/z): 714,2 (M+Na).

15

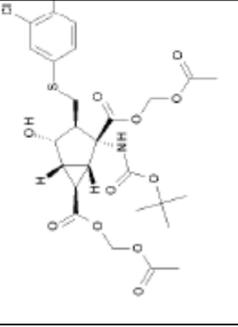
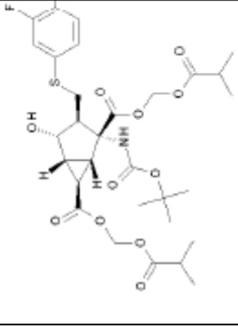
Se prepararon los siguientes compuestos esencialmente según el procedimiento de preparación 24:

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
25	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(sopropoxycarboniloximetilo)		52,9	(M+Na): 730,2
26	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(sopropoxycarboniloximetilo)		35,8	(M+Na): 709,8
27	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(etoxicarboniloximetilo)		62,7	(M+Na): 686,2
28	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(etoxicarboniloximetilo)		44,9	(M+Na): 702,2

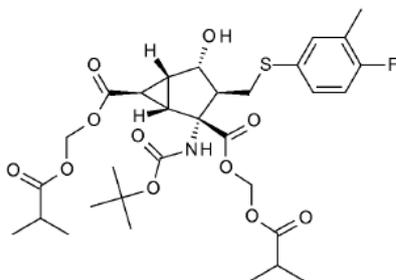
(continuación)

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
29	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(etoxicarboniloximetilo)		39,7	(M+Na): 682,0
30	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-dimetilfenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(etoxicarboniloximetilo)		31,4	(M+Na): 677,8
31	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(etoxicarboniloximetilo)		62,4	(M+Na): 668,2
32	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(acetoximetilo)		60,3	(M+Na): 622,00

(continuación)

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
33	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(acetoximetilo)		51,2	(M+Na): 642,00
34	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(2-metilpropanoiloximetilo)		29,5	(M+Na): 682,00

Preparación 35: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[4-(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanil]metil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[2-(2-metilpropanoil)oxi]metilo]



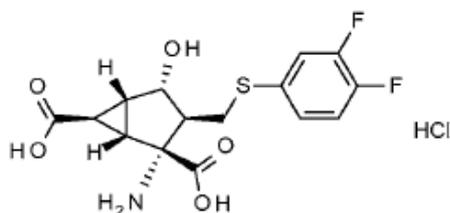
- 5 Se disuelve ácido isobutírico (0,21 g, 2,42 mmoles) en dimetilformamida (10 ml). Se añade a esta solución carbonato potásico (0,54 g, 3,87 mmoles). Se agita la mezcla a 50 °C durante 3 horas y, a continuación, se enfría a temperatura ambiente. Se añade a la mezcla (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[[4-(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanil]metil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de (clorometilo) (535 mg, 0,97 mmoles). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. Se diluye la mezcla con acetato de etilo, se transfiere a un embudo de separación, se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de magnesio y se concentra a presión reducida para dar un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía ultrarrápida (10-40 % acetato de etilo/hexanos) para dar el compuesto del título (230 mg, 0,36 mmoles, 37 %). EM (m/z): 678,2 (M+Na).
- 10

Se preparan los siguientes compuestos esencialmente a través del procedimiento de preparación 35:

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
36	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3-cloro-4-fluoro-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-di-carboxilato de bis(2-metilpropanoil oximetilo)		37,0	(M+Na): 698,0
37	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-di-carboxilato de bis[(2S)-2-metilbutanoil]oximetilo]		52,0	(M+Na): 706,2
38	1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-di-carboxilato de bis(2-etilbutanoil oximetilo)		30,2	(M+Na): 733,8
39	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-di-carboxilato de bis (3-metilbutanoil oximetilo)		29,1	(M+Na): 706,2

(continuación)

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
40	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(ciclopropanecarboniloximetilo)		40,6	(M+Na): 674,0
41	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(ciclopentane carboniloximetilo)		51,8	(M+Na): 730,2
42	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(4-fluoro-3-metil-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(propanoiloximetilo)		19,8	(M+Na): 650,0
43	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(<i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-3-[(3-cloro-4-fluoro-fenil)sulfanilmetil]-4-hidroxi-biciclo [3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(propanoiloximetilo)		28,0	(M+Na): 670,0

Ejemplo 1: Hidrocloruro de ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-Amino-3-[[3,4-difluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo [3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico

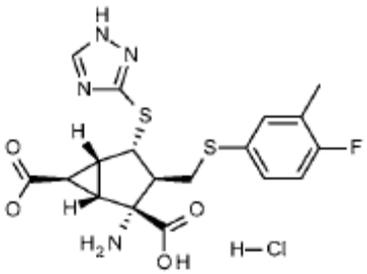
5 Se pesa (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[3,4-difluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo [3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (0,58 g, 7,19 mmoles) en un matraz de fondo redondo de 100 ml con una barra de agitación. Se añade cloruro de hidrógeno (4N en dioxano, 33 ml, 132,0 mmoles). Se temple la mezcla a 70°C durante 2 horas y, a continuación, se deja enfriar a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se disuelve el residuo en diclorometano (50 ml) y se elimina el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se realiza esta misma operación tres veces más para dar el compuesto del título (567 mg, 1,43 mmoles, 97 % rendimiento). EM (m/z): 360,0 (M+1).

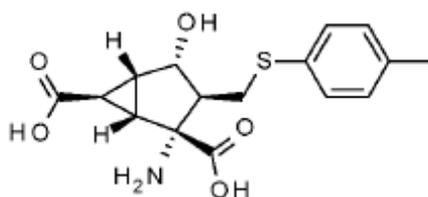
10

Se preparan los siguientes compuestos esencialmente a través del procedimiento del Ejemplo 1:

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
2	Hidrocloruro de ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-Amino-3-[[3-cloro-4-fluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo [3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico		57,1	(M+H): 376,0
3	Hidrocloruro de ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-Amino-3-[[4-fluoro-3-metilfenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo [3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico		93,4	(M+H): 356,0
4	Hidrocloruro de ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[3,4-diclorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico		101,4	(M+H): 392,0
5	Hidrocloruro de ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-Amino-3-[[3-clorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico		82,6	(M+H): 358,0
6	Hidrocloruro de ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-Amino-3-[[4-fluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxílico		110,4	(M+H): 341,8

(continuación)

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
7	Hidrocloreto de ácido (1R,2R,3R,4S,5R,6R)-2-Amino-3-[[[(4-fluoro-3-metilfenil) sulfanil] metil]-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico		93,0	(M+H): 438,8

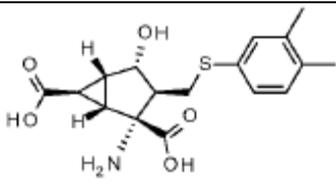
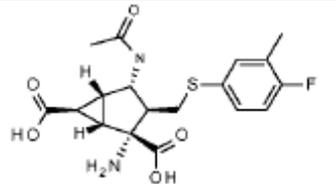
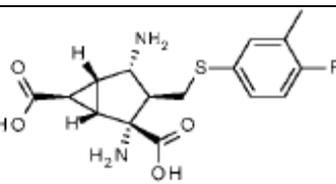
Ejemplo 8: ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-Amino-4-hidroxi-3-[[[(4-metilfenil)sulfanil]metil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico

5

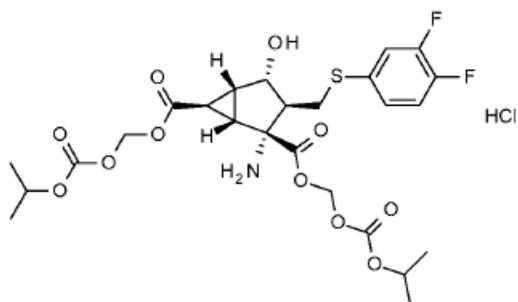
Se coloca (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxi-3-(*p*-tolilsulfanilmetil)biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (300 mg, 545,73 μ moles) en un vial microondas. Se añade agua al vial (2 ml, 110 μ moles) y ácido acético (2 ml, 34,9 μ moles). Se calienta la mezcla en el microondas a 140 °C durante 20 minutos. Se elimina el disolvente a presión reducida para dar el compuesto del título (165 mg, 489,04 μ moles, 89,6 %). EM (m/z): 338,0 (M+H).

10

Se preparan los siguientes compuestos esencialmente a través del procedimiento del Ejemplo 8:

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
9	Ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-Amino-3-[[[(3,4-dimetilfenil) sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo [3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico		96,3	(M+H): 352,0
10	Ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-(Acetilamino)-2-amino-3-[[[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanil]metil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico		93,2	(M+H): 397,0
11	Ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-2,4-Diamino-3-[[[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanil]metil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico		84,6	(M+H): 355,2

Ejemplo 12: hidrocloreto de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[[[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis({[(1-metiletoxi)carbonil]oxi}metilo)



5 Se disuelve (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo
 [3.1.0] hexano -2,6-dicarboxilato de bis({[(1-metiletoxi)carbonil]oxi}metilo) (0,88 g, 1,27 mmoles) en cloruro de
 hidrógeno (4N en dioxano, 30 ml, 120,00 mmoles) y se agita a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se elimina
 el disolvente a presión reducida para dar un residuo. Se disuelve el residuo en diclorometano y se elimina el
 disolvente a presión reducida. Se repite el procedimiento 8 veces. Se deja el residuo en condiciones de alto vacío
 10 durante toda la noche para dar el compuesto del título (0,692 g, 1,10 mmoles, 86,61 % rendimiento). EM (m/z): 591,8
 (M+H).

Se preparan los siguientes compuestos esencialmente a través del procedimiento del Ejemplo 12:

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
13	Hidrocloreto de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[4-fluoro-3-metilfenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[2-metilpropanoil]oxil]metilo]		90,8	(M+H): 555,8
14	Hidrocloreto de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[3-cloro-4-fluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[2-metilpropanoil]oxil]metilo]		95,5	(M+H): 575,8
15	Hidrocloreto de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[4-fluoro-3-metilfenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[propanoil]oxil]metilo]		93,3	(M+H): 528,0
16	Hidrocloreto de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[3-cloro-4-fluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[propanoil]oxil]metilo]		55,5	(M+H): 548,0
17	Hidrocloreto de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[4-fluoro-3-metilfenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de 6-[[[(2S)-2-metilbutanoil]oxil]metil] 2-[[[(2S)-2-metilbutanoil]oxil]metilo]		68,2	(M+H): 584,0

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
18	(continuación) Hidrocloruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[4-fluoro-3-metilfenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[ciclopropilcarbonil]oxil]metilo]}		71	(M+H): 608,2
19	Hidrocloruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[3,4-dimetilfenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[etoxicarbonil]oxil]metilo]}		79,4	(M+H): 556,2
20	Hidrocloruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[3,4-difluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[2-metilpropanoil]oxil]metilo]}		89,7	(M+H): 560,2
21	Hidrocloruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[4-fluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[etoxicarbonil]oxil]metilo]}		89,5	(M+H): 546,2

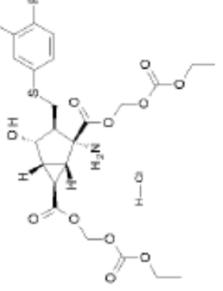
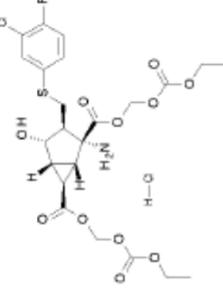
(continuación)

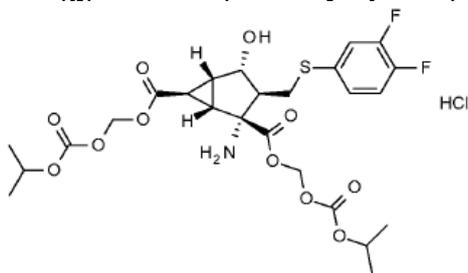
Ej. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
22	Hidrodoruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([(1-metiletóxi)carbonil]oxi]metil)		100	(M+H): 607,8
23	Hidrodoruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([(1-metiletóxi)carbonil]oxi]metil)		101,5	(M+H): 587,8
24	Hidrodoruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([(2-etilbutanoil]oxi]metil)		36,5	(M+H): 612,0
25	Hidrodoruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([(3-metilbutanoil]oxi]metil)		36,1	(M+H): 584,2

(continuación)

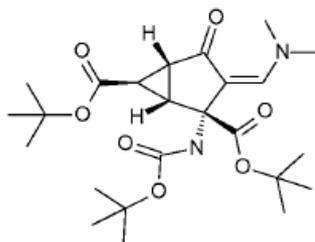
Ej. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
26	Hidrocloruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[(acetiloxi)metilo]		84,6	(M+H): 500,0
27	Hidrocloruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[(acetiloxi)metilo]		94,7	(M+H): 520,0
28	Hidrocloruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(4-fluoro-3-metilfenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[(ciclopropilcarbonil)oxi]metilo]		79,2	(M+H): 552,2
29	Hidrocloruro de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[(etoxi carbonil)oxi]metilo]		96,2	(M+H): 564,2

(continuación)

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
30	Hidrocloreto de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[4-fluoro-3-metilfenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[etoxicarbonil]oxil]metil]o]		96,2	(M+H): 560,2
31	Hidrocloreto de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[3-cloro-4-fluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[etoxicarbonil]oxil]metil]o]		95,1	(M+H): 560,0

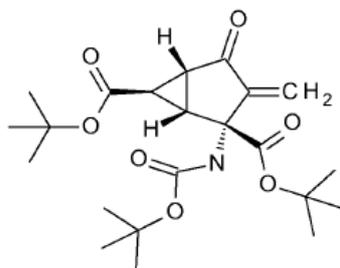
Ejemplo 32: hidrocloreto de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[[[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis({[(1-metiletoxi)carbonil]oxi}metilo)

5 ETAPA 1: (1S,2R,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-(dimetilaminometilene)-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



10 Se añade *tert*-butoxibis(dimetilamino)metano (481,1ml, 2,33 moles) a una suspensión de (1S,2S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-oxobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (600 g, 1,46 moles) en tolueno seco (3,6 l) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se calienta la mezcla a 80 °C durante 3 horas y 45 minutos, a continuación, se enfría a temperatura ambiente y se agita durante toda la noche. Se reduce el volumen de reacción al vacío, se diluye con éter metil *tert*-butílico (1,8 l) y hexano (1,8 l) y se agita durante 3 horas a 15 °C. Al cabo de 3 horas, se recoge el sólido resultante por filtración, se lava con hexano frío (2 x 1,8 l) y se seca al vacío para obtener el compuesto del título (620,4 g, rendimiento 91 %). HPLC EM: 98 %.

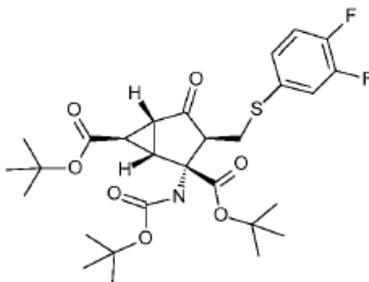
15 ETAPA 2: (1S,2R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-metilidene-4-oxobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



20 Se añade a una solución de (1S,2R,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-(dimetilaminometilene)-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (620,4 g, 1,33 moles) en tetrahidrofurano seco (12 l), trietilamina (277,3 ml, 1,99 moles) a temperatura ambiente, bajo nitrógeno. Se enfría la mezcla a -47 °C y se añade gota a gota hidruro de diisobutilaluminio (1 M en hexano, 2,06 l, 2,06 moles) durante 2 horas. Se agita la mezcla resultante a -47 °C. Al cabo de 1 hora 15 minutos, se añade gota a gota ácido acético (118 ml, 2,06 moles) a -47°C, se temple a temperatura ambiente y después se agita durante toda la noche. Se añade H₃PO₄ al 20 % en agua hasta un pH = 2. Se separa la fase orgánica y se extrae la fase acuosa con acetato de etilo (2 x 1,7 l). Se lavan las fases orgánicas combinadas sucesivamente con HCl acuoso al 10 % (1,5 l), agua (1,5 l) y salmuera (1,5 l), se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra para producir un sólido. Se tritura el sólido resultante con agua (3,2 l), se recoge por filtración y después se seca para producir el compuesto del título (558,2 g, rendimiento 99 %). HPLC EM: 97,4 %.

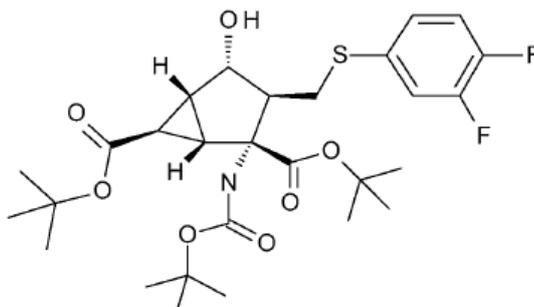
25

ETAPA 3: (1S,2R,3S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[3,4-difluorofenil]sulfanil]metil]-4-oxobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



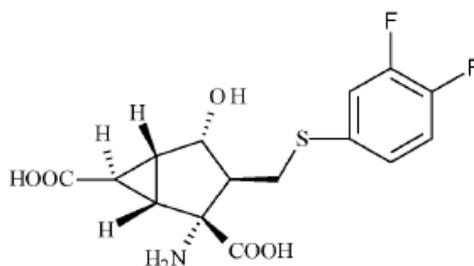
5 Se trata una suspensión de (1S,2R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-metilidene-4-oxobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (350,00 g, 826,43 mmoles) en tolueno (2,95 l) con 3,4-difluorobencenotiol (172,49 g, 1,18 moles) y trietilamina (205,61 ml, 149,28 g, 1,48 moles) a 25 °C. Se agita la mezcla a 80 °C. Al cabo de 12 horas, se enfría la reacción a temperatura ambiente, se lava secuencialmente con NaOH 2N acuoso (pH = 10) y HCl 1N acuoso (pH=4), se seca sobre MgSO₄ y se concentra al vacío para producir un residuo. Se tritura el residuo con hexano (1l) y se elimina el disolvente para producir el compuesto del título (664 g, 100 % rendimiento).

10 **ETAPA 4:** (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[3,4-difluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



15 Se enfría una solución de (R)-metil oxazaborolidina 1N en tolueno (228,21 ml) y complejo borano-sulfuro de metilo (86,68 g, 101,98 ml, 1,14 moles) en éster metil *t*-butílico anhidro (4,56 l) a -40 °C. Se añade a esta solución, (1S,2R,3S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[3,4-difluorofenil]sulfanil]metil]-4-oxobiciclo[3.1.0] hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (650,00 g, 1,14 moles) en éster metil *t*-butílico (3,42 l) a través de un embudo de adición durante 2 horas tras lo cual se templata la reacción a 0 °C. Al cabo de 1 hora, se añade metanol (461,80 ml, 11,41 moles) y se mantiene la temperatura interna por debajo de 15 °C. Se lava la reacción con NaOH acuoso 2N (2 l), se seca sobre MgSO₄ y se concentra al vacío para producir un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (8:1 a 1:1 hexano/acetato de etilo) para producir el compuesto del título (580 g, 89 % rendimiento).

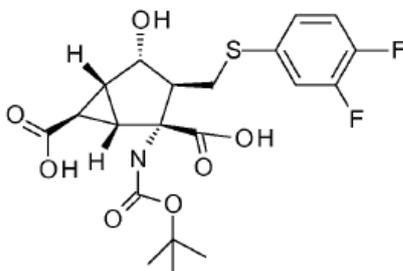
ETAPA 5: ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-Amino-3-[[3,4-difluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



25 Se añade agua (1,10 l) y cloruro de hidrógeno 12,18 M en agua (789,88 ml, 9,62 moles) a una solución de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[3,4-difluorofenil]sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (550,00 g, 962,07 mmoles) en 1,4-dioxano (192,41 ml). Se agita la suspensión espesa resultante a 100 °C. Al cabo de 12 horas, se enfría la reacción a 25 °C, se agita durante 12 horas y, a continuación, se alcaliniza con NaOH (50 % p/p) a un pH = 2,65. Se agita la mezcla resultante a 10 °C durante 30 minutos tras lo cual se recoge el precipitado por filtración, se lava con agua (1 l) y éster metil *tert*-butílico (1 l) y se seca durante 2 horas a 25 °C y, a continuación, a 60 °C en un horno hasta un peso constante para producir el compuesto del título (300 g, 87 % rendimiento). EM (m/z): 360 (M+1).

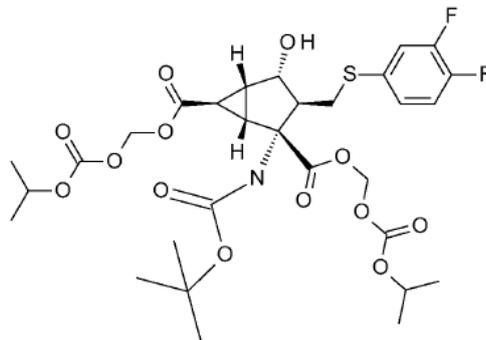
30

ETAPA 6: ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



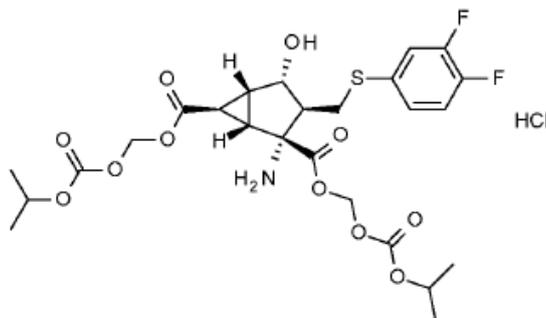
- 5 Se añaden trietilamina (407,27ml, 2,92 moles) y [2-(*tert*-butoxicarboniloxiimino)-2-fenilacetronitrilo] (308,39 g, 1,25 moles) a una suspensión de ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (300,00 g, 834,84 mmoles) en 1,4-dioxano (500,9 ml) y agua (500,9 ml) a 25 °C. Se calienta la mezcla a 50 °C. Al cabo de 12 horas, se enfría la reacción a 25 °C, se diluye con agua (2,5 l), y se lava con éter metil *tert*-butílico (6 x 1 l). Se alcaliniza la fase acuosa con una solución acuosa de HCl 1N hasta un pH = 2, y se extrae con acetato de etilo (3 x 2 l). Se lavan los extractos de acetato de etilo combinados con salmuera, se secan sobre MgSO₄ y se concentra al vacío para producir el compuesto del título (250 g, 65 %
- 10 rendimiento). EM (m/z): 360 (M+-Boc).

ETAPA 7: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(1-(1-metiletoxi)carbonil)oxi)metilo



- 15 Se trata sucesivamente una solución de ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (150,00 g, 326,46 mmoles) en dimetilformamida (3,38 l) con carbonato potásico (1 180,48g, 1,31 moles), isopropil carbonato de clorometilo (149,43 g, 979,39 mmoles) y yoduro sódico (9,79 g, 65,29 mmoles) y se agita la mezcla bajo nitrógeno a 25 °C. Al cabo de 12 horas, se añade agua (1,5 l) a la mezcla, se eliminan los sólidos por filtración y se extrae el filtrado con éter metil
- 20 *tert*-butílico (3 x 1,5 l). Se lavan las fases orgánicas combinadas sucesivamente con agua, salmuera, se secan sobre MgSO₄ y se concentra al vacío. Se purifica el residuo resultante por cromatografía sobre gel de sílice (2:1 a 1:1 hexano/ acetato de etilo) para dar el compuesto del título (225 g, 70 % rendimiento). EM (m/z): 592 (M+-Boc).

ETAPA 8: hidrocloreto de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(1-(1-metiletoxi)carbonil)oxi)metilo



Se trata (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[[[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[[[(1-metiletoxi)carbonil]oxi]metilo] (124,9 g, 180,57 mmoles) con cloruro de hidrógeno 4N en 1,4-dioxano (1,12 l, 4,50 moles) a 25 °C. Al cabo de 90 minutos, se elimina el disolvente al vacío y se forma una suspensión espesa con el residuo en éter metil *tert*-butílico (1 l) durante 30 minutos. Se recoge el precipitado resultante por filtración, se lava con éter metil *tert*-butílico (500 ml) y se seca en un horno a 45 °C durante 16 horas. Se disuelve la sal resultante en diclorometano y se neutraliza el agua con trietilamina. Se separa la fase orgánica, se seca sobre MgSO₄ y se concentra al vacío para producir un residuo. Se purifica el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (3:1 a 1:1 hexano/ acetato de etilo) para producir la base libre que se trata con HCl 4N en 1,4-dioxano (950 ml) a 25 °C. Al cabo de 15 minutos, se evapora el disolvente al vacío y se forma una suspensión espesa con el residuo en éter metil *tert*-butílico (1 l) y hexanos (250 ml). Se filtra el sólido resultante, se lava con éter metil *tert*-butílico (500 ml) y se seca al vacío a 45 °C hasta un peso constante para proporcionar el compuesto del título (98,5 g, 87 % rendimiento). EM (m/z): 592 (M+1).

Los datos bibliográficos (Witkin, Jeffrey M., y Eiler, William J.A. (2006), *Antagonism of Metabotropic Glutamate Group II Receptors in the Potential Treatment of Neurological and Neuropsychiatric Disorders*. Drug Development Research vol. 67, pág. 757-769; y Yasuhara, Akito y Chaki, Shigeyuki, (2010) *Metabotropic Glutamate Receptors: Potential Drug Targets for Psychiatric Disorders*, The Open Medicinal Chemistry Journal, vol. 4, pg. 20-36.) y los datos generados en estudios con animales no clínicos corroboran el papel de los antagonistas de mGlu2/3 en el tratamiento de trastornos depresivos y trastornos de somnolencia excesiva. Específicamente, se ha observado que los antagonistas de receptor mGlu 2/3 son eficaces en modelos con roedores de trastornos depresivos y promueven la vigilia utilizando roedores monitorizados por EEG sin una hiperactividad desproporcionada o clínicamente relevante o con hipersomnolencia compensatoria. El aumento del estado de alerta se manifiesta en una mayor atención, un mejor comportamiento cognitivo y la probabilidad de menor fatiga. Dado que los trastornos que se han descrito representan afecciones clínicas con comorbilidad, un antagonista de receptor mGlu2/3 puede ser particularmente eficaz en poblaciones de pacientes concretos, como pacientes con trastorno depresivo mayor, tratamiento de depresión refractaria, depresión unipolar, distimia y/o ciclotimia o cualquier trastorno de excesiva somnolencia. Los trastornos de excesiva somnolencia pueden incluir, pero sin limitarse a ellos somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnolia asociada con sueño obstructivo, apnea y narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluyendo, pero sin limitarse a ellos trastorno del sueño por cambios del turno de trabajo, trastornos de desfase horario (jet lag), síndrome de la fase del sueño retrasada, síndrome del adelanto de la fase del sueño y trastorno por ciclo de sueño-vigilia diferente de 24 horas), hipersomnolencia idiopática y/o somnolencia excesiva asociada a sueño no reparador (SNR).

Para demostrar mejor las características de los compuestos de la presente invención, se pueden utilizar compuestos representativos en los siguientes ejemplos *in vivo* e *in vitro*.

Ensayos de antagonista cAMP del receptor mGlu2 y mGlu3

Se sometió a ensayo la actividad antagonista en células AV12 recombinantes que expresan establemente receptores mGlu2 o mGlu3 humanos y el transportador de glutamato EAAT1 de rata (Transportador de aminoácido excitatorio 1). Se mantuvieron las líneas celulares por cultivo en DMEM con un alto nivel de glucosa e hidrocloreuro de piridoxina suplementado con suero bovino fetal (SBF) dializado al 5 %, 1 mM piruvato sódico, 1 mM HEPES y 1 mM L-glutamina; se utilizan geneticina e higromicina B como antibióticos de selección. Se desarrollan cultivos confluentes a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 6,5 % y se pasaron dos veces a la semana. Se recogieron las células utilizando 0,25 5 de tripsina, se suspendieron en medio de congelación (SBF con 10 % DMSO) a 10⁷ células/ml y se almacenaron partes alícuotas en nitrógeno líquido. 24 horas antes del ensayo, se colocaron en placa las células a una densidad de 8.000-10.000 células por pocillo en placas negras de semi-área de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido (Costar 3875) en 50 µl de DMEM con un alto contenido en glucosa e hidrocloreuro de piridoxina suplementado con SBF dializado al 5 %, 1 mM de piruvato sódico, 1 mM piruvato sódico, 1 mM HEPES, 100 µg/ml ampicilina y 250 µM (mGlu2) o 125 µM (mGlu3) de L-glutamina.

Se mide la inversión de la inhibición de producción de cAMP estimulada por forskolina mediante los compuestos de ensayo aplicando una tecnología de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF; Cisbio cat # 62AM4PEB). Se elimina el medio y se incuban las células con 100 µl de tampón de estimulación de cAMP (STIM) durante 30 minutos a 37 °C. (tampón STIM contiene 500 ml HBSS, 1000 ml DPBS, 0,034 % BSA, 1,67 mM HEPES y 500 µM IBMX (Sigma I5879).) Se someten a ensayo los compuestos en curvas de respuesta de concentración de 10 puntos utilizando dilución en serie 3x seguido de otra dilución de 40 veces en tampón STIM. DCG IV (Tocris 0975) sirve como antagonista de referencia. La mezcla de reacción final contiene 1 µM (para mGlu2) o 3 µM (para mGlu3) de forskolina (Sigma F6886), DCG IV a su EC₅₀, y hasta 25 µM del compuesto de ensayo. Se incuban las células a 37 °C durante 20 minutos. Para medir los niveles de cAMP, conjugado cAMP-d2 y conjugado anti cAMP-criptato, se incuban en tampón de lisis con las células tratadas a temperatura ambiente durante 1 hora (mGlu2) o 1,5 hora (mGlu3). Se detecta la señal HTRF utilizando un lector de placa EnVision (Perkin-Elmer) para calcular la relación de fluorescencia a entre 665 y 620 nM. Se convierten los datos en bruto a la cantidad de cAMP (pmoles/pocillo) utilizando una curva normal de cAMP generada para cada experimento. Se calculan los valores relativos IC₅₀ a partir del intervalo superior-inferior de la curva de respuesta a concentración utilizando un programa de ajuste de curva logístico de cuatro parámetros (ActivityBase v5.3.1.22).

Ensayos FLIPR y cAMP para selectividad de receptor mGlu

Se pueden valorar las potencias de antagonista relativas de los compuestos de la invención para otros receptores mGlu humanos o bien con el ensayo cAMP o bien a través del ensayo de respuesta a calcio fluorométricos (véase por ejemplo Fell y col., JPET (impreso). Brevemente, para estos estudios, se utilizan líneas celulares AV12 individuales que contienen el transportador de glutamato EAAT1 de rata y expresan establemente los receptores mGlu1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 humanos. Los receptores mGlu 1 y 5 están acoplados a Gq, de manera que se señalizan de forma natural a través de fosfolipasa C produciendo una respuesta al flujo de calcio que se puede utilizar para medir la activación del receptor utilizando un Lector de Placa de formación de Imágenes Fluorométricas (FLIPR, Molecular Devices). Se designan las líneas celulares que expresan receptor mGlu2, 3, 4, y 8 para expresar la subunidad Gα15 para que estos receptores acoplados a Gi –genere una respuesta al flujo de calcio similar a las líneas celulares que expresan receptor mGlu 1 y 5. Se somete a ensayo el receptor mGlu6 en un formato cAMP utilizando procedimientos análogos a los desarrollados para mGlu2 y mGlu3 anteriores. Se mantienen estas líneas celulares tal como se ha descrito, a excepción de que las cantidades de L-glutamina y los agentes de selección (geneticina, higromicina B, zeocina y bastidicina) pueden variar dependiendo de la línea celular. Se pasaron los cultivos confluentes dos veces a la semana.

Se controlaron los niveles de calcio intracelular utilizando FLIPR antes y después de la adición de los compuestos de ensayo y colorante Fluo-3-AM (Invitrogen) o Calcio 4 (Molecular Devices), dependiendo de la línea celular. Se colocaron en placas las células 24 horas antes del ensayo en una concentración variable de glutammina y una densidad variable de las células por pocillo, dependiendo de la línea celular. Se separó el medio y se incubaron las células con 8 μM de colorante (50 μl por pocillo) durante 90 o 120 minutos (dependiendo de la línea celular) a 25 °C. Se lleva a cabo un ensayo FLIPR de única adición generada una curva de respuesta a concentración de 11 puntos para el glutamato agonista antes de cada experimento para confirmar la sensibilidad apropiada de las células. Se analizan los resultados utilizando GraphPad Prism v4.03 para calcular las concentraciones de glutamato necesarias para inducir respuestas EC₉₀ (ensayo agonista) y EC₁₀ (ensayo potenciador).

Se someten a ensayo los compuestos en cada receptor mGlu en un ensayo FLIPR de doble adición utilizando un perfil de respuesta a concentración de 10 puntos partiendo de una concentración final de 25 μM para el ensayo agonista y 12,5 μM para los ensayos de potenciador y antagonista. La primera adición detecta cualquier actividad agonista, y la segunda adición consiste en 100 μl de concentraciones seleccionadas (dependiendo de la línea celular) de glutamato en tampón de ensayo que genera una respuesta de glutamato EC₁₀ o EC₉₀. Los efectos agonistas se determinan cuantitativamente como porcentaje de estimulación inducido por el compuesto en solitario en relación con la respuesta a glutamato máxima. Se determinan los efectos antagonistas calculando el porcentaje de inhibición de la respuesta a glutamato EC₉₀ causada por el compuesto. Se determinan los efectos de potenciación como el porcentaje del aumento, en presencia de una respuesta EC₁₀, de glutamato en relación con la respuesta EC_{max}. Todos los datos se calculan como valores IC₅₀ o EC₅₀ relativos utilizando un programa de ajuste de curva logística de cuatro parámetros (ActivityBase v5.3.1.22).

Se mide la actividad antagonista en células mGlu6 utilizando cAMP en un procedimiento análogo al descrito para la actividad de mGlu2 y mGlu3, a excepción de que el agonista de referencia fue L-AP4 (Tocris). Para medir la actividad agonista de mGlu6, se calcula en grado en el que el compuesto inhibe la producción de cAMP estimulada por foskolina. Se calculan los valores relativos IC₅₀ y EC₅₀ a partir del intervalo superior-inferior de la curva de respuesta a concentración utilizando un programa de ajuste de curva logística de cuatro parámetros (ActivityBase v5.3.1.22).

Se someten a ensayo ejemplos de compuestos en los que R¹ y R² son ambos hidrógeno esencialmente, tal como se ha descrito y se observa que tienen una alta potencia antagonista para los receptores mGlu2 y mGlu3. Se observa que los ejemplos de compuestos en los que R¹ y R² son ambos hidrógeno son antagonistas selectivos de los receptores mGlu2 y mGlu3 así como contra otros subtipos de receptor mGlu. Se observa que las IC₅₀ para los receptores mGlu2 y mGlu3 para los ejemplos de compuestos en los que R¹ y R² son ambos hidrógeno son inferiores a 70 nM y 140 nM, respectivamente, mientras que se observa que las IC₅₀ para otros receptores mGlu sometidos a ensayo son significativamente mayores. Se someten a ensayo los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 esencialmente tal como se ha descrito y se observa que tienen los perfiles de actividad que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos de selectividad

Ex.	% inhib. mGlu1 @12,5 μM	IC ₅₀ nM mGlu2	IC ₅₀ nM mGlu3	% inhib. mGlu4 @12,5 μM	% inhib. mGlu5 @12,5 μM	IC ₅₀ nM mGlu6	% inhib. mGlu8 @12,5 μM
1	6,3 %	15,4±2,0	6,2±2,2	17,9 %	-2,0 %	1720	47,0% (IC ₅₀ 4970 nM)
2	7,9 %	12,7 ± 2,3	13,4 ± 3,4	28,0 %	21,4 %	1395	68,7% (IC ₅₀ 7860 nM)

Asimismo, ciertos compuestos de la presente invención presentan una falta de actividad significativa en otros receptores fisiológicamente importantes como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, el canal hERG, receptores de serotonina (específicamente 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B}), receptores muscarínicos (específicamente M2) y receptores iGluR (específicamente iGluR5). Se somete a ensayo el compuesto del Ejemplo 1 aplicando procedimientos de ensayo conocidos y se observa que no tiene una actividad apreciable en estos receptores.

Por lo tanto, se espera que dosis fisiológicamente relevantes de los compuestos de la invención proporcionen una inhibición sustancial de los receptores mGlu2 y mGlu3 *in vivo* y, al mismo tiempo que no interactúan sustancialmente con otros receptores de mGlu u otros receptores fisiológicamente relevantes y, por tanto, se espera que proporcionen la farmacología deseada al tiempo que se evitan efectos no deseados asociados con la actividad fuera de objetivo.

Prueba de natación forzada en ratones (PNFr)

PNFr es un ensayo *in vivo* establecido para determinar la actividad antidepresiva (Li y col. J Pharmacol Exp Ther. 319(1):254-9, 2006.). Los ratones tratados con antidepresivos clínicamente eficaces conocidos (inhibidor de recaptación de serotonina selectivos y/o antidepresivos tricíclicos) presentaron una conducta de permanecer inmóviles un reducido período de tiempo en un tanque de agua, una conducta asociada a la desesperación. Se utilizó la PNFr para evaluar el potencial de actividad de tipo antidepresiva de los nuevos antagonistas de mGlu2/3, esencialmente tal como se ha descrito en procedimientos anteriores publicados (véase por ejemplo, Li y col. J Pharmacol Exp Ther. 319(1):254-9, 2006.). Brevemente, se utilizan ratones NIH-suizos macho (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) que pesaban entre 25 y 30 g. Se traslada a los animales alojados en grupo del vivario al área de ensayo en sus propias jaulas y se les deja que se adapten al nuevo entorno durante al menos 1 hora antes de realizar el ensayo. Se disuelven en agua los compuestos en los que R¹ y R² son ambos hidrógeno añadiendo un mínimo de NaOH para la disolución y se administran i.p. Se preparan compuestos en los que R¹ y/o R² son distintos a hidrógeno el día de uso en 2,0-2,5 % de N-metil-pirrolidina y a continuación, se suspenden en 1 % HEC, 0,25 % de Tween 80 y 0,05 % de antiespumante de Dow y se administran por vía oral. Se coloca a los ratones en un cilindro (diámetro: 10 cm; altura: 25 cm) llenado con 6 cm de agua (22-25 °C) durante 6 min. Se registra la duración de la inmovilidad durante los últimos 4 minutos del período de 6 minutos de la prueba. Se puntúa a un ratón como inmóvil cuando flota inmóvil o cuando únicamente realiza los movimientos necesarios para mantener la cabeza por encima del agua.

Se someten a ensayo compuestos representativos esencialmente tal como se ha descrito anteriormente y se observa que reducen significativamente los períodos de inmovilización en ratones de tipo silvestre. Se someten a ensayo ejemplos de compuestos en los que R¹ y R² son ambos hidrógeno esencialmente tal como se ha descrito y se observa que tienen ED₆₀ inferior a 30 mg/kg i.p., con reducciones máximas de los períodos de inmovilización de al menos 25 %. Se someten a ensayo los compuestos de los ejemplos 1, 2, 12/32 y 22 esencialmente tal como se ha descrito y se observa que tienen las actividades que se indican en la Tabla 2. Por lo tanto, se espera que los compuestos de la presente invención tengan una actividad antidepresiva *in vivo*.

Tabla 2. Prueba de natación forzada en ratones (PNFr)

Ejemplo	ED ₆₀ (mg/kg)	Disminución máxima (1-compuesto/control)* 100 %
1	8,0 (i.p.)	36,1 %
2	24,5 (i.p.)	33,5 %
12/32	12,0 (p.o.)	58,4 %
22	20,5 (p.o.)	50,1 %

En otros experimentos, se estudiaron ratones con deleciones de receptor (ratones en los que se ha inactivado mGlu2); estos ratones están criados por apareamiento heterocigoto x heterocigoto y se utilizaron como camada para comparaciones de ratón -/- y +/- (Taconic Farms). Se observó que los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 (10 mg/kg, i.p., 30 min antes) reducían significativamente el período de inmovilidad en ratones mGlu2^{+/+}, pero no fue así en los ratones mGlu2^{-/-}. De manera similar, se observó que el compuesto del Ejemplo 12/32 (30 mg/kg, p.o., 120 min antes) redujo el período de inmovilidad en ratones mGlu2^{+/+}, pero no fue así en los ratones mGlu2^{-/-}. Estos hallazgos demostraron además que el receptor mGlu2 contribuye a los efectos de tipo antidepresivo de los compuestos de la invención.

Asimismo, se pueden someter a ensayo los compuestos de la invención en combinación con otros compuestos útiles para el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo SSRI, para determinar su capacidad para potenciar los efectos de tipo antidepresivos con respecto al efecto de cada compuesto por separado. Se somete a ensayo el compuesto del Ejemplo 12 (10 mg/kg p.o.) en la prueba de natación forzada en ratones en solitario y en combinación con fluoxetina (10 mg/kg, i.p.) o citalopram (1 mg/kg, i.p.) y se observa un aumento significativo del efecto de tipo

antidepresivo con respecto a cualquiera de los compuestos en solitario, tal como se muestra en la Tabla 3 a continuación. Asimismo, la determinación de los niveles en plasma y en el cerebro de la fracción diácido activa del compuesto del Ejemplo 12 (es decir, el mismo compuesto que la base libre del Ejemplo 1) y los niveles en plasma de fluoxetina y citalopram, no presentó ningún aumento en los niveles de exposición, lo que corrobora la conclusión de que la mayor actividad de tipo antidepresivo no se debió meramente al aumento de la exposición central de los compuestos.

Tabla 3. PNFr con SSRI

Compuesto(s)	Tiempo de inmovilización (s)	Error típico de la media	Reducción máxima (1-compuesto/control)*100 %
Vehículo	173	14	
Ejemplo 12	130	17	24,5 %
Fluoxetina	118	16	31,5 %
Ex. 12 + Fluoxetina	80	15	53,6 %*
Vehículo	176	14	
Ejemplo 12	140	8	20,9 %
Citalopram	102	18	42,1 %
Ex. 12 + Citalopram	80	13	54,8 %**
*Significativamente diferente del compuesto del Ejemplo 12 o fluoxetina en solitario, p<0,05			
**Significativamente diferente del compuesto del Ejemplo 12 o citalopram en solitario, p<0.05			

Seguimiento de la conducta y vigilia en ratas: Se someten a ensayo compuestos representativos de la presente invención en ratas para determinar su capacidad para aumentar la cantidad de tiempo en estado de vigilia sin efectos no deseables, como la inhibición del sueño REM, incapacidad motora para andar (hiper- o hipolocomoción desproporcionada) y/o hiperinsomnia de rebote. Se monitorizaron de forma continua los animales de ensayo por electro-encefalograma (EEG), electromiograma (EMG) y el movimiento para medir el tiempo de vigilia acumulado, la hipersomnolia de rebote y la intensidad de actividad locomotora durante la vigilia. Los procedimientos para estos estudios son conocidos en la técnica (véase por ejemplo los procedimientos descritos en Edgar DM, Seidel WF. Modafinil induces wakefulness without intensifying motor activity or subsequent rebound hypersomnolence in the rat. *J Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1997; 283: 757-769; van Gelder RN, Edgar DM, Dement WC. Real-time automated sleep scoring: validation of a microcomputer-based system for mice. *Sleep* 1991, 14: 48-55; y Gross BA, Walsh CM, Turakhia AA, Booth V, Mashora GA, Poe GR. Open-source logic-based automated sleep scoring software using electrophysiological recordings in rats. *J vNeurosci Methods*. 2009; 184(1):10-8). Se llevaron a cabo estudios del siguiente modo:

Preparación de los animales. Se preparan quirúrgicamente ratas Wistar macho (de aproximadamente 270-300 g en el momento de la cirugía) para el registro crónico de EEG, EMG, temperatura corporal y movimiento del siguiente modo: se preparan quirúrgicamente las ratas con un implante craneal que consiste en cuatro tornillos de acero inoxidable para registro EEG dos frontales [3,9 mm anterior desde el bregma y \pm 2,0 mm mediolateralmente] y dos occipitales [6,4 mm posterior desde el bregma, \pm 5,5 mm mediolateralmente] y con dos cables de acero inoxidable revestidos con teflón para registro EMG (colocados bajo los músculos trapeciales nucales). Se sueldan todos los cables conductores a un conector miniatura (Microtech, Boothwyn, PA) antes de la cirugía. Se fija el conjunto del implante en el cráneo combinando los tornillos para el registro EEG, cianoacrilato aplicado entre el conector del implante y el cráneo y acrílico dental. Se controla la temperatura corporal y la actividad locomotora a través de un transmisor miniatura (Minimitter PDT4000G, Philips Respironics, Bend, OR) colocado quirúrgicamente en el abdomen. Se dejan al menos 3 semanas para la recuperación.

Entorno de registro. Se alojan las ratas una por una individualmente dentro de una jaula microaisladora modificadas con inserción de un elevador con un filtro superior de policarbonato para dejar más espacio libre verticalmente. Se conecta un cable flexible que restringe mínimamente el movimiento en uno de los extremos del conmutador fijado en la parte superior de la jaula y el otro extremo, al implante craneal del animal. Se coloca cada una de las jaulas dentro de compartimentos separados ventilados de una cámara de registro del sueño-vigilia de acero inoxidable. Se deja disponible agua y comida *ad libitum* y se mantiene la temperatura ambiente a aproximadamente 23 ± 1 °C. Se mantiene un ciclo de luz-oscuridad de 24 h (Luz-Oscuridad 12-12) utilizando luz fluorescente a lo largo de todo el estudio. La humedad relativa promedio es aproximadamente 50 %. No se

molesta a los animales durante al menos 30 horas antes y después de cada tratamiento.

Diseño del estudio y dosificación. Se disuelven los compuestos en los que R¹ y R² son ambos hidrógeno en agua, añadiendo un mínimo de NaOH para la disolución y se administran i.p en un volumen de 1,0 ml por kg de peso corporal. Se administran compuestos en el que R¹ y/o R² son distintos a hidrógeno p.o. en un volumen de 2 ml per kg peso corporal en uno de dos vehículos alternativos: i) 2,5 % N-metil-2-pirrolidinona en hidroxietilcelulosa; o ii) 10 % acacia con 0,05 % de antiespumante de Dow Corning® en agua. Se administra el vehículo o uno de los niveles de dosificación de los compuestos de forma pseudoaleatoria, de tal manera que ninguna de las ratas recibe el mismo tratamiento dos veces y ninguna de las ratas recibe más de dos de los 8 tratamientos en ninguno de los estudios. Se saca cada una de las ratas de las jaulas durante aproximadamente un minuto para pesarlas y tratarlas. Se permite un período de “reposo farmacológico” de al menos 6 días antes y después de cada tratamiento.

Recogida de datos. La discriminación entre sueño y vigilia puede ser automática (p.ej., Van Gelder y col. 1991; Edgar y col. 1997, Winrow y col., 2010; Gross y col., 2009). Se amplifica EEG y se filtra (X 10.000, banda pasante 1-30 Hz), se amplifica EMG y se integra (banda pasante 10-100 Hz, integración RMS) y se controla la actividad locomotora específica (LMA) simultáneamente. Se clasifican los estados de alerta en epochs de 10 segundos como sueño no REM, sueño REM, vigilia o vigilia con predominio de ritmos theta. Se registra la actividad locomotora (LMA) como recuentos por minuto y se detecta mediante receptores de telemetría disponibles en el mercado (ER4000, Minimitter, Bend, OR).

Análisis estadístico. Se resumen las edades y los pesos corporales según media, mínimo y máximo en todos los grupos de tratamiento. Se incluye a todos los animales que tienen al menos un resultado en los resultados del resumen (por ejemplo, se incluyen datos apropiados de un tratamiento del animal para el que se pueden utilizar los datos de telemetría, pero no los datos de EEG). Se divide el período de observación después del tratamiento en 2 intervalos post-dosificación (las primeras 7 horas y las primeras 19 horas), en los que se define el período de dosificación como el inicio en la Hora = 0. En cada período se resumen los resultados computando la media por horas o el valor acumulado en cada uno de los períodos. Se analiza cada uno de los resultados de cada período por análisis de covarianza utilizando un grupo de tratamiento y los datos de tratamiento como factores y el intervalo previo al tratamiento correspondiente, 24 horas antes, como covariable. Se resumen las medias ajustadas y el cambio de las medias de vehículo y sus errores típicos correspondientes para cada grupo de tratamiento. Se muestran para cada resultado en cada período los valores P de comparación múltiple de Dunnett ajustados. Tal como se muestra en la Tabla 1, no se analizan todos los resultados en todos los períodos, lo que afecta a la tasa de error de tipo I experimentalmente. Como tal, no se realiza ningún ajuste más para las pruebas múltiples.

Determinación de la eficacia. Se estima la dosis eficaz umbral como la dosis más baja posible para la que el tiempo de vigilia acumulado excede 50 minutos en relación con los controles de vehículo a lo largo de las 7 primeras horas de post-tratamiento. Es posible realizar una determinación más ajustada llevando a cabo posteriores estudios de dosis más cercanamente espaciadas en torno a la dosis eficaz.

Determinación de los efectos no deseados. Se evalúan dos posibles efectos no deseables en particular: hipersomnolencia de rebote e intensificación de la actividad motora (Edgar DM, Seidel WF, 1997).

(i) Se puede medir la hipersomnolencia de rebote como la reducción de los niveles de vigilia durante el período de 8-19 horas tras dosis de tratamiento eficaces. Una reducción biológicamente significativa se define como más de 50 por ciento del aumento acumulado durante las primeras 7 horas. Por tanto, si aumenta la vigilia en 100 minutos durante las primeras 7 horas, entonces, una reducción de la vigilia acumulada de 50 minutos o más, en relación con los controles de vehículo, durante el período de 8-19 horas tras el tratamiento, debería considerarse como biológicamente significativo. Los cambios medios del grupo, presentados en la Tabla 2, demuestran una falta de hipersomnolencia de rebote.

(ii) intensificación de la actividad motora se define como el aumento promedio en relación con los controles de vehículo que excede 5 recuentos LMA por minuto de la vigilia definida por EEG a una dosis umbral de eficacia y para la que el efecto está relacionado con la dosis. Los aumentos medios del grupo en la Tabla 2 fueron todos ellos por debajo de 5 recuentos por minuto de vigilia y no dependieron de la dosis.

Se someten a ensayo ejemplos de compuestos esencialmente tal como se ha descrito y se observa que promueven la vigilia sin hipersomnolencia de rebote ni intensificación de la actividad motora significativas. Se someten a ensayo ejemplos de compuestos en los que R¹ y R² son ambos hidrógeno (administrados i.p.) esencialmente, tal como se ha descrito y se observa que son eficaces a dosis de 10 mg/kg o inferior. Se somete a ensayo el compuesto del Ejemplo 12 esencialmente tal como se ha descrito y se observa que tiene un perfil de tiempo de vigilia acumulado e intensificación de la actividad locomotora tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

<u>Tiempo de vigilia acumulado las primeras 7 horas</u>				
Dosis (mg/kg PO)	N	Media	ET	P
60	12	118,9	14,3	<0,0001
30	12	109,3	14,1	<0,0001
10	9	40,2	15,6	0,0368
<u>Tiempo de vigilia acumulado 8-19 horas</u>				
Dosis (mg/kg PO)	N	Media	ET	P
60	12	2,7	14,4	0,8535
30	12	-4,1	14,5	0,7760
10	9	12,1	16,0	0,4546
<u>Intensificación de la actividad locomotora (nota 1)</u>				
Dosis (mg/kg PO)	N	Media	ET	P
60	7	4,9	2,0	0,0191
30	12	3,0	1,8	0,0939
10	6	4,5	2,0	0,0349
Estadística de los resultados: Los valores medios representan la diferencia con respecto a los controles de vehículo: ET = Error típico de la media; P = valor P ajustado para múltiples contrastes para la variable de eficacia. los valores P sin ajustar se presentan para las medidas de "efecto no deseado" (Tiempo de vigilia acumulado 8-19 horas e intensidad de la actividad locomotora). El tiempo de vigilia acumulado se da en minutos. <i>Nota 1</i> Intensidad de actividad locomotora (LMA) = recuentos de LMA por minuto de vigilia definida por EEG como promedio durante las 7 primeras horas tras el tratamiento.				

Adicionalmente, en tres experimentos por separado, se estudiaron ratones con deleciones de receptor simple mGlu2(-/-), simple mGlu3(-/-) o doble mGlu2(-/-) mGlu3(-/-). Estos ratones se crían por apareamiento de heterocigoto x heterocigoto y se utilizan como camadas para comparaciones de ratones -/- y +/- (Taconic Farms). Se observa que el Ejemplo 1 (10 mg/kg, i.p.) aumenta de forma significativa la vigilia en los ratones de tipo silvestre, ratones con inactivación simple de mGlu3(-/-) y ratones con inactivación simple de mGlu2(-/-), aunque a un menor nivel. En contraposición, se observa que el compuesto del Ejemplo 1 no aumenta significativamente la vigilia en los ratones con doble inactivación de mGlu2(-/-) mGlu3(-/-). Estos hallazgos demuestran que ambos receptores mGlu2 y mGlu3 contribuyen al efecto de promoción de la vigilia de los compuestos de la invención.

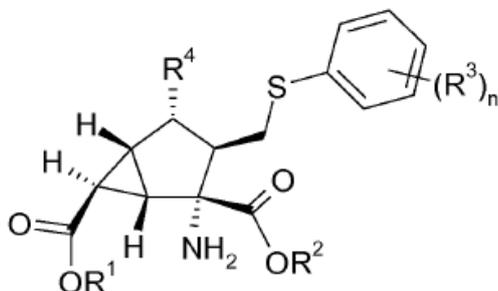
Aunque es posible administrar los compuestos empleados en los procedimientos de la presente invención directamente sin ninguna formulación, por lo general, los compuestos se administran en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, como principio activo y al menos un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones se pueden administrar a través de diversas rutas, incluyendo oral, sublingual, nasal, subcutánea, intravenosa e intramuscular. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para su preparación son conocidos dentro de la técnica. Véase, *p.ej.* Remington: The Science and Practice of Pharmacy (University of the Sciences in Philadelphia, ed., 21ª ed., Lippincott Williams & Wilkins Co., 2005). Los compuestos de Fórmula I en los que R¹ o R² son ambos distintos a hidrógeno son preferentes para administración oral para mejorar la biodisponibilidad, en cambio, compuestos de Fórmula I en los que R¹ y R² son ambos hidrógeno son preferentes para administración i.v., i.p. o intramuscular.

Preferentemente, las composiciones se formulan en forma de dosis unitarias, con un contenido cada dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 600 mg, más habitualmente de aproximadamente 30 a aproximadamente 300 mg, como por ejemplo entre aproximadamente 50 y aproximadamente 250 mg del principio activo. La expresión "forma de dosis unitaria" se refiere a unidades separadas físicamente adecuadas como dosis unitarias para pacientes humanos y otros mamíferos, con un contenido cada unidad de una cantidad determinada previamente de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con al menos un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente adecuado eficaz.

Los compuestos de Fórmula I son generalmente eficaces dentro de un amplio intervalo de dosis. Por ejemplo, las dosis por día entran normalmente dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg, más habitualmente de aproximadamente 0,3 a 5,0 mg/kg, y por ejemplo entre 0,5 y 3,0 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, niveles de dosis por debajo del límite inferior del intervalo mencionado pueden ser más que adecuadas, mientras que en otros casos, es posible emplear dosis aún más altas sin causar ningún efecto secundario perjudicial y, por lo tanto, se pretende que el intervalo de dosis citado no limite el ámbito de la invención en modo alguno. Se entenderá que la cantidad de compuesto administrado realmente será determinado por el médico a la luz de las circunstancias pertinentes, incluyendo la afección que se vaya a tratar, la ruta de administración seleccionada, el compuesto o compuestos administrados reales, la edad, el peso y la respuesta del paciente como individuo, así como la gravedad de los síntomas del paciente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



5 en la que R^1 y R^2 son cada uno de ellos independientemente hidrógeno, alcoxicarboniloximetilo de C_1-C_3 , alquilcarboniloximetilo de C_1-C_5 o cicloalquilcarboniloximetilo de C_3-6
 R^3 es independientemente cada vez que aparece metilo, flúor o cloro;
 R^4 es hidroxilo, amino, metilcarbonilamino o 1,2,4-triazolilto; y
 n es 1 o 2;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 2. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1 en el que R^1 y R^2 son cada uno hidrógeno o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

3. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1 en el que R^1 y R^2 son iguales y son distintos a hidrógeno o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

4. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 3 en el que R^1 y R^2 son cada uno isopropilo xicarbonilo ximetilo.

15 5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que n es 2 y los grupos R^3 están en las posiciones fenilo 3- y 4-.

6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que R^3 es independientemente cada vez que aparece cloro o flúor.

20 7. El compuesto de acuerdo con Reivindicación 1 que es ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil}-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

8. El compuesto de acuerdo con Reivindicación 1 que es (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-difluorofenil)sulfanil]metil}-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([(1-metiletoxi)carbonil]oxi)metilo) o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

25 9. El compuesto de acuerdo con Reivindicación 1 que es ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanil]metil}-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

30 10. El compuesto de acuerdo con Reivindicación 1 que es (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3-cloro-4-fluorofenil)sulfanil]metil}-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([(1-metiletoxi)carbonil]oxi)metilo) o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, en combinación con al menos un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en terapia.

13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de trastornos depresivos.

14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva.

40 15. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en combinación simultánea, por separado o de forma secuencial con un

inhibidor de recaptación de serotonina en el tratamiento de trastornos depresivos.

16. Una composición farmacéutica de acuerdo con reivindicación 11 en la que la composición comprende además un inhibidor de recaptación de serotonina.