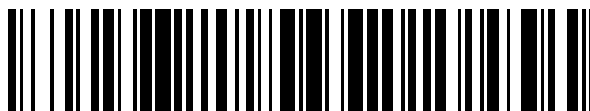


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 959**

51 Int. Cl.:

C07C 229/50 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61K 31/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2011** **PCT/US2011/060686**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012** **WO12068041**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2011** **E 11793573 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018** **EP 2640687**

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

30 Prioridad:

18.11.2010 US 415113 P

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

24.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DRESSMAN, BRUCE ANTHONY;
CHAPPELL, MARK DONALD;
FIVUSH, ADAM MICHAEL;
MITCH, CHARLES HOWARD;
ORNSTEIN, PAUL LESLIE;
TROMICZAK, ERIC GEORGE y
VETMAN, TATIANA NATALI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 682 959 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

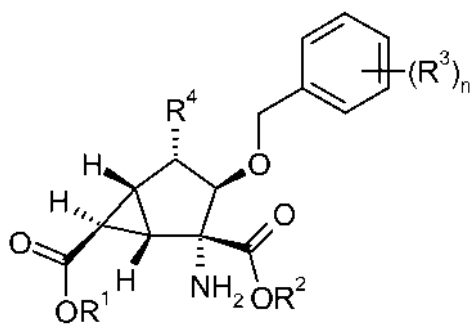
Compuestos de 3-benciloxi-biciclo[3.1.0]hexano 4-sustituídos como antagonistas de mGluR 2/3

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del cerebro, y está implicado en una amplia variedad de procedimientos fisiológicos mediados a través de no menos de 11 receptores diferentes, cada uno con su propia farmacología. Los receptores del glutamato metabotrópico de los subtipos 2 y 3 (conocidos como mGlu2 y mGlu3) se agrupan frecuente y conjuntamente como receptores mGlu del Grupo II, basándose en su homología de secuencia, acoplamiento similar de segundos mensajeros, y características farmacológicas similares. Los antagonistas de los receptores mGlu2/3 han mostrado efectos farmacológicos significativos en modelos animales para trastornos depresivos y trastornos de somnolencia excesiva. Como tal, los antagonistas mGlu2/3 se han considerado útiles para el tratamiento de trastornos depresivos tales como el trastorno depresivo mayor (TDM), depresión unipolar, distimia, y/o ciclotimia, y/o útil en el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva, tales como somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnia asociada con apnea del sueño obstructiva o narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluido, aunque no de forma limitativa, a trastorno del sueño por cambio de turno de trabajo, trastorno por cambio de la zona horaria (jet lag), trastorno de fase del sueño retrasada, trastorno del sueño de fase avanzada, y síndrome de fase del sueño no de 24 horas), hipersomnolencia idiopática y/o somnolencia excesiva asociada con sueño no restaurador (SNR).

El documento US 5.916.920 describe algunos compuestos de biciclo[3.1.0]hexano 3-monosustituídos como moduladores metabotrópicos del receptor del glutamato útiles para tratar una variedad de trastornos incluidos como agentes antidepresivos. El documento 7.157.594 describe varios compuestos de biciclo[3.1.0]hexano 3-monosustituídos como antagonistas del receptor mGlu del Grupo II para su uso en el tratamiento de diversos trastornos incluidos síntomas depresivos. El documento US 2007/0021394 A1 describe varios compuestos de biciclo[3.1.0]hexano 3-monosustituídos como antagonistas del receptor mGlu del Grupo II y profármacos de los mismos para su uso en el tratamiento de diversos trastornos incluida la depresión. El documento EP1897550 describe varios derivados de aminobiciclo[3.1.0]hexano dicarboxílico N-sustituídos que son formas de profármaco de los agonistas del receptor mGlu2.

La presente invención proporciona una familia de compuestos de 3-fenilsulfanilmetilbiciclo[3.1.0]hexano 4-sustituídos con elevada potencia antagonista por los receptores mGlu2 y mGlu3. Los compuestos de la presente invención son también selectivos para los receptores mGlu2 y mGlu3, en especial frente a otros receptores de tipo mGlu. Algunos compuestos también han demostrado en modelos animales que los compuestos de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos depresivos (que pueden incluir el trastorno depresivo mayor (TDM), depresión unipolar, distimia, y/o ciclotimia) y trastornos de somnolencia excesiva (que pueden incluir somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnia asociada con apnea del sueño obstructiva o narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluido, aunque no de forma limitativa, a trastorno del sueño por cambio de turno de trabajo, trastorno por cambio de la zona horaria (jet lag), trastorno de fase del sueño retrasada, trastorno del sueño de fase avanzada, y síndrome de fase del sueño no de 24 horas), hipersomnolencia idiopática y/o somnolencia excesiva asociada con sueño no restaurador (SNR)). Los efectos análogos a los antidepresivos y efectos de estimulación de la vigilia de este mecanismo también predicen un impacto en trastornos como la fatiga que, por otra parte, son difíciles de tratar con los antidepresivos actuales.

La presente invención proporciona compuestos de Fórmula I:



I

donde R¹ y R² son cada uno independientemente hidrógeno, alcoxi C₁-C₃ carboniloximetilo, alquil C₁-C₃ carboniloximetilo, o cicloalquil C₃₋₆ carboniloximetilo;

R³ es, independientemente en cada aparición, metilo, flúor, o cloro;

R⁴ es hidroxilo, metilcarbonilamino, hidroximetilcarbonilamino, metoxycarbonilamino, imidazol-2-ilsulfanilo, tiazol-2-ilsulfanilo, 1,2,4-triazol-3-ilsulfanilo, 1-metil-1,2,4-triazol-3-ilsulfanilo, o 1-metil-1,2,4-triazol-5-ilsulfanilo; 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 R¹ y R² son ambos hidrógeno (los compuestos diácidos) son los compuestos terapéuticamente activos *in vivo*, mientras que los compuestos donde R¹ o R² o ambos son diferentes de hidrógeno son profármacos de sus análogos de diácido terapéuticamente activos. Los compuestos donde R¹ o R² o ambos son diferentes de hidrógeno se hidrolizan *in vivo* para proporcionar el análogo de diácido terapéuticamente activo. Los compuestos profármacos, cuando se administran por vía oral, especialmente los profármacos de diéster, proporcionan una biodisponibilidad mejorada 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, junto con al menos un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, este aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica adaptada para el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo, el trastorno depresivo mayor, depresión unipolar, distimia, y/o ciclotimia, que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más excipientes, transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables del mismo.

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

En otra realización adicional 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 apnea del sueño obstructiva o narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluido, aunque no de forma limitativa, a trastorno del sueño por cambio de turno de trabajo, trastorno por cambio de la zona horaria (jet lag), trastorno de fase del sueño retrasada, trastorno del sueño de fase avanzada, y síndrome de fase del sueño no de 24 horas), hipersomnolencia idiopática y/o somnolencia excesiva asociada con sueño no restaurador (SNR), que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más excipientes, transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables del mismo.

La presente invención también proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un procedimiento para tratar trastornos depresivos, como por ejemplo, el trastorno depresivo mayor (TDM), depresión unipolar, distimia, y/o ciclotimia, en un mamífero. Otra realización de este aspecto de la invención, comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en una combinación simultánea, independiente o secuencial, un segundo agente terapéutico que es un fármaco útil en el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo, un inhibidor de la recaptación de serotonina, como por ejemplo fluoxetina y/o citalopram.

Otras realizaciones de la invención proporcionan un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en procedimientos para el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva. 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 apnea del sueño obstructiva o narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluido, aunque no de forma limitativa, a trastorno del sueño por cambio de turno de trabajo, trastorno por cambio de la zona horaria (jet lag), trastorno de fase del sueño retrasada, trastorno del sueño de fase avanzada, y síndrome de fase del sueño no de 24 horas), hipersomnolencia idiopática o somnolencia excesiva asociada con sueño no restaurador (SNR).

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

La presente invención también proporciona 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 farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de trastornos depresivos. En realizaciones adicionales, el trastorno depresivo es uno cualquiera del 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 la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en una combinación simultánea, independiente o adicional junto con un inhibidor de la recaptación de serotonina, como por ejemplo fluoxetina y/o citalopram, en el tratamiento de trastornos depresivos.

Adicionalmente, este aspecto de la invención incluye un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva. En realizaciones concretas 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 apnea del sueño obstructiva o narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluido, aunque no de forma limitativa, a trastorno del sueño por cambio de turno de trabajo, trastorno por cambio de la zona horaria (jet lag), trastorno de fase del sueño retrasada, trastorno del sueño de fase avanzada, y síndrome de fase del sueño no de 24 horas), hipersomnolencia idiopática o somnolencia excesiva asociada con sueño no restaurador (SNR).

Una realización particular de este aspecto de las invenciones, los usos son en mamíferos, particularmente seres humanos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo, el 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 farmacéuticamente aceptable del mismo, y un segundo agente terapéutico útil en el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo, un inhibidor de la 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 farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva. En realizaciones concretas de este aspecto de la invención, el medicamento es para el tratamiento de una cualquiera o más de los siguientes: somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnia asociada con apnea del sueño obstructiva o narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluido, aunque no de forma limitativa, a trastorno del sueño por cambio de turno de trabajo, trastorno por cambio de la zona horaria (jet lag), trastorno de fase del sueño retrasada, trastorno del sueño de fase avanzada, y síndrome de fase del sueño no de 24 horas), hipersomnolencia idiopática o somnolencia excesiva asociada con sueño no restaurador (SNR).

Los compuestos de la presente invención tienen restos básicos y ácidos y, en consecuencia, reaccionan con numerosos ácidos y bases orgánicos e inorgánicos para formar sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables de la invención de cada uno de los compuestos de la presente invención están incluidos dentro del ámbito de la presente solicitud. El término "sal farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sal de un compuesto de la invención que sea sustancialmente no tóxico para los organismos vivos. Dichas sales incluyen las relacionadas en el Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977), que son conocidas del experto en la materia.

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

- 1) R^1 y R^2 son ambos hidrógeno;
- 2) R^1 o R^2 o ambos son diferentes de hidrógeno;
- 3) R^1 y R^2 son ambos diferentes de hidrógeno;
- 4) R^1 y R^2 son iguales y diferentes de hidrógeno;
- 5) R^1 y R^2 son cada uno isopropoxycarbonilmetilo;
- 6) n es 2;
- 7) n es 2, ambos grupos R^3 son cloro, y los grupos cloro están en las posiciones 3 y 4 del fenilo;
- 8) R^4 es hidroxilo.

Se entenderá que otros compuestos preferidos son aquellos que combinan las anteriores selecciones preferidas de sustituyentes dados con selecciones preferidas de otros sustituyentes. Los ejemplos de dichas combinaciones incluyen, aunque no de forma limitativa, las siguientes clases preferidas de compuestos:

- 9) compuestos preferidos de uno cualquiera de los párrafos 1-5 (selecciones preferidas para R^1 y R^2) en los que n es 2, ambos grupos R^3 son cloro, y los grupos cloro están en las posiciones 3 y 4 del fenilo (párrafo 7);
- 10) compuestos preferidos de uno cualquiera de los párrafos 1-5 (selecciones preferidas para R^1 y R^2) en los que R^4 es hidroxilo (párrafo 8);
- 11) compuestos preferidos de uno cualquiera de los párrafos 1-5 (selecciones preferidas para R^1 y R^2) en los que n es 2, ambos grupos R^3 son cloro, y los grupos cloro están en las posiciones 3 y 4 del fenilo (párrafo 7), y en los que R^4 es hidroxilo (párrafo 8).

Los compuestos preferidos específicos de la invención son los descritos en los ejemplos, incluidas sus bases libres y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Algunos compuestos preferidos son:

ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo [3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
(1R,2S,3S,4R,5S,6R)-4-amino-3-[(3,4-diclorofenil)metoxi]-2-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-4,6-dicarboxilato de bis(isopropoxycarboniloximetil) o un sal farmacéuticamente aceptable del mismo (es decir, los compuestos de los Ejemplos 1, 10 y 15, y sales farmacéuticamente aceptables alternativas de los mismos).

Las abreviaturas utilizadas en el presente documento se definen de la siguiente forma:

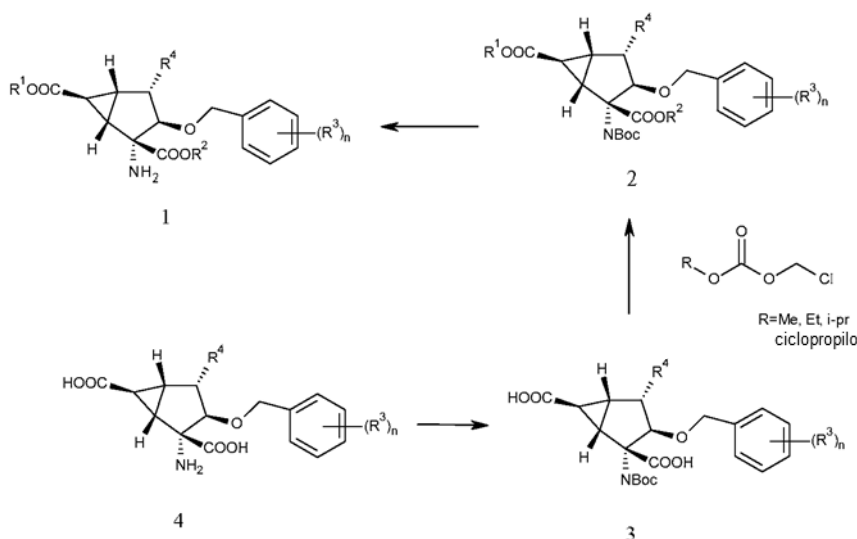
"BSA" significa albúmina de suero bovino.
 "DCG IV" significa (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxiciclopropil)glicina.
 "DMEM" significa medio de Eagle mínimo de Dulbecco.
 "DMSO" significa dimetil sulfóxido.
 "DPBS" significa solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco.
 "EDTA" significa ácido etilendiaminotetraacético.
 "GTP" significa trifosfato de guanosina.
 "HBSS" significa solución salina tamponada de Hank.
 "HEPES" significa ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico.
 "HPLC" significa cromatografía líquida de alta presión.
 "IBMX" significa 3-isobutil-1-metilxantina
 "Cl₅₀" significa la concentración a la que se consigue el 50 % de la inhibición.
 "i.v." significa intravenosa o por vía intravenosa.
 "i.p." significa intraperitoneal.
 "L-AP-4" significa L-(+)-2-amino-4-fosfonobutírico.
 "CL/EM" significa cromatografía líquida seguida por espectrometría de masas.
 "mFST" significa ensayo de natación forzada en ratones; un modelo animal de la actividad antidepresiva.
 "EM" significa espectrometría de masas.
 "EM (ES+)" significa espectrometría de masas utilizando ionización por electropulverización.
 "RMN" significa resonancia magnética nuclear.
 "p.o." significa *per os*, por boca.
 "tBu" significa un resto *butilo terciario*.

Química general

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los siguientes esquemas sintéticos por procedimientos bien conocidos y apreciados en la materia. Las condiciones de reacción adecuadas para las etapas de estos esquemas son bien conocidas en la técnica y las sustituciones adecuadas de disolventes o correctivos están comprendidas en las capacidades de la técnica. Asimismo, los expertos en la materia apreciarán que los productos intermedios sintéticos se pueden aislar y/o purificar mediante técnicas bien conocidas según sea necesario o deseado, y que frecuentemente, será posible utilizar diferentes productos intermedios directamente en etapas sintéticas posterior con poca o ninguna purificación. Además, el experto en la materia apreciará que, en algunas circunstancias, el orden en que se añaden los restos no es crítico. El orden concreto de las etapas necesarias para producir los compuestos de Fórmula I depende del compuesto particular que se está sintetizando, el compuesto de partida, y la labilidad relativa de los restos sustituidos, como apreciará bien el químico experto. Todos los sustituyentes, salvo que se indique de otra forma, son como se han definido anteriormente, y todos los reactivos son bien conocidos y apreciados en la materia.

Los compuestos de profármaco 1 se pueden preparar como se ilustra en el Esquema I donde R¹, R², R³, R⁴ y n son como se han definido anteriormente. R¹ y R² no son ambos hidrógeno en el compuesto 1.

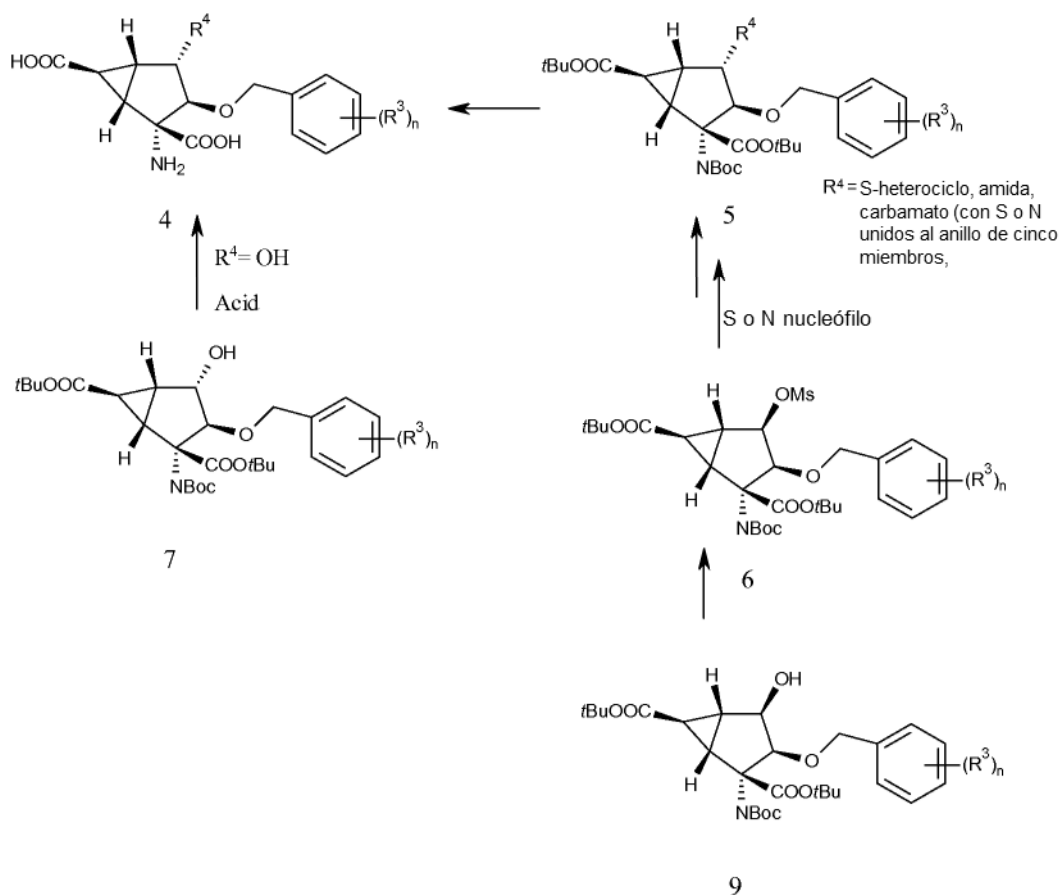
Esquema I



Los compuestos 1 se pueden preparar según la química ilustrada en el Esquema I. El compuesto 4 se hace reaccionar con un reactivo protector de amino tal como dicarbonato de di-*tert*-butilo en condiciones bien conocidas del experto en la materia para proporcionar el compuesto 3. Cuando los grupos R¹ y R² son idénticos en el

compuesto 2, el compuesto 3 se hace reaccionar con cantidad suficiente del correspondiente clorometilaquilcarbonato o yodometilaquilcarbonato y reactivos adecuados tales como yoduro de sodio y carbonato de cesio en un disolvente adecuado tal como dimetilformamida para proporcionar el compuesto de diéster 2 deseado donde R^1 y R^2 son iguales. Cuando R^1 y R^2 son diferentes en el compuesto 2, cuando se controla la cantidad del primer clorometilaquilcarbonato a aproximadamente un equivalente, el ácido carboxílico del anillo de cinco miembros se puede convertir en primer lugar a un monoéster de R^2 . El compuesto monoéster de R^2 se puede hacer reaccionar adicionalmente con un equivalente de un clorometilaquilcarbonato diferente. El grupo ácido carboxílico libre del anillo de tres miembros se puede convertir a continuación en un éster de R^1 para proporcionar el diéster deseado con dos R^1 y R^2 diferentes. Para preparar un monoéster de R^2 del anillo de cinco miembros del compuesto 2, el compuesto 3 se hace reaccionar con aproximadamente un equivalente del clorometilaquilcarbonato adecuado y reactivos adecuados tales como yoduro de sodio y carbonato de cesio en un disolvente adecuado tal como dimetilformamida para proporcionar el compuesto de monoéster de R^2 deseado 2, en el cual R^1 es hidrógeno. Para preparar un monoéster de R^1 del anillo de tres miembros, el grupo ácido carboxílico del anillo de cinco miembros deberá protegerse en primer lugar porque es más reactivo. De manera más específica, el grupo ácido carboxílico del anillo de cinco miembros del compuesto 3 se puede hacer reaccionar con alfa-cloro-4-metoxitolueno, yoduro de sodio y bicarbonato de sodio en un disolvente adecuado tal como dimetilformamida para proporcionar un monoéster de 4-metoxibencilo. El grupo ácido carboxílico del anillo de tres miembros del compuesto de monoéster de 4-metoxibencilo protegido se hace reaccionar a continuación con un clorometilaquilcarbonato adecuado para dar como resultado un éster de R^1 adecuado en el anillo de tres miembros. Es diéster se trata con un ácido adecuado tal como ácido trifluoroacético para desproteger tanto el 4-metoxibencilo como el grupo N-*tert*-butoxicarbonilo para dar como resultado el compuesto de monoéster de R^1 deseado 1. El compuesto 2, que incluye el monoéster de R^2 y el diéster con R^1 y R^2 iguales o diferentes, se desprotege seguidamente con un ácido adecuado tal como ácido clorhídrico en dioxano para dar el compuesto deseado 1 o una sal farmacéuticamente aceptable.

Esquema II

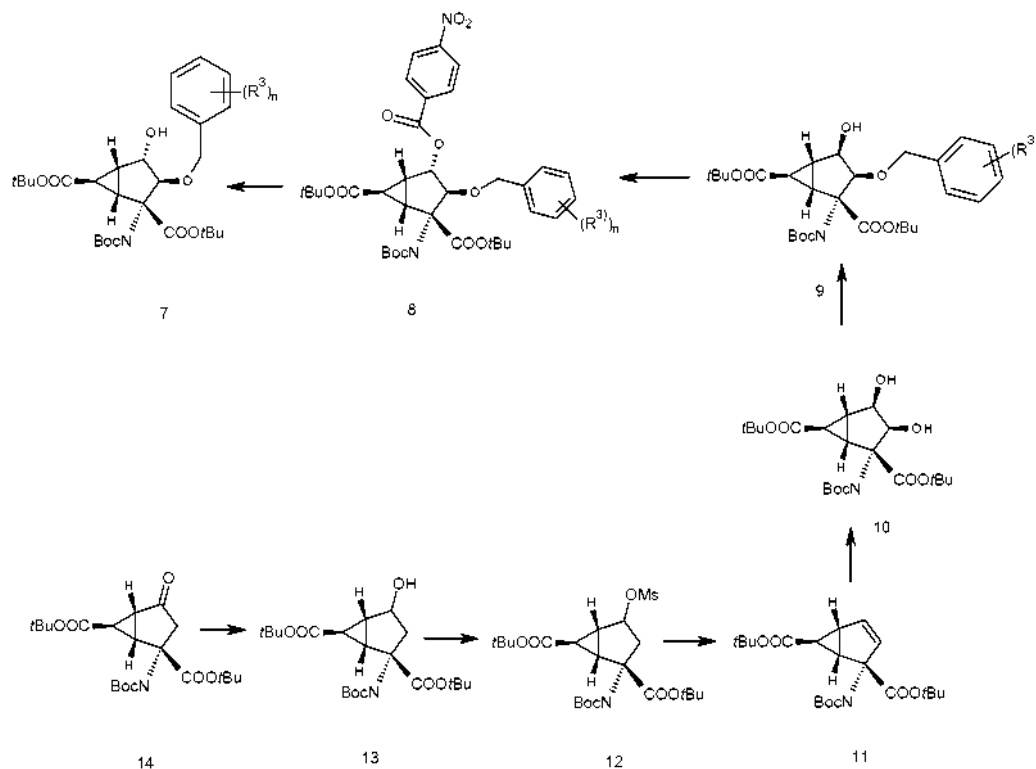


El compuesto precursor 4 activo se puede preparar como se ilustra en el Esquema II.

El compuesto 9 se hace reaccionar con cloruro de metanosulfonilo y una base adecuada tal como trietilamina en un disolvente adecuado tal como tetrahidrofurano para proporcionar el compuesto de mesilato 6. El compuesto 6 puede reaccionar con heterociclos de tiol tales como 1H-1,2,4-triazol-3-tiol y una base adecuada tal como carbonato de potasio en un disolvente tal como dimetilformamida para dar el compuesto deseado 5, en el cual R^4 es un heterociclo con enlace tio deseado. El compuesto 6 también puede reaccionar con azida sódica para dar la azida intermedia,

que se reduce a continuación con trimetilfosfina en tetrahidrofurano y agua para proporcionar una amina. La amina resultante puede formar adicionalmente una amida o carbamato deseados según procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia para proporcionar el compuesto 5, en el cual R^4 es un grupo amida o carbamato deseados. A continuación, el compuesto 5 se desprotege con un ácido adecuado tal como ácido clorhídrico o ácido acético para proporcionar el compuesto 4. Cuando R^4 es un grupo hidroxilo en el compuesto 4, el compuesto precursor 4 activo deseado se puede preparar directamente a partir del compuesto 7 eliminando todos los grupos protectores con un ácido adecuado tal como HCl en un disolvente adecuado tal como dioxano.

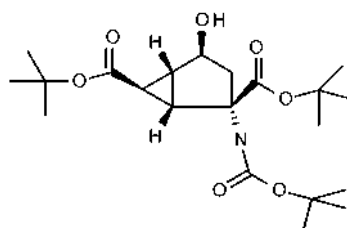
Esquema III



Los dos productos intermedios 7 y 9 clave se pueden preparar como se ilustra en el Esquema III.

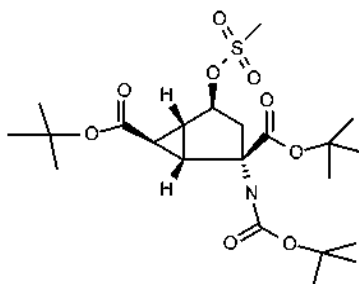
El compuesto 14 (véase el documento WO03/104217/A2 para los detalles de la síntesis) se reduce al compuesto 13 con un agente reductor adecuado como tri(sec-butil)borohidruro de litio en un disolvente adecuado tal como tetrahidrofurano. El compuesto 13 se hace reaccionar con cloruro de metanosulfonilo y una base tal como trietilamina en un disolvente adecuado tal como tetrahidrofurano para obtener el compuesto de mesilato 12, que se hace reaccionar adicionalmente con fluoruro de tetrabutamonio o *terc*-butoxido de potasio en tetrahidrofurano para dar el compuesto 11. El compuesto 11 se hace reaccionar con OsO_4 , *N*-metilmorfolina-*N*-óxido en acetona y agua para dar un compuesto de diol 10. El compuesto 10 se hace reaccionar a continuación con un haluro de bencilo adecuadamente sustituido tal como bromuro de 3,4-diclorobencilo, usando yoduro de tetra-*n*-butilamonio y óxido de plata en un disolvente adecuado tal como dimetilformamida para dar como resultado el compuesto 9. En condiciones de reacción de Mitsunobu, el compuesto 9 se hace reaccionar con ácido 4-nitrobenzoico, trifenilfosfina, y azodicarboxilato de diisopropilo en un disolvente adecuado tal como tetrahidrofurano para dar el compuesto 8. A continuación, el compuesto 8 se hace reaccionar con carbonato de potasio en un disolvente adecuado tal como metanol para proporcionar el compuesto 7.

Preparación 1: (1*S*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-[(*terc*-Butoxicarbonil)amino]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*terc*-butilo



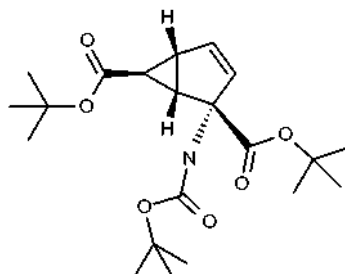
Añadir tri(sec-butil)borohidruro de litio 1 M en tetrahidrofurano (42,27 ml, 42,27 mmol) gota a gota a (1S,2S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-oxobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (7,10 g, 17,25 mmol, véase el documento WO03/104217/A2 para los detalles de la síntesis) en tetrahidrofurano (431,35 ml) a 0 °C y agitar. Después de 90 minutos, añadir cuidadosamente una solución acuosa de bicarbonato de sodio 1 M (60,07 ml, 62,11 mmol) seguido por peróxido de hidrógeno (30 % en peso, 2,64 ml, 86,27 mmol) a 0 °C. La reacción se calentó a temperatura ambiente. Después de 40 minutos, la reacción se extrajo con acetato de etilo, se lavó con una solución acuosa de ácidos cítricos al 10 % seguido por salmuera, se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentraron a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo al 5-50 % en hexano para proporcionar el compuesto del título (6,70 g, 16,20 mmol, 94 %).

Preparación 2: (1S,2S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-4-[(metilsulfonil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



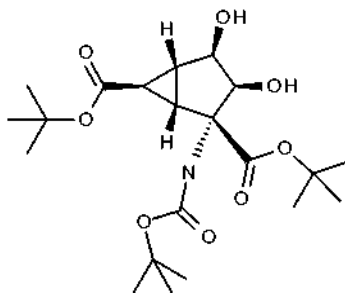
Se añadió cloruro de metanosulfonilo (224,61 µl, 2,90 mmol) a (1S,2S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-hidroxi-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (400 mg, 967 µmoles) y trietilamina (472 µl, 3,39 mmol) en tetrahidrofurano (4,84 ml) a 0 °C y se agitó. Se retiró el baño de enfriamiento y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. Diluir con agua y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, después extraer con acetato de etilo. La combinación de capas orgánicas se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el compuesto del título (600 mg, 1,22 mmol, 100 %).

Preparación 3: (1S,2S,5R,6S)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]biciclo[3.1.0]hex-3-eno-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



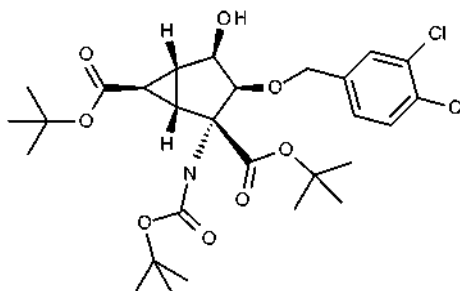
Añadir fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en tetrahidrofurano (3,84 ml, 3,84 mmol) a (1S,2S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-[(metilsulfonil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (600,00 mg, 1,22 mmol) en tetrahidrofurano (2,03 ml) y calentar a temperatura de reflujo durante 3 horas. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con agua, y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio, se filtró, y se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo al 5-75 % en hexano para proporcionar el compuesto del título (0,23 g, 0,58 mmol, 48 %).

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



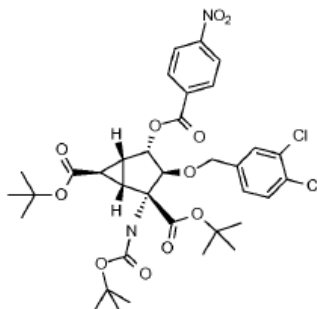
Añadir OsO₄ (2,5 %) en 2-metil-2-propanol (5,48 g, 0,54 mmol) a N-metilmorfolina-N-óxido (2,43 g, 17,97 mmol), (1S,2S,5R,6S)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]bicyclo[3.1.0]hex-3-eno-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (3,23 g, 8,17 mmol), acetona (80,66 g, 102,09 ml, 1,39 moles), y agua (40,83 ml; 40,83 g, 2,27 moles). Agitar a temperatura ambiente. Después de 5 horas, se añadió a la reacción una solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio (10 ml). Se concentró hasta la mitad del volumen a presión reducida. Diluir el concentrado con agua, extraer con acetato de etilo (3x50 ml). La combinación de capas orgánicas se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo al 5-50 % en hexano para proporcionar el compuesto del título (2,7 g, 6,3 mmol; 77 %)

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



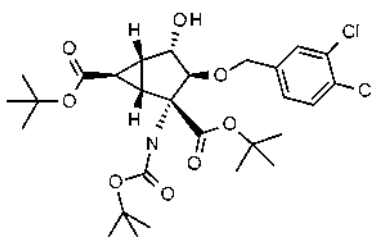
15 Añadir bromuro de 3,4-diclorobencilo (1,02 ml, 1,02 g, 4,26 mmol) a (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3,4-dihidroxibicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (1,22 g, 2,84 mmol), yoduro de tetra-n-butilamonio (1,07 g, 2,84 mmol) y óxido de plata (987,35 mg, 4,26 mmol) en dimetilformamida (17 ml) a temperatura ambiente. Agitar durante la noche. Diluir con dietil éter y hexanos (1:1), filtrar a través de celite, y después lavar con éter y hexanos (1:1). El filtrado se lavó con agua, salmuera, se secó con sulfato de magnesio, y se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, eluyendo con acetato de etilo al 0-30 %: hexanos para dar el compuesto del título (1,7 g, 2,84 mmol, 78 %): EM (m/z): 610/612 (M+Na).

20 Preparación 6: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(4-nitrofenil)carbonil]oxi]bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



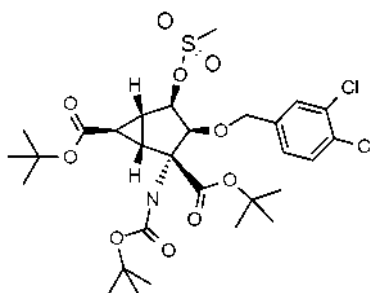
25 Trifenilfosfina (12,66 g, 48,26 mmol) y ácido 4-nitrobenzoico (8,19 g, 48,26 mmol) se añadieron a (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo de (14,20 g, 24,13 mmol) y tetrahidrofurano (241,28 ml, 2,97 moles) a temperatura ambiente. Enfriar la mezcla en un baño de hielo. Se añadió gradualmente azodicarboxilato de diisopropilo (9,57 ml, 9,76 g, 48,26 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml) y la mezcla de reacción se calentó gradualmente hasta temperatura ambiente durante la noche. Diluir con dietil éter, y a continuación lavar con una solución acuosa de carbonato de sodio. Extraer la capa acuosa de nuevo con dietil éter. Combinar todos los extractos etéreos, lavar con agua, salmuera, secar con sulfato de magnesio, y concentrar a presión reducida para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, eluyendo con acetato de etilo al 10-100 % en hexanos para dar el compuesto del título (9 g, 12,2 mmol, 51 %): EM (m/z): 759 (M+1).

35 Preparación 7: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



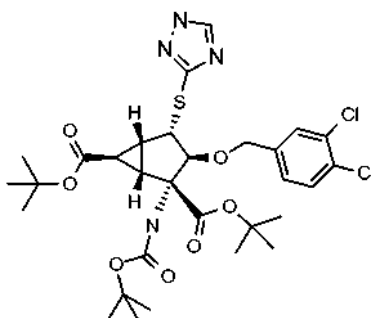
Se añadió carbonato de potasio (5,11 g, 36,60 mmol) a una solución de (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[[4-(4-nitrofenil)carbonil]oxi]bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (9,00 g, 12,20 mmol) y metanol (122,01 ml, 3,01 moles), y a continuación se agitó a temperatura ambiente. Después de 1 hora, diluir la mezcla de reacción con acetato de etilo, lavaron con agua (75 ml), salmuera (75 ml), secar con sulfato de sodio, y concentrar a presión reducida para obtener un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, eluyendo con acetato de etilo al 10-60 %: hexanos para dar el compuesto del título (5,3 g, 9,01 mmol, 74 %). EM (m/z): 610/612 (M+1).

Preparación 8: (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(metilsulfonyl)oxi]bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



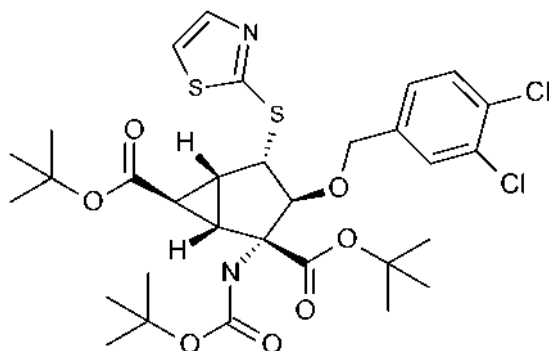
Se añadió cloruro de metanosulfonylo (0,841 ml, 1,25 g, 10,87 mmol) a (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (2,00 g, 3,40 mmol), trietilamina (1,66 ml, 1,20 g, 11,89 mmol), y tetrahidrofurano (33,98 ml, 30,11 g, 417,61 mmol) a 0 °C y se agitó. Calentar gradualmente la reacción a temperatura ambiente y agitar durante la noche. Diluir la reacción con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, después extraer con acetato de etilo (3x100 ml). La combinación de extractos orgánicos se lavó con salmuera, se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo al 5-60 % en hexano para proporcionar el compuesto del título (1,40 g, 2,10 mmol, 62 %).

Preparación 9: (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



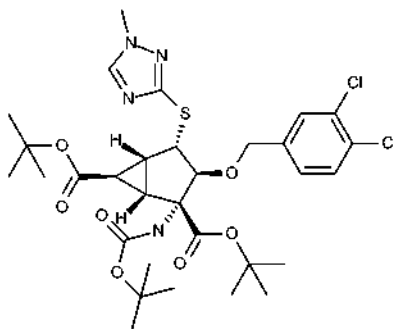
Se añadió carbonato de potasio (1,45 g, 10,50 mmol) a 1H-1,2,4-triazol-3-tiol (424,79 mg, 4,20 mmol) y dimetilformamida (10,50 ml, 9,93 g, 135,80 mmol) a temperatura ambiente y se agitó. Después de 5 minutos, se añadió (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(metilsulfonyl)oxi]bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (1,40 g, 2,10 mmol) a la reacción y se agitó a 85 °C. Después de 2 días, enfriar la reacción a temperatura ambiente, diluir con una solución saturada de bicarbonato sódico, a continuación extraer con acetato de etilo (3X). La combinación de extractos orgánicos se lavó con agua, salmuera, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo al 5-75 % en hexano para proporcionar el compuesto del título (978,0 mg, 1,46 mmol, 69 %). EM (m/z): 671/669 (M-1).

Preparación 10: (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-(1,3-tiazol-2-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



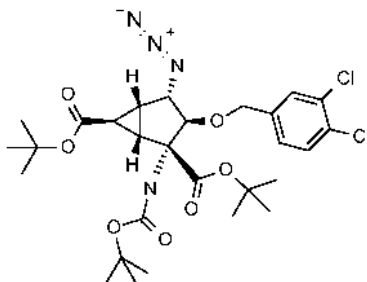
5 Este compuesto se preparó esencialmente como se describe en la Preparación 9 usando 2-mercaptotiazol. El residuo se purificó mediante cromatografía en fase normal para obtener un rendimiento del 29 % de los compuestos del título. EM (m/z): 465 (M+1).

Preparación 11: (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(1-metil-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



10 Disolver (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (0,60 g, 0,893 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (3,6 ml) en un matraz secado a la llama y enfriar a -78 °C. Añadir *t*-butóxido de potasio (0,80 g, 0,893 mmol) y agitar durante 15 minutos. Añadir yoduro de metilo (0,127 g, 0,893 mmol, pretratado por filtración a través de alúmina básica) y dejar en agitación a -78 °C durante 15 minutos. Dejar que la muestra se caliente a temperatura ambiente y después agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Verter la mezcla de reacción en bruto en agua y ajustar el pH a 6 con una solución acuosa de HCl 1 N y extraer con acetato de etilo. Secar la capa orgánica con sulfato de magnesio, filtrar y concentrar a presión reducida. Purificar mediante cromatografía ultrarrápida en fase invertida (columna C18 100 g eluyendo con acetonitrilo al 45-95 % en agua (con ácido trifluoroacético al 0,1 % en ambos casos), el compuesto se eluye a un 89 % de acetonitrilo). Combinar las fracciones deseadas y neutralizar con una solución acuosa de bicarbonato. Extraer con acetato de etilo, secar la capa orgánica con sulfato de magnesio, filtrar y concentrar a presión reducida para obtener el compuesto del título en forma de una espuma de color blanco (0,16 g, 0,23 mmol, 26 %): EM (m/z): 473/475/477 (M+1).

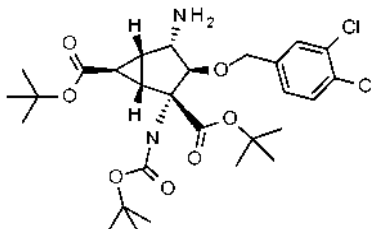
Preparación 12: (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-azido-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



25 Se añadió azida de sodio (8,29 g, 127,45 mmol) a (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(metilsulfonil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (16,99 g, 25,49 mmol) y 15-corona-5 (508,57 µl, 561,46 mg, 2,55 mmol) en dimetilformamida (254,90 ml, 240,96 g, 3,30 moles) a 85 °C y se

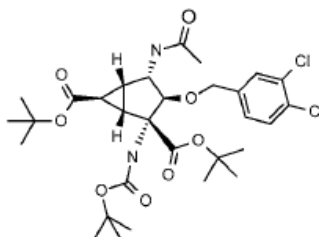
agitó. Después de 7 días, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, después se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (3X). La combinación de extractos orgánicos se lavó con agua, salmuera, se secó con sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo al 2-60 % en hexano para obtener el compuesto del título (11,2 g, 18,3 mmol, 72 %). EM (m/z): 635/637 (M+1).

Preparación 13: (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-amino-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



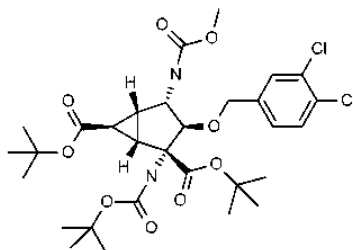
Añadir una solución de trifetilfosfina 1 M en tetrahidrofurano(19,56 ml, 19,56 mmol) a (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-azido-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (8,00 g, 13,04 mmol) en tetrahidrofurano(43,46 ml) y agua (130,39 ml) a temperatura ambiente y agitar durante la noche. Se añadió a la reacción una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, después se extrajo con acetato de etilo (3X). La combinación de capas orgánicas se lavó con salmuera, se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida, dando el compuesto del título (7,42 g, 12,63 mmol, 97 %). EM (m/z): 609/611 (M+Na).

Preparación 14: (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-(acetilamino)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



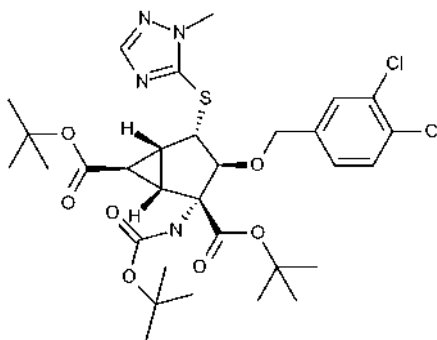
Se añadió cloruro de acetilo (334,31 µl, 368,75 mg, 4,70 mmol) en diclorometano (5 ml) a una solución enfriada en agitación de (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-amino-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (2,30 g, 3,91 mmol) y trietilamina (709,32 µl, 514,97 mg, 5,09 mmol) en diclorometano (19,57 ml) a 0 °C después se agitó. Después de 90 minutos, diluir con agua y extraer con diclorometano (3X25 ml). La combinación de extractos orgánicos se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida, dando el compuesto del título (2,40 g, 3,81 mmol, 97 %): EM (m/z): 653 (M+1).

Preparación 15: (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(metoxycarbonil)amino]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



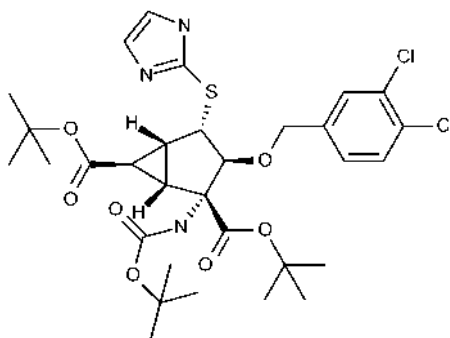
Este compuesto se preparó esencialmente como se describe en la Preparación 14 usando cloroformiato de metilo para proporcionar un 88 % del compuesto del título.

Preparación 16: (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-diclorofenil)metoxi]-4-[(2-metil-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



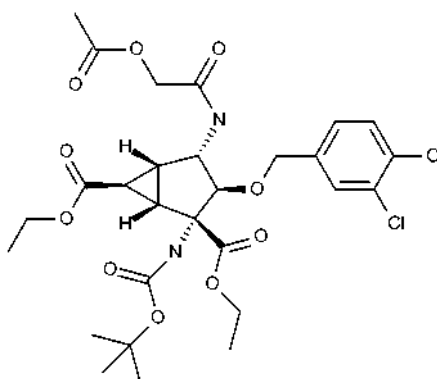
Añadir 2-metil-1H-1,2,4-triazol-3-ona (0,126 g, 1,09 mmol) y carbonato de potasio (0,35 g, 2,52 mmol) a una solución de (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(metilsulfonil)oxi]bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (0,80 g, 0,84 mmol) en dimetilformamida (1,68 ml. Tras calentar durante 2 días a 80 °C, verter la solución en salmuera y extraer con acetato de etilo tres veces, se car la combinación de fases orgánicas con sulfato de sodio, filtrar y concentrar a presión reducida. Purificar mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo al 10 % en CH₂Cl₂ para obtener el compuesto del título en forma de un aceite (0,576 g, 0,84 mmol, 100 %). EM (m/z): 685/687/689 (M+1).

Preparación 17: (1R,2R,3 S,4S,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-diclorofenil)metoxi]-4-(1H-imidazol-2-ilsulfanil)bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



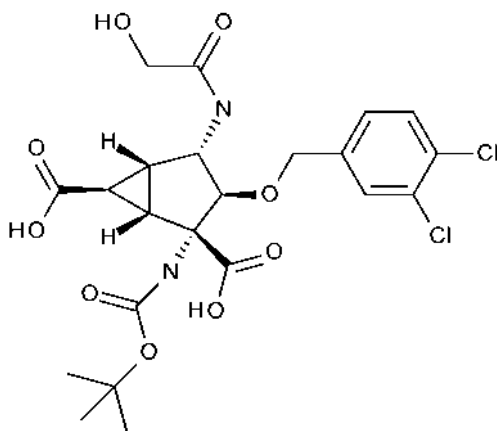
Este compuesto se preparó esencialmente como se describe en la Preparación 20 usando (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(metilsulfonil)oxi]bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo. Purificar mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo al 30-50 %: hexanos para obtener el compuesto del título con rendimiento del 38 %. EM (m/z): 671/673/675 (M+1).

Preparación 18: (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-[(2-Acetoxiacetil)amino]-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-diclorofenil)metoxi]bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo



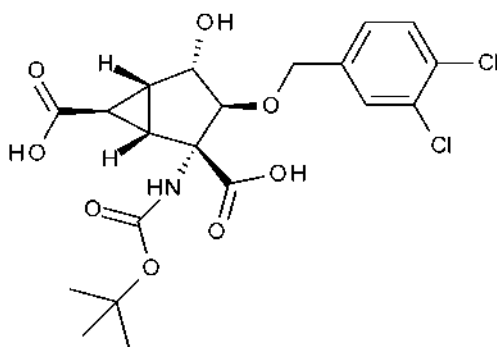
Añadir cloruro de acetoxiacetilo (0,116 ml, 1,08 mmol) a una solución de (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-amino-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-diclorofenil)metoxi]bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (0,47 g, 0,89 mmol) y diisopropiletilamina (0,32 ml, 1,83 mmol) en diclorometano (9 ml) a temperatura ambiente. Después de 2,5 horas, lavar la solución con una solución saturada de NaHCO₃ (2x), salmuera (1x), secar con MgSO₄, filtrar, y conc. a presión reducida. Purificar mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con un gradiente de acetato de etilo de 0 al 100 % en hexanos durante 30 min. para obtener el compuesto del título en forma de sólido de color blanco (0,43 g, 0,68 mmol, 76 %). EM (m/z): 531 (M+H-BOC).

Preparación 19: Ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-diclorofenil)metoxi]-4-[(2-hidroxiacetil)amino]bíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



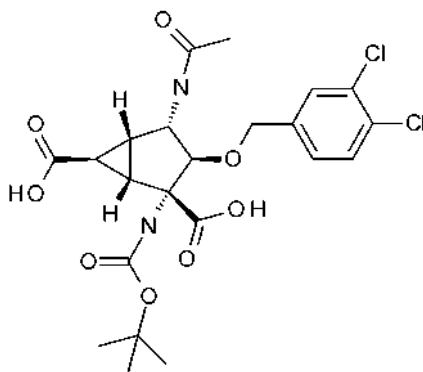
- 5 Añadir hidróxido de litio 1 M (4,0 ml, 4,0 mmol) a una solución de (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-[(2-acetoxiacetil)amino]-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-diclorofenil)metoxi]bíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (0,42 g, 0,67 mmol) en tetrahidrofurano (7,0 ml) a temperatura ambiente y agitar durante la noche. Acidificar la reacción hasta aproximadamente pH 1 con una solución acuosa de HCl 5 N. Extraer con acetato de etilo (3 x 25 ml). Secar las capas orgánicas combinadas, filtrar, y conc. a presión reducida. El análisis mediante HPLC de la mezcla de reacción en bruto muestra que queda material de partida. Añadir una solución acuosa de hidróxido de litio 1 M (4,0 ml, 4,0 mmol) a una solución de la mezcla de reacción en bruto en tetrahidrofurano (7,0 ml) y calentar a 50 °C. Después de 17 horas, acidificar la reacción hasta aproximadamente pH 1 con una solución acuosa de HCl 5 N. Extraer con acetato de etilo (3 x 25 ml). Secar los extractos combinados, filtrar, y conc. a presión reducida. Purificar mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa en fase invertida usando un gradiente del 95 % agua (con HCl al 0,03 %) / 5 % acetonitrilo hasta 5 % agua (con HCl al 0,03 %) / 95 % acetonitrilo durante 40 min para proporcionar ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-diclorofenil)metoxi]-4-[(2-hidroxiacetil)amino]bíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (0,181 g, 0,34 mmol, 51 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m/z): 531 (M-H).

Preparación 20: Ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



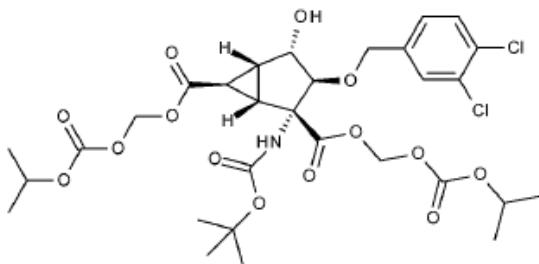
- 20 Disolver ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (2 g, 5,32 mmol) en dioxano (10,63 ml), a continuación tratar con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (10,63 ml, 6,90 mmol) y carbonato de di-*tert*-butilo (5,80 g, 26,58 mmol). Agitar la mezcla bifásica a temperatura ambiente durante 18 días, después concentró para eliminar el disolvente. Disolver el residuo resultante en acetonitrilo (ayudado con HCl 1 N) y extraer dos veces para eliminar el dicarbonato de di-*tert*-butilo. Concentrar la capa de acetonitrilo. Disolver el residuo resultante en acetato de etilo, después lavar dos veces con HCl 1 N, lavar una vez con salmuera, secar con sulfato de sodio, y concentrar a sequedad para obtener el compuesto del título (2,1 g, 4,41 mmol, 83 %). EM (m/z): 474 (M-1).

- 30 **Preparación 21:** Ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-(acetilamino)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]bíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



Este compuesto se preparó esencialmente como se describe en la Preparación 20 usando ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-(acetilamino)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico para obtener el compuesto del título con un 74 % de rendimiento. EM (m/z): 515/517 (M-1).

- 5 Preparación 22: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis{[(1-metiletoxi)carbonil]oxi}metilo



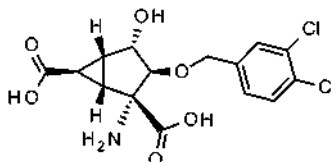
- 10 A una solución de ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (1,89 g, 3,96 mmol) en dimetilformamida (23,3 ml) se añadió carbonato de clorometilisopropilo (1,27 g, 8,33 mmol), yoduro de sodio (59,4 mg, 0,396 mmol), y carbonato de cesio (2,84 g, 8,72 mmol). Agitar la mezcla durante la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Diluir la mezcla de reacción con acetato de etilo y agua. Separar las capas. Extraer la capa acuosa dos veces con acetato de etilo. Extraer las capas orgánicas combinadas con salmuera, secar con sulfato de magnesio, filtrar y concentrar. Purificar el residuo por cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo de 0 al 75 % en hexano para proporcionar el compuesto del título en forma de una espuma (940 mg, 1,33 mmol, 33 %). EM (m/z): 732 (M+Na).

Los compuestos de la Preparación 23-26 se pueden preparar esencialmente como se describe en la Preparación 22:

Prep. N.º	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
23	(1S,2R,3S, 4S,5R,6R)-2-[(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibicyclo [3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis {[etoxicarbonil]oxi}metilo	Absoluto	58	702 (M+Na)

(continuación)				
Prep. N.º	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
24	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo [3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis{[(ciclopropilcarbonil)oxi]metilo}		55	694/696 (M+Na)
25	(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo [3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis {[2-metilpropanoil)oxi]metilo}		49	698/700 (M+Na)
26	(1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-(acetilamino)-2-[(<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[(acetiloxi)metilo]			

Ejemplo 1: Ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



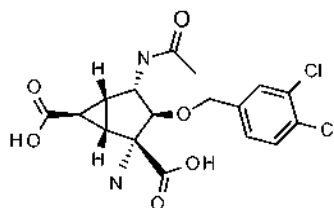
- 5 Se añadió (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (5,30 g, 9,01 mmol) a agua (30,02 ml) y ácido acético (30,02 ml). Calentar la reacción a reflujo hasta el agotamiento completo del material de partida. Enfriar y concentrar en un evaporador rotatorio. Triturar el concentrado con dietil éter, recoger el precipitado, después secar en un horno de vacío para obtener el compuesto del título (3,30 g, 8,77 mmol, 97 %). EM (m/z): 376/378 (M+1).

- 10 Los compuestos de los Ejemplos 2-3 se pueden preparar esencialmente como se describe en el Ejemplo 1:

N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
2	Ácido (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-(1H-1,2,4-triazol-3-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico		81	EM (m/z): 459/461 (M+1)

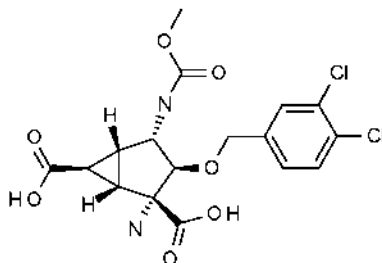
(continuación)				
N.º Ej.	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
3	Ácido (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-(1,3-tiazol-2-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico		73	EM (m/z): 475/477 (M+1)

Ejemplo 4: Ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-(acetilamino)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



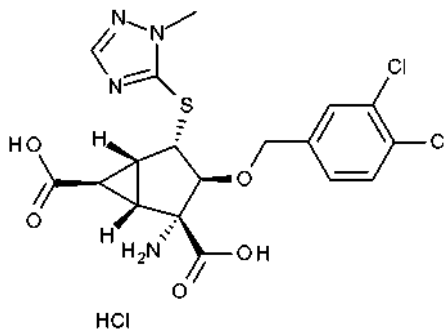
Se añadió (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-(acetilamino)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (2,40 g, 3,81 mmol) a ácido acético (7,99 g, 7,62 ml, 133,05 mmol) y agua (3,81 ml, 3,81 g, 211,60 mmol) y se calentó en un horno de microondas hasta 140 °C. Después de 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, diluir con agua y filtrar para recoger los sólidos. Secuencialmente, lavar los sólidos con agua (2x50 ml) y dietil éter (2x50 ml), y después secar en un horno de vacío para obtener el compuesto del título (1,23 g, 2,95 mmol, 77 %): EM (m/z): 417/419 (M+1).

Ejemplo 5: Ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(metoxicarbonil)amino]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



Este compuesto se preparó esencialmente como se describe en el Ejemplo 4 usando ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(metoxicarbonil)amino]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico. rendimiento del 81 %. EM (m/z): 433/435 (M+1).

Ejemplo 6: Clorhidrato del ácido (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(1-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



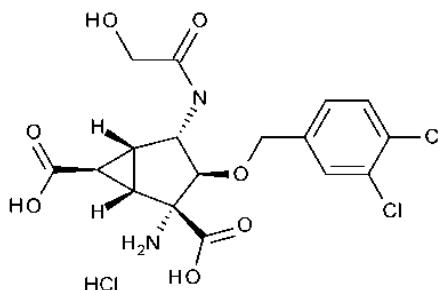
Añadir ácido acético (2,0 ml) y agua (2,0 ml) a (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-

diclorofenil)metoxi]-4-[(2-metil-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (0,305 g, 0,445 mmol) en un recipiente para horno microondas y precintar y calentar la mezcla a 140 °C durante 25 minutos. Enfriar y concentrar la mezcla a sequedad, y después añadir ácido clorhídrico 5 N (2 ml), acetonitrilo (2 ml), y transferir a un vial. Liofilizar durante la noche para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,227 g, 0,445 mmol; 95 %): EM (m/z): 473/475/477 (M+1).

Los compuestos de los Ejemplos 7-8 se pueden preparar esencialmente como se describe en el Ejemplo 6:

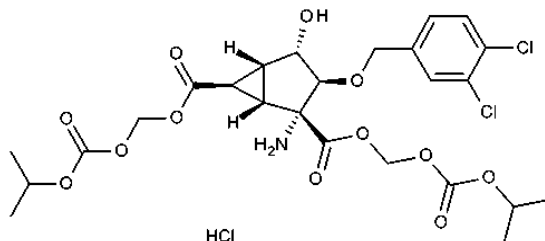
Ej. N.º	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
7	Clorhidrato del ácido (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-Amino-3-[(3,4-diclorofenil)metoxi]-4-[(1-metil-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico.		91	473/475/477 (M+1).
8	Clorhidrato del ácido (1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-(1H-imidazol-2-ilsulfanil)biciclo[3.1.0]hexano-2,6-ácido dicarboxílico		88	458/460/462 (M+1)

Ejemplo 9: Clorhidrato del ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(hidroxiacetil)amino]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



Añadir ácido clorhídrico 4 N (3,0 ml, 12,0 mmol) en 1,4-dioxano a una mezcla de ácido (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-[(3,4-diclorofenil)metoxi]-4-[(2-hidroxiacetil)amino]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (0,032 g, 0,06 mmol) en agua (0,3 ml). Lavar el sólido con acetonitrilo y dietil éter sobre un embudo de placa fritada. Secuencialmente, lavar el sólido con acetonitrilo y dietil éter y después secar de nuevo en un horno de vacío durante la noche a 50 °C para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,018 g, 0,04 mmol, 65 %). EM (m/z): 433 (M-H).

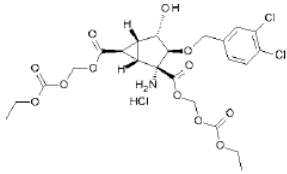
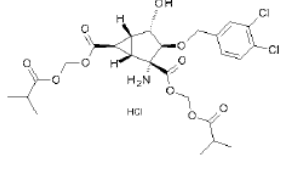
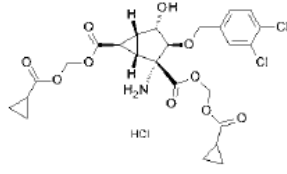
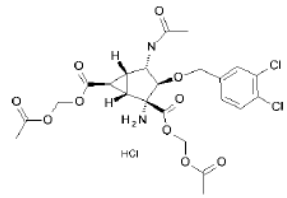
Ejemplo 10: Clorhidrato de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([(1-metiletoxi)carbonil]oxi)metilo)



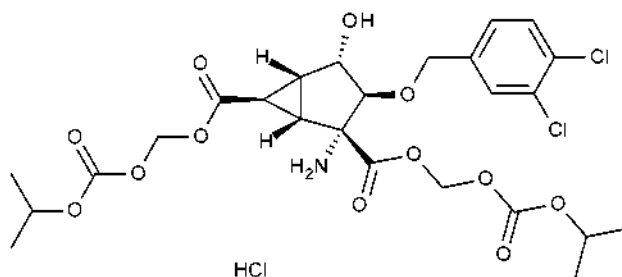
Añadir (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([(1-metiletoxi)carbonil]oxi)metilo a una solución de ácido clorhídrico 4,0 M en dioxano (14,47 ml, 57,87 mmol) y agitar durante 45 minutos. Añadir acetato de etilo, y concentrar la mezcla de reacción hasta conseguir una espuma. Triturar la espuma con acetato de etilo para producir un sólido. Concentrar y secar al vacío a

40 °C durante la noche para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color crema (1,77 g, 2,75 mmol, 95 %): EM (m/z): 608 (M-H).

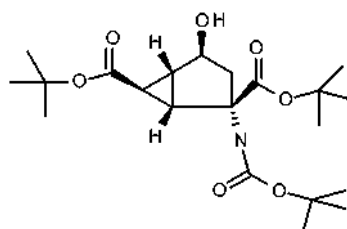
Los compuestos de los Ejemplos 11-14 se pueden preparar esencialmente como se describe en el Ejemplo 10:

Ej. N.º	Nombre químico	Estructura	Rendimiento (%)	Datos físicos EM (m/z)
11	Clorhidrato de (1S,2R,3S,4S,5R, 6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis{[(etoxicarbonil)oxi]metilo}		97	608 (M+1)
12	Clorhidrato de (1S,2R,3S,4S,5R, 6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis{[(2-metilpropanoil)oxi]metilo}		73	575/577 (M+1)
13	Clorhidrato de (1S,2R,3S,4S, 5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis{[(ciclopropilcarbonil)oxi]metilo}		97	572/574 (M+1)
14	Clorhidrato de (1S,2R,3R,4S,5R,6S)-4-(acetilamino)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]bicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis[(acetiloxi)metilo]		82	561/563 (M+1)

Ejemplo 15: Clorhidrato de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis{[(1-metiletoxi)carbonil]oxi}metilo}

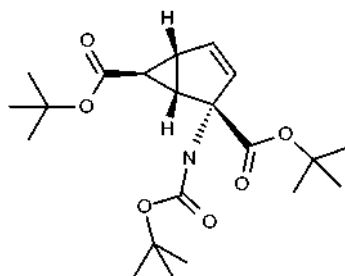


Etapas: 1: (1S,2S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-4-hidroxiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



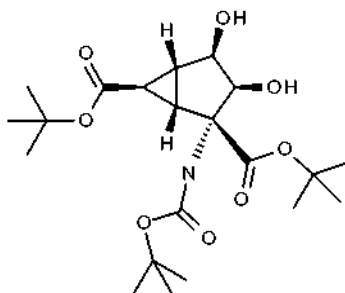
Añadir tri(sec-butil)borohidruro de litio 1 M en tetrahidrofurano (2,67 l, 2,67 mol) gota a gota a una solución de (1S,2S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-oxobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (1000 g, 2,43 mol) en tetrahidrofurano seco (10 l) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de 2 horas a 0 °C, se añadió Na₂CO₃ 2 M en agua (850 g, 8,02 mol) a 0 °C durante 2 horas, seguido de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 35 % (740 ml, 8,99 mol) en agua (3,3 l). Después de 40 minutos, la mezcla se calentó a temperatura ambiente, después de lo cual, la fase orgánica se separó. La fase orgánica se diluyó con metil *tert*-butil éter (3,5 l) y las capas se separaron de nuevo. La fase acuosa se extrajo con metil *tert*-butil éter (3,5 l). Todas las fases orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con una solución acuosa de Na₂SO₃ 1 M (2,67 l), agua (2,67 l), y salmuera (2,67 l), se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a un volumen de 3 l. El sólido precipitado se filtró y se lavó con heptano (1,3 l) para obtener el compuesto del título (864,76 g). Los licores madre se concentraron a sequedad y el residuo se trituró con heptano (500 ml) y se filtró para obtener más compuestos del título (130,64 g, total 995,4 g, rendimiento 99 %). EM (m/z): 436 (M+23).

Etapa 2: (1S,2S,5R,6S)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]biciclo[3.1.0]hex-3-eno-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



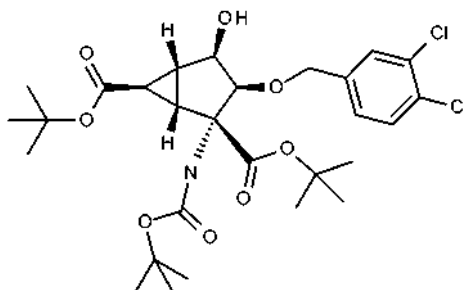
Se añadió trietilamina (735 ml, 5,30 mol) gota a gota a 0 °C bajo atmósfera de N₂ durante 40 minutos a una solución de (2S,4S)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (995,4 g, 2,41 mol) en tetrahidrofurano seco (8,4 l). Se añadió cloruro de metanosulfonilo (373 ml, 4,82 mol) a 0 °C durante 50 minutos. La reacción se calentó a 23 °C. Después de 3 horas, la reacción se filtró para eliminar la sal de clorhidrato de trietilamina. Lavar la torta de filtro con tetrahidrofurano seco (2x2 l). El filtrado (13 l) se dividió en dos partes iguales. A la mitad del filtrado, se añadió *tert*-butoxido de potasio 1 M en tetrahidrofurano (3,6 l, 3,6 mol) gota a gota a la solución obtenida en la etapa anterior (en bruto V=6,5 l, 1,2 mol) a 15 °C durante 2 horas 15 minutos después dejar calentar a 23 °C. Después de 2 horas 30 minutos, la reacción se inactivó rápidamente vertiendo en una solución acuosa de ácido acético al 10 % (950 ml). Separar las capas y extraer la capa acuosa con acetato de etilo (1,7 l). Las capas orgánicas se combinaron y se concentraron al vacío para obtener un sólido que se disolvió en acetona (1,45 l) y se añadió a agua (7,3 l). Agitar la solución resultante durante la noche a 23 °C. Eliminar el precipitado por filtración, lavar con agua (2x1 l), y secar en el horno de vacío a 40 °C para obtener el compuesto del título (450,67 g, rendimiento del 95 %). EM (m/z): 418 (M+23).

Etapa 3: (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-3,4-dihidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



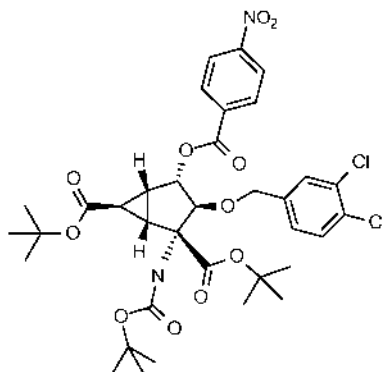
Tetróxido de osmio (4 % p/p en agua, 231,78 ml, 241,05 g, 37,93 mmol,) se añadió una solución a 23 °C de hidrato de N-metilmorfolina-N-óxido (101,62 ml; 114,83 g, 424,78 mmol), hidrato de N-metilmorfolina-N-óxido (116,88 g, 864,74 mmol), 4-metilmorfolina-4-óxido (198,88 ml; 195,50 g, 1,67 mol), y (1S,2S,5R,6S)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]biciclo[3.1.0]hex-3-eno-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (600,00 g, 1,52 mol) en acetona (12,00 l) y agua (1,80 l). La mezcla se agitó a 23 °C durante la noche. El análisis mediante cromatografía en capa fina (hexano/acetato de etilo 3:2; tinción: PMA) de la mezcla de reacción reveló un agotamiento completo del (1S,2S,5R,6S)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]biciclo[3.1.0]hex-3-eno-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo. La reacción se inactivó rápidamente con una solución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ (1 l) y se extrajo con metil *tert*-butil éter (15 l). La fase orgánica se lavó con una solución acuosa (1,5 l) preparada a partir de una solución acuosa de HCl al 37 % (300 ml) y salmuera (1,2 l), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se suspendió en heptano (1,5 l), se filtró y se lavó con heptano (2 x 500 ml), y se produjo un sólido. El sólido se secó al vacío para producir el compuesto del título (450 g, rendimiento del 69 %).

Etapa 4: (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



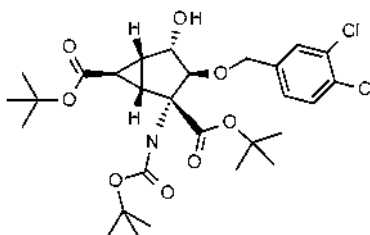
A una solución de (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-3,4-dihidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (450 g, 1,05 mol) en diclorometano (4,50 l) a temperatura ambiente se añadieron sucesivamente bromuro de 3,4-diclorobencilo (144,73 ml, 238,80 g, 995,32 mmol), cloruro de tetra-N-butilamonio (58,24 g, 209,54 mmol), y una solución acuosa al 50 % p/p de hidróxido de sodio (829,80 ml, 15,72 mol). Después de 7 horas, diluir la reacción con agua (1 l) y separar las fases. Extraer la fase orgánica con salmuera (500 ml), secar con MgSO_4 anhidro, filtrar y concentrar. Purificar el residuo por cromatografía (2,5 kg de SiO_2 ; eluyente: hexano/acetato de etilo de 12:1 a 0:1) para dar el compuesto de título (539 g, rendimiento del 72 %).

Etapa 5: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(4-nitrofenil)carbonil]oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



A una solución de (1S,2R,3S,4R,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil) amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (539,00 g, 751,00 mmol) en tetrahidrofurano (6,76 l) se añadieron trifenilfosfina (393,96 g, 1,50 mol) y ácido 4-nitrobenzoico (251,02 g, 1,50 mol). La mezcla se enfrió a 10 °C después de lo cual, azodicarboxilato de diisopropilo (40 % v/v en tolueno, 744,41 ml, 759,30 g, 1,50 mol) se añade gota a gota durante 15 minutos y se dejó calentar a 23 °C. Después de 18 horas, la mezcla se diluyó con metil *tert*-butil éter (2 l), se lavó secuencialmente con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 x 2 l) y salmuera (1 l), y se concentró al vacío. El residuo se suspendió en heptano (5 l) a 40 °C durante 30 minutos, después se enfrió a 23 °C. El sólido resultante se filtró y se lavó sucesivamente con heptano (2 x 500 ml), heptano/ metil *tert*-butil éter (3 x 1 l). Los filtrados combinados se concentraron al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía (2,5 kg de SiO_2 ; eluyente: hexano/acetato de etilo 95:5 a 75:25) seguido por recristalización en heptano (10 l/kg) para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (273 g, rendimiento del 49 %).

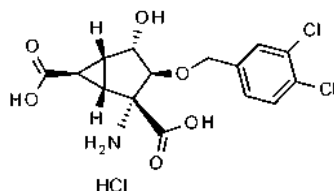
Etapa 6: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-Butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo



Se añadió carbonato de potasio (153,45 g, 1,11 mol) a una suspensión de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-[(4-nitrofenil)carbonil]oxi]biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*tert*-butilo (273,00 g, 370,11 mmol) en metanol (3,28 l) a temperatura ambiente. Después de 16 horas, la reacción

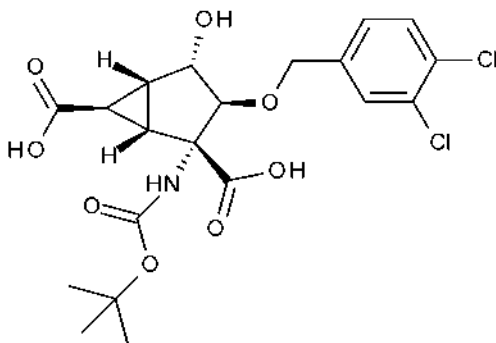
se concentró al vacío. El residuo se disolvió en metil *terc*-butil éter (2 l), y se lavó sucesivamente con agua (0,8 l), salmuera (0,8 l), se secó con MgSO_4 , y se concentró al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (215 g, rendimiento del 98 %).

Etapa 7: Clorhidrato del ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



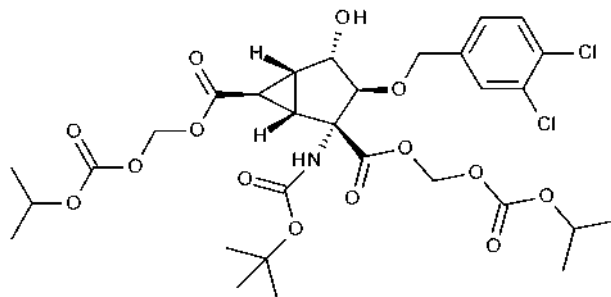
Una mezcla de agua (430 ml) y HCl al 37 % en agua (299,9 ml, 3,65 mol) se añadió a una suspensión de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*terc*-butoxicarbonil) amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de di-*terc*-butilo (215 g, 365.3 mmol) en 1,4-dioxano (73.1 ml). La suspensión resultante se agitó a 100 °C durante 4,5 horas, se enfrió a 25 °C y se concentró al vacío para proporcionar un sólido de un sólido de color blanco. Triturar sucesivamente con metil *terc*-butil éter (2 l) y hexanos (2 l) y filtrar a continuación para recoger los sólidos. Secar al vacío durante 16 horas. El sólido se volvió a lavar con metil *terc*-butil éter (2 x 1 l) y hexano (1 l), después se secó al vacío a 50 °C durante la noche para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (140,4 g, rendimiento del 93 %). EM (m/z): 376/378 (M+1).

Etapa 8: Ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*terc*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico



Trietilamina (212,80 ml, 154,49 g, 1,53 mol) y 2-*terc*-butoxicarboniloxiimino)-2-fenilacetonitrilo (125,33 g, 508,90 mmol) se añadieron sucesivamente a una suspensión de clorhidrato del ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (140 g, 339 mmol) en 1,4-dioxano (203,56 ml), y agua (0.6 ml/mmol-puro-LR, 203,56 ml), a temperatura ambiente. Después de 4,5 horas, añadir más cantidad de 2-(*terc*-butoxicarboniloxiimino)-2-fenilacetonitrilo (25,07 g, 101,78 mmol) y trietilamina (23,64 ml, 17,17 g, 169,63 mmol) a la reacción y agitar a 50 °C durante la noche. Enfriar a 23 °C, diluir con agua (500 ml), y lavar con metil *terc*-butil éter (6 x 500 ml). Diluir la fase acuosa con una solución acuosa de HCl al 10 % (300 ml; final pH = 2) y extraer con acetato de etilo (2 x 500 ml). Los extractos de acetato de etilo se secaron con MgSO_4 y se concentraron al vacío para proporcionar el compuesto del título (148,3 g, rendimiento del 92 %).

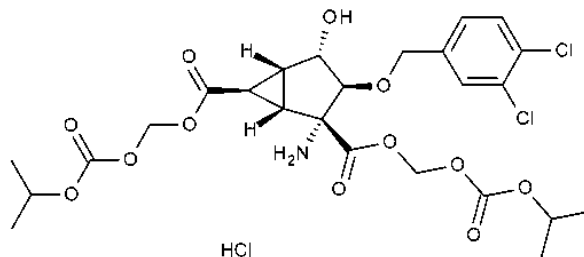
Etapa 9: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*terc*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(((1-metiletoxi)carbonil)oxi)metilo



A una solución de (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*terc*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis(((1-metiletoxi)carbonil)oxi)metilo (148,30 g, 311,35 mmol) en dimetilformamida (2,49 l) a 23 °C se añadieron sucesivamente carbonato de potasio (172,12 g, 1,25 mol), carbonato

de clorometilisopropilo (118,03 ml; 135,73 g, 871,79 mmol) y yoduro de sodio (9,33 g, 62,27 mmol). Agitar durante 18 horas. Diluir con metil *tert*-butil éter (2 l) y agua (2 l). Separar las capas y lavar la fase orgánica sucesivamente con agua (200 ml) y salmuera (200 ml). Secar con MgSO₄ anhidro, filtrar y concentrar al vacío. Purificar el residuo por cromatografía (2,5 kg de SiO₂; eluyente: hexano/acetato de etilo de 3:1 a 1:1) para proporcionar el compuesto de título (167 g, rendimiento del 76 %): EM (m/z): 608/610 (M-100 (-CO₂tBu)).

Etapa 10: (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([[(1-metiletoxi)carbonil]oxi]metilo)



(1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([[(1-metiletoxi)carbonil]oxi]metilo) (165,50 g, 233,58 mmol) se trató con HCl 4 M en 1,4-dioxano (1,16 l, 4,63 mol) a 23 °C y se agitó durante 2 horas. Los componentes volátiles se eliminaron al vacío. El residuo obtenido se suspendió en metil *tert*-butil éter (1200 ml) durante la noche. El sólido resultante se filtró, se lavó con metil *tert*-butil éter (2 x 100 ml), y se secó al vacío a 1 mbar/45 °C durante 6 horas para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (134 g, rendimiento del 89 %). EM (m/z): 608/610 (M+1)

Los datos de la literatura (Kit, Jeffrey M., and 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, pág. 20-36.) y los datos generados en estudios no clínicos con animales respaldan un papel de los antagonistas de mGlu2/3 en el tratamiento de trastornos depresivos y trastornos de somnolencia excesiva. Específicamente, se ha descubierto que los antagonistas del receptor mGlu2/3 son eficaces en modelos de roedor de los trastornos depresivos y estimulan la vigilia usando roedores vigilados por EEG sin hiperactividad desproporcionada o clínicamente relevante o hipersomnolencia excesiva de compensación. La mayor aleta se manifiesta en un aumento en la atención, mejora del rendimiento cognitivo, y posibilidad de fatiga reducida. Como los trastornos anteriormente descritos representan estados clínicos comórbidos, un antagonista del receptor mGlu2/3 puede ser especialmente eficaz en poblaciones de pacientes específicos, tales como pacientes con trastorno depresivo mayor, depresión resistente al tratamiento, depresión unipolar, distimia y/o ciclotimia, o cualesquiera trastornos de somnolencia excesiva. Los trastornos de somnolencia excesiva pueden incluir, aunque no de forma limitativa, somnolencia diurna excesiva (SDE), hipersomnia asociada con apnea del sueño obstructiva o narcolepsia, trastornos del ritmo circadiano del sueño (incluido, aunque no de forma limitativa, a trastorno del sueño por cambio de turno de trabajo, trastorno por cambio de la zona horaria (jet lag), trastorno de fase del sueño retrasada, trastorno del sueño de fase avanzada, y síndrome de fase del sueño no de 24 horas), hipersomnolencia idiopática y somnolencia excesiva asociada con sueño no restaurador (SNR).

Para demostrar adicionalmente las características de los presentes compuestos, los compuestos representativos se pueden estudiar en los siguientes ensayos *in vitro* e *in vivo*:

Ensayos con los antagonistas de AMPc de los receptores mGlu2 y mGlu3

La actividad antagonista se sometió a ensayo en células AV12 que expresaban de forma estable los receptores mGlu2 y mGlu3 humanos, y el transportador de glutamato de rata EAAT1 (Transportador de aminoácido excitador 1). Las líneas celulares se mantuvieron por cultivo en DMEM con elevado contenido en glucosa y clorhidrato de piridoxina suplementado con suero de feto de bovino dializado al 5 % (FBS), piruvato de sodio 1 mM, HEPES 1 mM y l-glutamina 1 mM; como antibióticos de selección se usaron geneticina e higromicina B. Los cultivos confluentes se hicieron crecer a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 6,5 % y se realizaron pases quincenalmente. Las células se recogieron usando tripsina al 0,25 %, se suspendieron en medio de congelación (FBS con DMSO al 10 %) a 10⁷ células/ml, y las alícuotas se almacenaron en nitrógeno líquido. Veinticuatro horas antes del ensayo, las células se sembraron en placas a una densidad de 8.000-10.000 células por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos tratada, con media superficie de color negro (Costar 3875) en 50 µl de DMEM con elevado contenido en glucosa y clorhidrato de piridoxina suplementado con suero de feto de bovino dializado al 5 % (FBS), piruvato de sodio 1 mM, HEPES 1 mM, 100 µg/ml de ampicilina y 250 µM (mGlu2) o 125 µM (mGlu3) de L-glutamina.

La inversión de la inhibición de la producción de AMPc estimulada por forskolina realizada por los compuestos experimentales se midió usando tecnología de fluorescencia resuelta en tiempo homogénea (HTRF; Cisbio n.º cat.

62AM4PEB). El medio se eliminó, y las células se incubaron con 100 μ l de tampón de estimulación de AMPc (STIM) durante 30 minutos a 37 °C. (El tampón STIM contiene 500 ml de HBSS, 1000 ml de DPBS, BSA al 0,034 %, HEPES 1,67 mM e IBMX 500 μ M (Sigma 15879).) Los compuestos se estudiaron en curvas de respuesta a la concentración de 10 puntos usando diluciones seriadas 3X seguido por una dilución adicional de 40 veces en tampón STIM. DCG IV (Tocris 0975) sirve como el agonista de referencia. La mezcla de reacción final contiene 1 μ M (para mGlu2) o 3 μ M (para mGlu3) de forskolina (Sigma F6886), DCG IV a su CE_{90} , y hasta 25 μ M del compuesto experimental. Las células se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. Para medir los niveles de AMPc, conjugado AMPc-d2 y conjugado anti-AMPc-criptato en tampón de lisis se incubaron con las células tratadas a temperatura ambiente durante 1 hora (mGlu2) o 1,5 h (mGlu3). La señal de HTRF se detectó usando un lector de placas Envision (Perkin-Elmer) para calcular el cociente de fluorescencia de 665 a 620 nM. Los datos brutos se convirtieron en cantidad de AMPc (pmol/pocillo) usando una curva patrón de AMPc generada para cada experimento. Los valores de CI_{50} relativos se calcularon por el intervalo superior-inferior de la curva de respuesta a la concentración usando un programa de ajuste a la curva logística de cuatro parámetros (ActivityBase v5.3.1.22).

Ensayos FLIPR y AMPc para determinar la selectividad del receptor mGlu

Las potencias agonistas relativas de los compuestos de la invención para los otros receptores mGlu humanos se puede evaluar bien con un ensayo AMPc o un ensayo fluorimétrico de respuesta al calcio (véase por ejemplo, Fell y col., JPET (en prensa)). En resumen, en estos estudio se utilizaron las líneas celulares AV12 individuales que contienen el transportador de glutamato EAAT1 de rata y que expresan de forma estable los receptores mGlu1, 2, 3, 4, 5, 6, y 8 humanos. Los receptores mGlu1 y 5 están acoplados a Gq, por lo que de forma natural realizan la señalización a través de la fosfolipasa C, lo que produce una respuesta de flujo de calcio que se pueden utilizar para medir la activación usando un lector de placas mediante formación de imagen fluorométrica (FLIPR, Molecular Devices). Las líneas de células que expresan los receptores mGlu2, 3, 4, y 8 se diseñaron para expresar la subunidad $G\alpha_{15}$ de forma que estos receptores acoplados a Gi generarán una respuesta de flujo de calcio similar a la de las líneas celulares que expresan los receptores mGlu1 y 5. El receptor mGlu6 se estudió en un formato de AMPc usando procedimientos análogos a los desarrollados para mGlu2 y mGlu3 anteriores. Estas líneas de células se mantienen como se ha descrito anteriormente salvo que las cantidades de L-glutamina y agentes de selección (geneticina, higromicina B, zeocina, y blasticidina) puede variar dependiendo de la línea de células. Se realizaron pases quincenalmente de los cultivos confluentes.

Los niveles de calcio intracelular se vigilaron mediante FLIPR antes y después de la adición de los compuestos experimentales y colorante Fluo-3 AM (Invitrogen) o Calcium 4 (Molecular Devices), dependiendo de la línea de células. Las células se sembraron en placas 24 horas antes del ensayo en una concentración variable de glutamina y en una densidad variable de células por pocillo, dependiendo de la línea de células. El medio se eliminó, y las células se incubaron con 8 μ M de colorante (50 μ l por pocillo) durante 90 o 120 minutos (dependiendo de la línea de células) a 25 °C. Se llevó a cabo un ensayo de adición única de FLIPR, que genera una curva de respuesta a la concentración de 11 puntos para el glutamato agonista, antes de cada experimento, para confirmar la sensibilidad adecuada de las células. Los resultados se analizaron mediante GraphPad Prism v4.03 para calcular las concentraciones de glutamato necesarias para inducir las respuestas CE_{90} (ensayo de antagonista) y CE_{10} (ensayo de potenciador).

Los compuestos se sometieron a ensayo para cada receptor mGlu en un ensayo de dos adiciones de FLIPR usando un perfil de respuesta a la concentración de 10 puntos comenzando a una concentración final de 25 μ M para el ensayo de agonista y de 12,5 μ M para los ensayos del potenciador y el antagonista. La primera adición detecta cualquier actividad agonista, y la segunda adición consiste en 100 μ l de concentraciones seleccionadas (dependiendo de la línea de células) de glutamato en tampón de ensayo, generando una CE_{10} o CE_{90} de respuesta al glutamato. Los efectos agonistas se cuantifican como porcentaje de estimulación inducida por el compuesto solo, con respecto a la máxima respuesta al glutamato. Los efectos antagonistas se cuantifican calculando la inhibición porcentual de la CE_{90} de respuesta al glutamato producida por el compuesto. Los efectos de potenciación se cuantifican como porcentaje de aumento en presencia de la CE_{10} de respuesta en glutamato con respecto a la $CE_{m\acute{a}x}$ de respuesta. Todos los datos se calculan como valores relativos de CI_{50} o CE_{50} usando un programe de ajuste a la curva logística de cuatro parámetros (ActivityBase v5.3.1.22).

La actividad antagonista en células mGlu6 se midió usando AMPc en un procedimiento análogo al descrito anteriormente para la actividad de mGlu2 y mGlu3, salvo que el agonista de referencia fue L-AP4 (Tocris). Para medir la actividad agonista de mGlu6, se calculó la extensión en la cual el compuesto inhibe la producción de AMPc estimulada por forskolina. Los valores relativos de CI_{50} y CE_{50} se calcularon para el intervalo superior-inferior de la curva de respuesta a la concentración usando un programa de ajuste a la curva logística de cuatro parámetros (ActivityBase v5.3.1.22).

Los compuestos ilustrativos en los que R^1 y R^2 son ambos hidrógeno se sometieron a ensayo esencialmente como se ha descrito anteriormente y se descubrió que tenían una fuerte potencia antagonista de los receptores mGlu2 y mGlu3. También se descubrió que los compuestos ilustrativos en los que R^1 y R^2 son ambos hidrógeno eran antagonistas selectivos de los receptores mGlu2 y mGlu3 respecto de otros subtipo del receptor mGlu, con valores de CI_{50} para los receptores mGlu2 y mGlu3 menores de 70 nM y 50 nM, respectivamente, mientras que los valores de CI_{50} para otros receptores de mGlu sometidos a ensayo fueron significativamente mayores. Véase la Tabla 1.

Tabla 1. Datos de selectividad

Ej.	mGlu1 % inhib. a 12,5 μ M	CI50 mGlu2 nM	CI50 mGlu3 nM	mGlu4 % inhib. a 12,5 μ M	mGlu5 % inhib. a 12,5 μ M	CI50 mGlu6 nM	mGlu8 % inhib. a 12,5 μ M
1	-0,47 %	43,3 $\pm$ 5,8	27,2 $\pm$ 4,2	28,5 %	4,8 %	3300	78,4 % (CI50 1900 nM)
2	8,6 %	13,1 $\pm$ 1,9	7,8	69,0 %	-12,9 %	1290 $\pm$ 162	92,3 % (CI50 507 nM)
3	ND	25,4 $\pm$ 4,8	10,8	ND	ND	2480 $\pm$ 295	ND
4	-2 %	25,5 $\pm$ 2,8	8,2 $\pm$ 0,3	13,3 %	22,6 %	2640 $\pm$ 424	23,4 %
5	ND	16,8 $\pm$ 1,6	9,5 $\pm$ 4,6	ND	ND	1580 $\pm$ 141	ND
6	ND	18,6 $\pm$ 3,9	13,9 $\pm$ 2,4	ND	ND	1360 $\pm$ 433	ND
7	11,2 %	52 $\pm$ 17,9	34,8 $\pm$ 6,9	32,2 %	22,7 %	3690	46,7 %
8	ND	42,9 $\pm$ 1,8	26,0 $\pm$ 0,5	ND	ND	2580	ND
9	5 %	22 $\pm$ 3,0	4,4 $\pm$ 0,5	46,9 %	13,8 %	2820	13,3 %
ND = no determinado							

Adicionalmente, algunos compuestos de la presente invención muestran una falta de actividad significativa en otros receptores fisiológicamente relevantes tales como, aunque no de forma limitativa, el canal hERG, receptores de la serotonina (específicamente 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B}), receptores muscarínicos (específicamente M2), y receptores iGluR (específicamente iGluR5). El compuesto del ejemplo 1 se sometió a ensayo usando procedimientos de ensayo conocidos y se descubrió que no tenía actividad apreciable con dichos receptores.

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

Ensayo de natación forzada en ratones (mFST)

El mFST es un ensayo *in vivo* bien caracterizado de la actividad antidepresiva (Li y col. J Pharmacol Exp Ther. 319(1):254-9, 2006.). Los ratones tratados con antidepresivos conocidos clínicamente eficaces (inhibidores de la recaptación de serotonina y/o antidepresivos tricíclicos) presentan el comportamiento de un tiempo reducido en inmovilidad después de introducirse en un tanque de agua, un comportamiento asociado con la desesperación. El mFST se utilizó para evaluar la actividad potencial de tipo antidepresivo de los novedosos antagonistas de mGlu2/3 esencialmente como se ha descrito en procedimientos publicados anteriormente (véase, por ejemplo, Li y col. J Pharmacol Exp Ther. 319(1):254-9, 2006.). En resumen, se usaron ratones NIH-Swiss macho (Harlan Sprague-Dawley, Indianápolis, IN), con peso entre 25-30 g. Los animales alojados en grupos se llevaron desde el animalario hasta la zona de ensayo en sus propias jaulas, y se dejó que se adaptaran al nuevo entorno al menos 1 h antes de realizar las pruebas. Los compuestos donde R¹ y R² son ambos hidrógeno se disolvieron en agua con una cantidad mínima de NaOH para su disolución y se administraron i.p. Los compuestos donde R¹ y/o R² son diferentes de hidrógeno se prepararon el día de uso en N-metil-pirrolidinona al 2,0-2,5 % y posteriormente se suspendieron en HEC al 1 %, Tween 80 al 0,25 %, y antiespumante Dow al 0,05 %, y se administraron por vía oral. Los ratones se colocaron en un cilindro (diámetro: 10 cm; altura: 25 cm) lleno con 6 cm de agua (22-25 °C) durante 6 min. Se puntuó la duración de la inmovilidad durante los últimos 4 min del periodo de 6 cm del ensayo. Se registró que un ratón está inmóvil cuando flota sin movimientos o realiza solo los movimientos necesarios para mantener la cabeza por encima del agua.

Los compuestos representativos se sometieron a ensayo esencialmente como se ha descrito anteriormente y se descubrió que reducían significativamente los tiempos de inmovilización en ratones naturales. Véase la Tabla 2. Por tanto, se espera que los compuestos de la invención tengan actividad antidepresiva *in vivo*.

Tabla 2. mFST

Ejemplo	DE ₆₀ (mg/kg)	Disminución máxima (1 compuesto/control)* 100 %
1	1,0 (i.p.)	59 %
2	2,08 (i.p.)	62 %
3	8,2 (i.p.)	47 %
4	9,5 (i.p.)	38 %
5	7,45 (i.p.)	56 %
6	7,3 (i.p.)	47 %
7	>10 (i.p.)	18 %
8	9,1 (i.p.)	41 %
9	9,68 (i.p.)	41 %
10/15	22,1 (p.o.)	50,5 %
11	51,5 (p.o.)	32,9 %
12	>28 (p.o.)	7 %
13	11,3 (p.o.)	62,8 %

En otros experimentos, se estudiaron ratones con eliminaciones en el receptores (ratones con mGlu2 desactivado genéticamente); estos ratones se reprodución mediante reproducción heterocigoto x heterocigoto y se usaron como compañeros de camada para comparaciones entre ratones -/- y +/+ (Taconic Farms). El compuesto del ejemplo 1 (10 mg/kg, i.p., 30 min antes) disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad en ratones mGlu2+/-, pero no en ratones mGlu2-/- . De forma similar, el compuesto del ejemplo 10/15 (30 mg/kg, po, 120 min antes) disminuyó el tiempo de inmovilidad en ratones mGlu2+/-, pero no en ratones mGlu2-/- . Estos hallazgos demostraron adicionalmente que el receptor mGlu2 contribuye a los efectos de tipo antidepresivo de los compuestos de la invención.

Los compuestos de la invención también se pueden someter a ensayo junto con otros compuestos útiles para el tratamiento de trastornos depresivos, como por ejemplo SSRI, para determinar su capacidad para potenciar los efectos de tipo antidepresivo respecto de cualquier compuesto en solitario. El compuesto del ejemplo 10 (17 mg/kg p.o.) se sometió a ensayo en la prueba de natación forzada en ratones, en solitario y junto con fluoxetina (10 mg/kg, i.p.) y se descubrió que aumentaba significativamente el efecto de tipo antidepresivo respecto al de cada uno de los compuestos en solitario, como se muestra en la Tabla 3, a continuación. Adicionalmente, el análisis de los niveles en cerebro y en plasma del resto diácido activo del compuesto del ejemplo 10 (es decir, el mismo compuesto que la base libre del ejemplo 1), no mostró aumento en los niveles de exposición, lo que respalda el hallazgo de que el aumento de la actividad de tipo antidepresivo no se debe a un aumento en la exposición central al compuesto.

Tabla 3. mFST con SSRI

Compuesto(s)	Tiempo de inmovilización (s)	Error estándar de la media	Disminución máxima (1 compuesto/control)* 100 %
Vehículo	174	10	
Ejemplo 10	105	12	24,5 %
Fluoxetina	161	8	7,6 %
Ej. 10 + Fluoxetina	66	19	62,1 %

Seguimiento del estado de vigilia y la conducta en ratas: Los compuestos representativos de la presente invención se estudiaron en ratas para determinar su capacidad de aumentar la cantidad de progestina en estado de vigilia sin efectos indeseados tales como la inhibición del sueño REM, alteración del motor del despertar (hiperlocomoción o

hipolocomoción desproporcionada), y/o hipersomnia de rebote. Los animales de ensayo se vigilaron continuamente mediante electroencefalogramas (EEG), electromiogramas (EMG), y movimiento para medir el tiempo de vigilia acumulado, hipersomnia de rebote e intensidad de la actividad locomotora durante el estado de vigilia. Los procedimientos para este tipo de estudios son conocidos en la técnica (véanse, 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, Mashour GA, Poe GR. Open-source logic-based automated sleep scoring software using electrophysiological recordings in rats. *J Neurosci Methods*. 2009; 184(1): 10-8.) Los estudios se realizaron de la siguiente forma:

Preparación de los animales. Ratas Wistar macho adultas (de aproximadamente 270-300 g en el momento de la cirugía) se equiparon quirúrgicamente para un registro crónico de EEG, EMG, temperatura corporal, y movimiento, de la siguiente forma: Las ratas se prepararon quirúrgicamente con un implante craneal que consistía en cuatro tornillos de acero inoxidable para registro de EEG (dos frontales [3,9 mm anterior respecto a la bregma, y $\pm 2,0$ mm mediolateralmente] y dos occipitales [6,4 mm posterior respecto a la bregma, $\pm 5,5$ mm mediolateralmente]), y con dos cables de acero inoxidable revestidos con teflón para el registro de EMG (situado bajo los músculos trapeciales de la nuca). Todas las puntas se soldaron a un conector en miniatura (Microtech, Boothwyn, PA) antes de la cirugía. El conjunto de implantes se fijó al cráneo mediante la combinación de los tornillos de acero inoxidable par registro de EEG, cianoacrilato aplicado entre el conector del implante y el cráneo, y acrílico dental. La temperatura corporal y la actividad locomotora se registraron mediante un transmisor en miniatura (Minimitter PDT4000G, Philips Respironics, Bend, OR) introducido quirúrgicamente en el abdomen. Se dejaron transcurrir al menos 3 semanas para recuperación.

Entorno de registro. Cada rata se alojó individualmente en una jaula de microaislamiento modificada con un elevador superior de filtro de policarbonato para permitir más espacio vertical. Un cable flexible, que restringe mínimamente el movimiento, se conectó por un extremo a un conmutador fijado a la parte superior de la jaula y, por el otro, al implante craneal del animal. Cada jaula se colocó en un compartimiento independiente ventilado de una cámara de registro de sueño-despertar de acero inoxidable. El alimento y el agua estuvieron disponibles *ad libitum* y la temperatura ambiente se mantuvo a aproximadamente 23 ± 1 °C. Durante la totalidad del estudio se mantuvo un ciclo de luz-oscuridad de 24 horas (LD 12:12) usando luz fluorescente. La humedad relativa promedio fue de aproximadamente el 50 %. Los animales no se molestaron durante al menos 30 h antes y después de cada tratamiento.

Diseño del estudio y dosificación. Los compuestos donde R^1 y R^2 son ambos hidrógeno se disolvieron en agua con una cantidad mínima de NaOH para su disolución y se administraron i.p. en un volumen de 1,0 ml por kg de peso corporal. Los compuestos donde R^1 y/o R^2 son distintos de hidrógeno se administraron p.o. en un volumen de 2 ml por kg de peso corporal en uno de dos vehículos alternativos: i) N-metil-2-pirrolidinona al 2,5 % en hidroxietilcelulosa; o ii) 10 % de goma arábiga con antiespumante Dow Corning® Antifoam al 0,05 % en agua. El vehículo o uno de los niveles de dosis del compuesto se administraron pseudoaleatoriamente para que ninguna rata recibiera el mismo tratamiento dos veces, y que ninguna rata recibiera más de dos de los 8 tratamientos en cualquiera de los estudios. Cada rata se sacó de su jaula durante aproximadamente un minuto para determinación del peso y aplicación del tratamiento. Un periodo de descanso terapéutico mínimo de 6 días precede y sigue a cada tratamiento.

Recopilación de los datos. La discriminación entre los estados de sueño y vigilia se puede automatizar (por ejemplo, Van Gelder y col. 1991; Edgar y col. 1997, Winrow y col., 2010; Gross y col., 2009). EEG se amplifica y se filtra (X10,000, paso de banda 1-30 Hz), EMG se amplifica y se integra (paso de banda 10-100 Hz, integración RMS), y la actividad locomotora no específica se supervisa simultáneamente. Los estados de excitación se clasifican en tramos de 10 segundos como sueño no REM, sueño REM, estado de vigilia, o estado de vigilia de theta predominante. La actividad locomotora (LMA) se registra como cuentas por minuto y se detecta mediante receptores de telemetría comercialmente disponibles (ER4000, Minimitter, Bend, OR).

Análisis estadístico. Las edades y pesos corporales se resumen por la media, mínimo y máximo para los grupos de tratamiento. Todos los animales que tuvieron al menos un resultado se incluyeron en los resultados del resumen (por ejemplo, los inventores incluyen datos adecuados para el tratamiento de un animal cuyos datos de telemetría son de utilidad, pero los datos del EEG no lo son). El periodo de observación posterior al tratamiento se dividió en 2 intervalos posteriores a la dosificación (las primeras 7 horas, y las primeras 19 horas) donde el tiempo de dosificación se define como el inicio de la Hora = 0. Los resultados se resumen para cada periodo calculando bien el valor horario promedio o el valor acumulado para cada periodo. Cada resultado de cada periodo se analizó mediante el análisis de la covarianza usando los datos del grupo de tratamiento y del tratamiento como los factores y el correspondiente intervalo previo al tratamiento, 24 h anterior, como la covariable. Las medias ajustadas y la media del cambio con respecto al vehículo y sus correspondientes errores estándar se resumen para cada grupo de tratamiento. Los valores p de Dunnett para comparación múltiple se muestran para cada resultado en cada periodo. No todos los resultados se analizaron para todos los periodos, como se muestra en la Tabla 1, lo que afecta por tanto, a la tasa de error experimental de tipo I. Como tal, no se realizaron ajustes adicionales para múltiples ensayos.

Determinación de la eficacia. El umbral de la dosis eficaz se estimó como la dosis más baja para la que el tiempo de vigilia acumulado supera 50 minutos con respecto a los controles tratados con vehículo durante las primeras 7 horas después del tratamiento. Se puede realizar una determinación más fina realizando estudios posteriores de dosis más estrechamente separadas alrededor de la dosis eficaz.

Determinación de los efectos no deseables. En particular, se evaluaron dos efectos potencialmente no deseables: hipersomnolencia de rebote y actividad motora intensificada (Edgar DM, Seidel WF, 1997).

(i) La hipersomnolencia de rebote se puede medir como una disminución en los niveles de vigilia durante el periodo de 8-19 horas después de las dosis de tratamiento eficaces. Una disminución biológicamente significativa se define como más del 50 por ciento del aumento acumulado durante las primeras 7 horas. Por lo tanto, si la vigilia aumenta en 100 minutos durante las primeras 7 horas, entonces una disminución en la vigilia acumulada de 50 minutos o más, con respecto a los controles tratados con vehículo, durante el periodo de 8-19 horas después del tratamiento se consideraría biológicamente significativa. Los cambios medios del grupo, mostrados en la Tabla 2, muestran una falta de hipersomnolencia de rebote.

(ii) La intensificación de la actividad motora se define como un aumento promedio respecto a los controles tratados con vehículo que supere 5 cuentas de LMA por minuto durante la vigilia definida por EEG al a dosis umbral de eficacia, y cuyos efectos están relacionados con la dosis. Los aumentos en la medio del grupo de la Tabla 2 están todos por debajo de las 5 cuentas por minuto durante la vigilia y no son dependientes de la dosis.

Los compuestos ilustrativos se sometieron a ensayo esencialmente como se ha descrito y se descubrió que estimulaban el estado de vigilia sin una hipersomnolencia de rebote significativa o intensificación de la actividad motora. Los compuestos ilustrativos donde R¹ y R² son ambos hidrógeno (administrados i.p.) se sometieron a ensayo esencialmente como se ha descrito y se descubrió que eran eficaces a dosis de 10 mg/kg o menores. El compuesto del Ejemplo 10 se sometió a ensayo esencialmente como se ha descrito y se descubrió que tenía el perfil acumulado de tiempo de vigilia y la intensidad de la actividad locomotora que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.

<u>Tiempo de vigilia acumulado para las primeras 7 horas</u>				
Dosis (mg/kg PO)	N	Media	DE	P
60	9	64,7	13,9	<0,0001
30	8	48,8	14,4	0,0019
10	10	20,4	13,4	0,1387
<u>Tiempo de vigilia acumulado para las 8-19 horas</u>				
Dosis (mg/kg PO)	N	Media	DE	P
60	9	34,7	12,4	0,0087
30	8	25,6	13,6	0,0696
10	10	15,2	12,3	0,2257
<u>Intensidad de la actividad locomotora (nota 1)</u>				
Dosis (mg/kg PO)	N	Media	DE	P
60	6	4,2	2,0	0,0427
30	5	0,5	2,1	0,8199
10	6	2,7	2,0	0,1999

Resultados estadísticos: Los valores medios representan la diferencia respecto de los controles tratados con vehículo. DE= Error estándar del promedio; P = valor P ajustado para múltiples contrastes para la variable de eficacia. Los valores P sin ajustar se muestran para las medidas de 'efecto no deseable' (tiempo de vigilia acumulado para las 8-19 horas, e Intensidad de la actividad locomotora). El tiempo de vigilia acumulado se proporciona en minutos. *Nota 1.* Intensidad de la actividad locomotora (LMA) = cuentas de LMA por minuto durante la vigilia definida por EEG, promediada para las primeras 7 horas después del tratamiento.

Aunque es posible administrar los compuestos utilizados en los procedimientos de la presente invención directamente sin ninguna formulación, los compuestos se suelen administrar en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como principio activo, y al menos un transportador diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

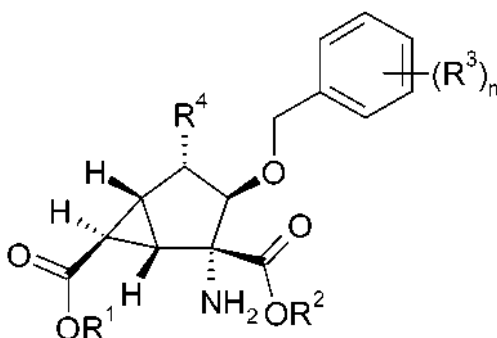
Estas composiciones se pueden administrar mediante una variedad de vías incluidas la oral, subcutánea, intravenosa, e intramuscular. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (University of the Sciences in Philadelphia, ed., 21ª ed., Lippincott Williams & Wilkins Co., 2005). Los Compuestos de Fórmula I donde R¹ y/o R² son diferentes a hidrógeno se prefieren para administración por vía oral para mejorar la biodisponibilidad, mientras que los Compuestos de Fórmula I donde R¹ y R² son ambos hidrógeno se prefieren para administración i.v. o i.p.

Las composiciones se formulan preferentemente en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosificación de aproximadamente 1 a aproximadamente 600 mg, de forma más habitual de aproximadamente 30 a aproximadamente 300 mg, como por ejemplo entre aproximadamente 50 y aproximadamente 250 mg del principio activo. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con al menos un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de Fórmula I son generalmente eficaces para un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones diarias normalmente están comprendidas en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg, más habitualmente de aproximadamente 0,3 a 5,0 mg/kg, y como por ejemplo, entre 0,5 y 3,0 mg/kg de peso corporal. En algunos casos pueden ser más que adecuados niveles de dosificación por debajo del límite inferior del anteriormente reseñado, mientras que, en otros casos, se pueden utilizar dosis aún más grandes sin producir ningún efecto secundario perjudicial y, por tanto, el intervalo de dosificación anterior no pretende limitar el ámbito de la invención en forma alguna. Se entenderá que la cantidad del compuesto administrada realmente será determinada por un médico, según las circunstancias relevantes, incluyendo la dolencia que se va a tratar, la ruta de administración escogida, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



en la que R¹ y R² son cada uno independientemente hidrógeno, alcoxi C₁-C₃ carboniloximetilo, alquil C₁-C₃ carboniloximetilo, o cicloalquil C₃₋₆ carboniloximetilo;

R³ es, independientemente en cada aparición, metilo, flúor, o cloro;

R⁴ es hidroxilo, metilcarbonilamino, hidroximetilcarbonilamino, metoxycarbonilamino, imidazol-2-ilsulfanilo, tiazol-2-ilsulfanilo, 1,2,4-triazolilsulfanilo, 1-metil-1,2,4-triazol-3-ilsulfanilo, o 1-metil-1,2,4-triazol-5-ilsulfanilo; y n es 1 o 2;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que n es 2, ambos grupos R³ son cloro, y los grupos cloro están en las posiciones 3 y 4 del fenilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 o 2 en el que R¹ y R² son cada uno hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. El compuesto de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 o 2 en el que R¹ y R² son ambos diferentes de hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 o 2 en el que R¹ y R² son iguales y son diferentes de hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 en el que R¹ y R² son cada uno isopropiloxycarboniloximetilo.

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es ácido (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-2-amino-3-[(3,4-diclorobencil)oxi]-4-hidroxibiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de bis([[(1-metiletoxi)carbonil]oxi]metilo) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de trastornos depresivos.

12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de trastornos de somnolencia excesiva.

13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en una combinación simultánea, independiente o adicional junto con un inhibidor de la recaptación de serotonina en el tratamiento de trastornos depresivos en un mamífero.

14. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 en el que el inhibidor de la recaptación de serotonina es fluoxetina.

15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un inhibidor de la recaptación de serotonina.