

ms

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-167101- -00000-0000

Fecha: 2014-07-31 16:28:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 16

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

T=F=S.

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: AGONISTAS DE MGLU 2/3

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

DIRECCIÓN: Lilly Corporate Center, Indianápolis, Indiana 46285.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 31 de julio de 2014



No. 14-167101- -00000-0000

Fecha: 2014-07-31 16:28:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 16

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2014/000092

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ELI LILLY AND COMPANY

Dirección: Lilly Corporate Center, Indianapolis,
IN 46285 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2013/023529

Fecha

Enero 29, 2013

Publicación Internacional No. WO2013/116174

Fecha

Agosto 8, 2013

6

Título(54) AGONISTAS DE MGLU 2/3

Clasificación Internacional (51) C07C 271/18, C07C 271/24, C07C 229/50, C07C
237/04, A61K 31/16, A61K 31/325, A61K 31/195, A61K 31/215, A61P 25/18, A61P 29/00
C07C 323/25.

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

US

(32) Fecha

Febrero 01, 2012

Abril 02, 2012

(31) Número de Solicitud

12382038.3

61/619,139

9

Comprobante de pago No. 14-

Fecha

10

ANEXOS?☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☒

Declaraciones. Bajo la regla 4.17. (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

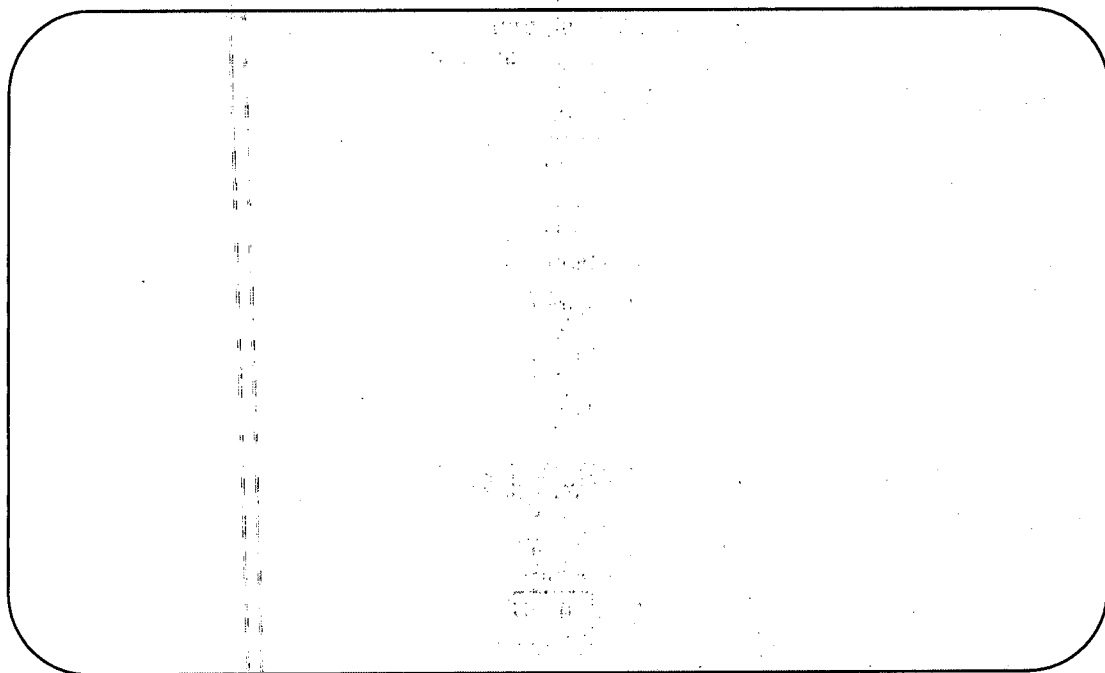
☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79. 782.747Bta T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES**PCT/US2013/023529****Stephen Richard BAKER**

P. O. Box 6288

Indianapolis, Indiana 46206-6288

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Británica

Christopher David BEADLE

P. O. Box 6288

Indianapolis, Indiana 46206-6288

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Británica

Barry Peter CLARK

P. O. Box 6288

Indianapolis, Indiana 46206-6288

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Británica

James Alle MONN

P. O. Box 6288

Indianápolis, Indiana 46206-6288

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Estadounidense

Lourdes PRIETO

P. O. Box 6288

Indianapolis, Indiana 46206-6288

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Española

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0078630

Bogotá D.C., Julio 24 de 2014 - 13:23:04

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	632304175	23/07/2014	13.906.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	515.000.00	515.000.00
			\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-167101- -00000-0000

Fecha: 2014-07-31 16:28:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 24 de 2014 - 13:23:09

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: <u>14</u> / <u>7</u> / <u>31</u> AAAA MM DD	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		Recorrido: 4	
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-167101	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD ☒
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

El cd anexo contiene un total de Archivos:
 (10) Archivos en formato PDF, los cuales
 fueron procesados en el folio (5) correctamente.

Paola



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-167101-00000-0000

Fecha: 2014-07-31 16:28:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 5/6

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2014/000092

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ELI LILLY AND COMPANY

Dirección: Lilly Corporate Center, Indianapolis,
IN 46285 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2013/023529

Fecha Enero 29, 2013

Publicación Internacional No. WO2013/116174

Fecha Agosto 8, 2013

6

Título(54) AGONISTAS DE MGLU 2/3

Clasificación Internacional (51) C07C 271/18, C07C 271/24, C07C 229/50, C07C
237/04, A61K 31/16, A61K 31/325, A61K 31/195, A61K 31/215, A61P 25/18, A61P 29/00
C07C 323/25.

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

US

(32) Fecha

Febrero 01, 2012

Abril 02, 2012

(31) Número de Solicitud

12382038.3

61/619,139

9

Comprobante de pago No. 14-

Fecha

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☒

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2013/023529

Stephen Richard BAKER

P. O. Box 6288

Indianapolis, Indiana 46206-6288

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Británica

Christopher David BEADLE

P. O. Box 6288

Indianapolis, Indiana 46206-6288

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Británica

Barry Peter CLARK

P. O. Box 6288

Indianapolis, Indiana 46206-6288

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Británica

James Alle MONN

P. O. Box 6288

Indianápolis, Indiana 46206-6288

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Estadounidense

Lourdes PRIETO

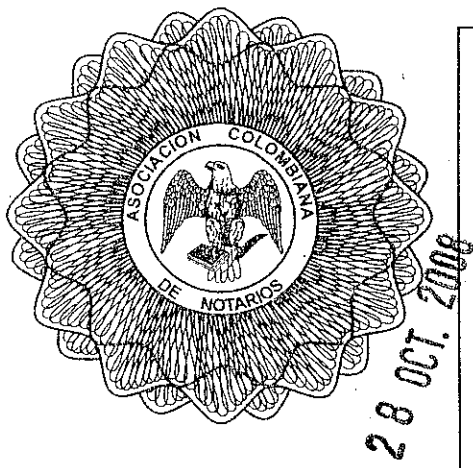
P. O. Box 6288

Indianapolis, Indiana 46206-6288

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Española

WK 9397304



ESCRITURA PUBLICA NUMERO : (1 2 2 7)

MIL DOSCIENTOS VEINTISIETE

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, a los Veintiocho -- (28) días del mes de Octubre -- -- del año dos mil ocho (2008), ante mi MARIA EUGENIA

ROJAS DE URUETA NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos:-----

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE PODER.-----

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS Y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA.-----

C.C. No. 79.376.996 Y 79.782.747.-----

Comparecieron JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS, mayor de edad vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.376.996 de estado civil casado con sociedad conyugal vigente y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA, mayor de edad, vecino de Bogotá, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.782.747, de estado civil casado con sociedad conyugal vigente, obrando en sus propios nombres y dijeron:-----

PRIMERO.- Que presentan para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en cinco (5) folios autenticados, un poder y sus traducciones los cuales son del siguiente tenor:-----

PODER-----

El suscrito ELI LILLY AND COMPANY, domiciliado en Lilly Corporate Center, Indianápolis, Indiana 46285 US por medio del

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri, poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de patentes, modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial o extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones y demandas que por motivo de encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultades para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.-----

Firma (ilegible) -----

Fecha 17 July 2003 -----

City, Country/ Ciudad, País: Indianápolis, Indiana, United Status of America.- -----

Traducccion oficial del Inglés por Marlén Neira Castro resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia.- -----

APOSTILLA EN PODER DE DE REPRESENTACION DE ELI LILLY
AND COMPANY.

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapoles, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Meter G. Stringer, Director Ejecutivo y patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.- -----

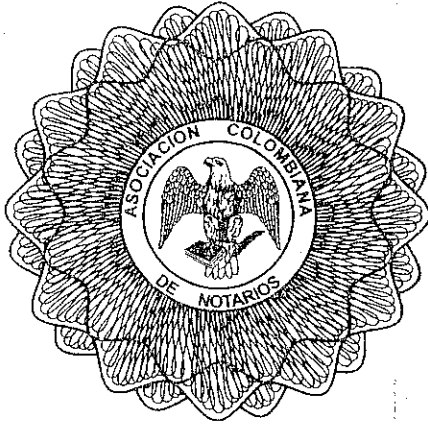
Todd Rokita Secretario de Estado -----

Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana -----

APOSTILLA

(Convencion de la Haya del 5 octubre 1961)

WK 9397305



1. País: Estados Unidos de América-
este documento público -----
2. Ha sido firmado por: Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario
de la Corte del Circuito en y para el
condado Jonson -----
- 4 Lleva el sello del Secretario de la Corte
del Circuito en y para el estado de Indiana -----

Certificado

5. En: Indianapoles, Indiana -----
6. El: 22 de julio de 2003.-----
7. Por el Secretario de Estado de Indiana 8 No. A2003-1279-----
9. Gran Sello del Estado de Indiana -----
10. Firma ilegible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana
- * Vigente desde el 1 de mayo de 2003, todas las apostillas de
Secretario y de Estado de Indiana tienen el sello impreso
electrónicamente. -----
- The Statehouse, Indianapoles, Indiana 46204, (307) 232-6531, fax
(317) 233-3283- -----

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario
Catherine Michel certifica que Meter G. Stringer, domiciliado en
7620 Castleton Faros, West Drive Indianápolis, Indiana- 46256
Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes
Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianápolis,
Indiana, Estados Unidos.--

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial inglés-
Español- Inglés-----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.- -----

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento:
Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de
Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité Ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.-----

Firma del notario público Catherine Michel certifica sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008- residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana.-----

Es traducción fiel de inglés, con copia archivo para confrontación, Bogotá 28 de julio-2003.-----

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial Inglés-Español- Inglés -----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.- -----

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

Se advierte que la protocolización de documentos no da mayor fuerza o autenticidad de la que tienen dichos documentos.----

Esta escritura pública fue firmada fuera del Despacho Notarial, de conformidad con el artículo 12 del Decreto 2.148 de 1.983. -----

Se advirtió a los otorgantes de esta escritura de la obligación que tienen de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto, en consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma de (el, los) otorgante(s) y de la notaría, en tal caso, este (os) debe(n) ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial y sufragada por los mismos (artículo 35, decreto ley 960 de 1970).-----

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
ELI LILLY AND COMPANY

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Peter G. Stringer, Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.

Todd Rokita Secretario de Estado
Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América- Este documento Público
2. ha sido firmado por Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario de la Corte del Circuito en y para el condado Johnson
4. Lleva el sello del Secretario de la Corte del Circuito en y para el estado de Indiana

CERTIFICADO

5. En Indianapolis, Indiana
6. El 22 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado de Indiana
8. No. A2003- 1127
9. Gran Sello del Estado de Indiana
10. Firma legible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana

* Vigente desde el 1 mayo de 2003, todas las apostillas del Secretario de Estado de Indiana tienen el sello impreso electrónicamente.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, fax (317) 233-3283

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario Catherine Michel certifica que Peter G. Stringer, domiciliado en 7620 Castleton Farms, West Drive, Indianapolis, Indiana - 46256 Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos.


MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento: Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.

Firma del notario público Catherine Michel certifica

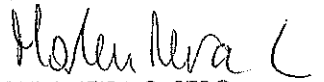
Sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008 - residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana

--

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 28 de julio-2003.

Marlen Neira C



MARLEN NEIRA CASTRO

Traductor e Intérprete Oficial

Inglés - Español - Inglés

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER – TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 US

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents, Utility Models and Industrial Designs** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma

Date/Fecha: / 7 July 2003

City,Country/Ciudad,País: Indianapolis, Indiana, United States of America

Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de **Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

NOTARIA VERIFICADA
BOGOTÁ - República de Colombia



Todd Rokita
Secretary of State

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA



APOSTILLE

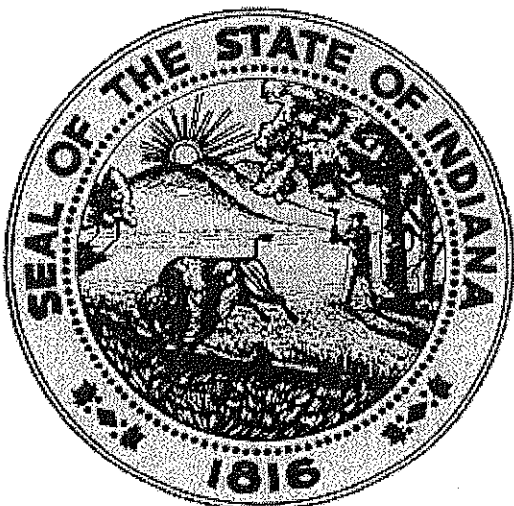
(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Catherine Michel*
3. acting in the capacity of circuit court clerk in & for *Johnson County*
4. and bears the seal/stamp of circuit court clerk in & for the State of Indiana

Certified

5. at Indianapolis, Indiana
6. this *Twenty-second day of July, 2003*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. *A2003- 11279*
9. Seal/Stamp:

10. Signature:




Todd Rokita

Indiana Secretary of State

*Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, Fax (317) 233-3283

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
/ 7 July 2003
The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in
7620 Castleton Farms, West Drive,
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Executive Director, International
Patents
of ELI LILLY AND COMPANY

3. That ELI LILLY AND COMPANY
having its principal place of business located in
Indianapolis, Indiana, United States of
America

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Delegation of Authority Concerning Certain
Patent Matters, executed January 20, 2003;
pursuant to the authority granted to the
General Counsel of the Company by the
executive Committee of the Board of
Directors of Eli Lilly and Company

NOTARY PUBLIC (Signature):



Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

Peter G. Stringer

mayor de edad y domiciliado
Indianapolis, Indiana 46256 US
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de

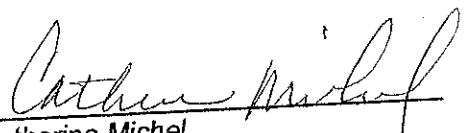
de

4. Que
con sede principal ubicada en

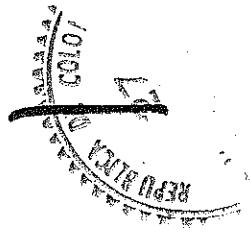
está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):


Catherine Michel
My Commission Expires October 21, 2008
Resident of Johnson County

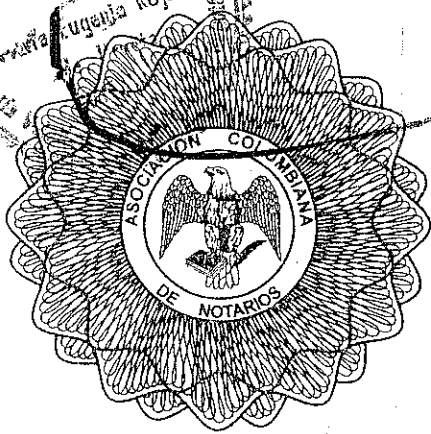
NOTARIO PUBLICO
Catherine Michel
Notario Eugenio Rojas de Hueta



ESPACIO EN BLANCO

ESPACIO EN BLANC

WK 9397306



ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y
AUTORIZACION.- Leído el presente
instrumento por el (los) compareciente
(s) y advertido (s) sobre las
formalidades legales, lo aprueban y
firman conmigo y ante mí la(el)
Notaria(o) quién lo autoriza. ---Se

utilizaron las hojas de papel Notarial Nos. WK 9397304, WK 9397305 Y
WK 9397306 .

DERECHOS LEGALES: \$ 39.630.00

RESOLUCION 8850 DE 2007

IVA \$ 10.781.00

James Ian Raisbeck Llínas

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS

C.C.No. 79.376.996 BOGOTA

TEL: 601-7700

Carlos Reinaldo Olarte Garcia

CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

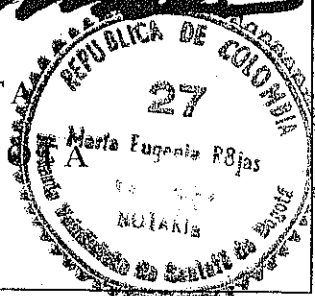
C.C.No. 79.782.747 BOGOTA.

TEL: 601-7700

Maria Eugenia Rojas de Urqueta

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOGOTÁ

redb.



ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

Es fiel y Segunda ^(2ª)
fotocopia de la Escritura Pública No. 1227
de fecha 28 de Octubre de 2008
tomada de su original que expido en
Seis (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 28 OCT 2008
El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá



ESPACIO EN BLANCO

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application ELI LILLY AND COMPANY is entitled to claim priority of earlier application No. 12382038.3 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from BAKER, Stephen Richard to ELI LILLY AND COMPANY, dated 31 January 2012 (31.01.2012)
VIII-3-1(i v)		an assignment from BEADLE, Christopher David to ELI LILLY AND COMPANY, dated 30 January 2012 (30.01.2012)
VIII-3-1(i v)		an assignment from CLARK, Barry Peter to ELI LILLY AND COMPANY, dated 30 January 2012 (30.01.2012)
VIII-3-1(i v)		an assignment from MONN, James Allen to ELI LILLY AND COMPANY, dated 30 January 2012 (30.01.2012)
VIII-3-1(i v)		an assignment from PRIETO, Lourdes to ELI LILLY AND COMPANY, dated 30 January 2012 (30.01.2012)

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-3-2	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application ELI LILLY AND COMPANY is entitled to claim priority of earlier application No. 61/619,139 by virtue of the following:
VIII-3-2(i v)		an assignment from BEADLE, Christopher David to ELI LILLY AND COMPANY, dated 30 January 2012 (30.01.2012)
VIII-3-2(i v)		an assignment from CLARK, Barry Peter to ELI LILLY AND COMPANY, dated 30 January 2012 (30.01.2012)
VIII-3-2(i v)		an assignment from MONN, James Allen to ELI LILLY AND COMPANY, dated 30 January 2012 (30.01.2012)
VIII-3-2(i v)		an assignment from PRIETO, Lourdes to ELI LILLY AND COMPANY, dated 30 January 2012 (30.01.2012)
VIII-3-2(i v)		an assignment from BAKER, Stephen Richard to ELI LILLY AND COMPANY, dated 31 January 2012 (31.01.2012)

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application ELI LILLY AND COMPANY is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i)		ELI LILLY AND COMPANY is entitled as employer of the inventor, BEADLE, Christopher David
VIII-2-1(i)		ELI LILLY AND COMPANY is entitled as employer of the inventor, MONN, James Allen
VIII-2-1(i)		ELI LILLY AND COMPANY is entitled as employer of the inventor, PRIETO, Lourdes
VIII-2-1(i)		ELI LILLY AND COMPANY is entitled as employer of the inventor, BAKER, Stephen Richard
VIII-2-1(i)		ELI LILLY AND COMPANY is entitled as employer of the inventor, CLARK, Barry Peter



(51) International Patent Classification:

C07C 271/18 (2006.01) A61K 31/195 (2006.01)
 C07C 271/24 (2006.01) A61K 31/215 (2006.01)
 C07C 229/50 (2006.01) A61P 25/18 (2006.01)
 C07C 237/04 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
 A61K 31/16 (2006.01) C07C 323/25 (2006.01)
 A61K 31/325 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2013/023529

(22) International Filing Date:

29 January 2013 (29.01.2013)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

12382038.3 1 February 2012 (01.02.2012) EP
 61/619,139 2 April 2012 (02.04.2012) US

(71) Applicant: ELI LILLY AND COMPANY [US/US];
Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(72) Inventors: BAKER, Stephen, Richard; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US). BEADLE, Christopher David; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US). CLARK, Barry Peter; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US). MONN, James Allen; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US). PRIETO, Lourdes; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US).

(74) Agents: HOSTETTLER, Danica et al.; Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

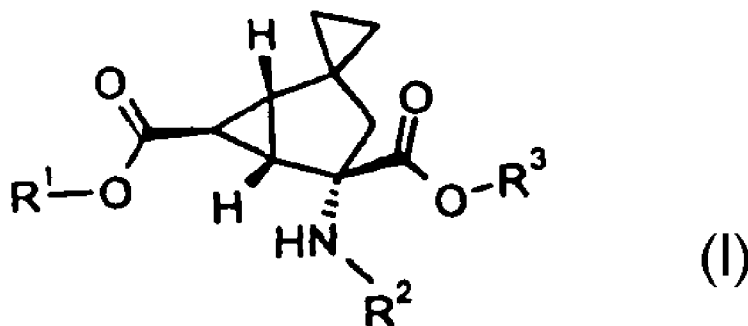
Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: MGLU 2/3 AGONISTS



(57) Abstract: The present invention provides novel mGlu2/3 agonists of formula (I) useful in the treatment of neurological or psychiatric disorders.

-1-

MGLU 2/3 AGONISTS

The present invention relates to mGlu2/3 agonists, more specifically, to a novel 4-substituted bicyclo[3.1.0]hexane and prodrugs thereof, pharmaceutical compositions thereof, and therapeutic uses thereof.

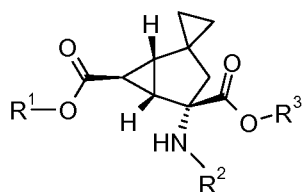
L-Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system and is referred to as an excitatory amino acid. The metabotropic glutamate (mGlu) receptors are G-protein-coupled receptors that modulate neuronal excitability. Treatment of neurological or psychiatric disorders has been linked to selective activation of mGlu excitatory amino acid receptors. More particularly, studies demonstrate that mGlu2/3 agonists have analgesic, antipsychotic, anxiolytic, antidepressant, and neuroprotective properties. Therefore, these properties of mGlu2/3 agonists may be useful in the treatment of neurological disorders, such as chronic pain conditions, or psychiatric disorders, such as schizophrenia, bipolar disorder, also known as manic depressive disorder, generalized anxiety disorder, and post traumatic stress disorder.

WO9717952 discloses certain 4-substituted bicyclo[3.1.0]hexane compounds asserted to be excitatory amino acid receptor antagonists.

Excessive glutamatergic tone has been implicated in many disease states of the central nervous system; however, effective agents to correct such pathophysiological states are lacking in clinical practice. In particular, clinical application has not been realized due to a lack of mGlu2/3 agonists with appropriate drug-like properties. Thus, there still exists a need for potent, efficacious mGlu2/3 agonists. The present invention provides a novel 4-substituted bicyclo[3.1.0]hexane, and prodrugs thereof, that are potent and effective mGlu2/3 agonists. Particular prodrugs within the scope of the present invention are well absorbed after oral administration and subsequently hydrolyzed to release the active metabolite into the systemic circulation and, therefore, are suitable for clinical development. Such new compounds of the present invention could address the need for potent, effective treatments of neurological disorders, such as chronic pain conditions including persistent pain, neuropathic pain, chronic inflammatory pain, or visceral pain, or psychiatric disorders, such as schizophrenia, bipolar disorder, generalized anxiety disorder, or post traumatic stress disorder.

The present invention provides a compound of Formula I

-2-



Formula I

wherein

R^1 is hydrogen, R^2 is hydrogen, and R^3 is hydrogen;

5 R^1 is hydrogen, R^2 is (2*S*)-2-aminopropanoyl, and R^3 is hydrogen;

R^1 is hydrogen, R^2 is (2*S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl, and R^3 is hydrogen;

R^1 is hydrogen, R^2 is 2-aminoacetyl, and R^3 is hydrogen;

R^1 is benzyl, R^2 is hydrogen, and R^3 is benzyl; or

R^1 is (2-fluorophenyl)methyl, R^2 is hydrogen, and R^3 is (2-fluorophenyl)methyl;

10 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The present invention provides (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

As a particular embodiment, the present invention provides (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid.

15 As a particular embodiment, the present invention provides the hydrochloric acid salt of (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid.

The present invention provides (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

20 As a particular embodiment, the present invention provides (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride.

As a particular embodiment, the present invention provides (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid; 1,4-dioxane (1: 0.5); hydrochloride.

25

-3-

The present invention provides (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[(*2S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

As a particular embodiment, the present invention provides (*1S,2S,5R,6S*)-2-
5 [[(*2S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride.

The present invention provides (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2-aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

10 As a particular embodiment, the present invention provides (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2-aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride.

The present invention provides dibenzyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a
15 pharmaceutically acceptable salt thereof.

As a particular embodiment, the present invention provides dibenzyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate; 1,4-dioxane; hydrochloride.

The present invention provides bis[(2-fluorophenyl)methyl] (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a
20 pharmaceutically acceptable salt thereof.

As a particular embodiment, the present invention provides bis[(2-fluorophenyl)methyl] (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate hydrochloride.

25 The present invention provides a pharmaceutical composition comprising (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(*2S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[(*2S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-
30 dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2-aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid,

-4-

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, dibenzyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, or bis[(2-fluorophenyl)methyl] (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, together with a pharmaceutically acceptable carrier and optionally other therapeutic ingredients.

The present invention provides a pharmaceutical composition comprising (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2*S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2-aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, dibenzyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, or bis[(2-fluorophenyl)methyl] (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient.

The present invention provides a method of treating a neurological or psychiatric disorder, comprising administering to a patient in need thereof an effective amount of (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2*S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2-aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, dibenzyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, or bis[(2-fluorophenyl)methyl] (*1S,2S,5R,6S*)-2-

-5-

aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The present invention provides the use of (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2*S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2-aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, dibenzyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, or bis[(2-fluorophenyl)methyl] (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment of a neurological or psychiatric disorder.

The present invention provides (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2*S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2-aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, dibenzyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, or bis[(2-fluorophenyl)methyl] (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in therapy. The present invention also provides (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic

-6-

acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[(*2S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2-aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, 5 or a pharmaceutically acceptable salt thereof, dibenzyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, or bis[(2-fluorophenyl)methyl] (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in the treatment of a neurological or 10 psychiatric disorder.

Furthermore, the present invention provides preferred embodiments of the methods and uses as described herein, in which the neurological disorder is selected from the group consisting of persistent pain, neuropathic pain, chronic inflammatory pain, and visceral pain, and the psychiatric disorder is selected from the group consisting of 15 schizophrenia, bipolar disorder, generalized anxiety disorder, and post traumatic stress disorder.

As used above, and throughout the description of the invention, the following terms, unless otherwise indicated, shall be understood to have the following meanings:

“Compound(s) of the invention” and “compound(s) of the present invention” 20 include prodrugs, active compounds, and/or active metabolites. A “prodrug” is a class of drugs, initially in inactive form that is converted into active form in the body by normal metabolic processes, wherein at least one of R^1 , R^2 , and R^3 in Formula I is other than hydrogen (e.g. R^1 is hydrogen, R^2 is (*2S*)-2-aminopropanoyl, and R^3 is hydrogen; R^1 is hydrogen, R^2 is (*2S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl, and R^3 is hydrogen; R^1 is 25 hydrogen, R^2 is 2-aminoacetyl, and R^3 is hydrogen; R^1 is benzyl, R^2 is hydrogen, and R^3 is benzyl; or R^1 is (2-fluorophenyl)methyl, R^2 is hydrogen, and R^3 is (2-fluorophenyl)methyl). An “active compound” or “active” is another name for an active form administered to the body, for example, intravenously or intraperitoneally, wherein R^1 , R^2 , and R^3 in Formula I are hydrogen. An “active metabolite” is another name for an 30 active form resulting from such a conversion of a prodrug in the body by normal metabolic processes, wherein R^1 , R^2 , and R^3 in Formula I are hydrogen.

-7-

A "pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient" is a medium generally accepted in the art for the delivery of biologically active agents to mammals, e.g., humans.

"Pharmaceutically acceptable salts" refers to the relatively non-toxic, inorganic
5 and organic salts of compounds of the present invention.

"Therapeutically effective amount" or "effective amount" means the amount of the compound, or pharmaceutically acceptable salt thereof, of the present invention or pharmaceutical composition containing a compound, or pharmaceutically acceptable salt thereof, of the present invention that will elicit the biological or medical response of or
10 desired therapeutic effect on a tissue, system, animal, mammal or human that is being sought by the researcher, veterinarian, medical doctor or other clinician.

The terms "treatment," "treat," "treating," and the like, are meant to include slowing or reversing the progression of a disorder. These terms also include alleviating, ameliorating, attenuating, eliminating, or reducing one or more symptoms of a disorder or
15 condition, even if the disorder or condition is not actually eliminated and even if progression of the disorder or condition is not itself slowed or reversed.

Under standard nomenclature used throughout this disclosure, the terminal portion of the designated side chain is described first, followed by the adjacent functionality toward the point of attachment. For example, a methylsulfonyl substituent is equivalent
20 to $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-}$.

The compounds of the present invention are capable of reaction, for example, with a number of inorganic and organic acids to form pharmaceutically acceptable acid addition salts or basic addition salts. Such pharmaceutically acceptable salts and common methodology for preparing them are well known in the art. *See, e.g.,* P. Stahl, *et al.*,
25 HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 66, No. 1, January 1977.

The compounds of the present invention are preferably formulated as pharmaceutical compositions using a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or
30 excipient and administered by a variety of routes. Preferably, such compositions are for oral or intravenous administration. Such pharmaceutical compositions and processes for

preparing them are well known in the art. *See, e.g.*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, *et al.*, eds., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005).

The compound of the present invention actually administered will be determined by a physician under the relevant circumstances, including the condition to be treated, the chosen route of administration, the actual compound or compounds of the present invention administered, the age, weight, and response of the individual patient, and the severity of the patient's symptoms. Dosages per day normally fall within the range of about 0.1 to about 300 mg. In some instances dosage levels below the lower limit of the aforesaid range may be more than adequate, while in other cases still larger doses may be employed.

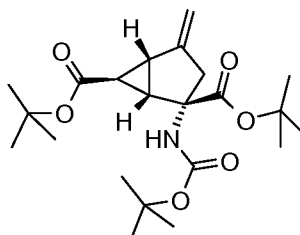
The compounds of the present invention, or pharmaceutically acceptable salts thereof, may be prepared by a variety of procedures known in the art, as well as those described in the Preparations and Examples below. The specific synthetic steps for each of the routes described may be combined in different ways to prepare the compounds of the invention, or pharmaceutically acceptable salts thereof.

The substituents, unless otherwise indicated, are as previously defined. The reagents and starting materials are generally readily available to one of ordinary skill in the art. Others may be made by standard techniques of organic and heterocyclic chemistry, techniques which are analogous to the syntheses of known structurally similar active compounds and prodrugs, and the procedures described in the Preparations and Examples which follow including any novel procedures. The naming of the following Preparations and Examples is done using Symyx Draw 3.1.

As used herein, the following terms have the meanings indicated: "HPLC" refers to high-pressure liquid chromatography; "LC" refers to liquid chromatography; "MS (ES+)" refers to mass spectroscopy using electrospray ionization; "MS" refers to mass spectroscopy; "SFC" refers to supercritical fluid chromatography; "NMR" refers to nuclear magnetic resonance; "TLC" refers to thin layer chromatography; "RT" refers to retention time; "UV" refers to ultraviolet; "EDTA" refers to ethylenediaminetetraacetic acid; "PBS" refers to phosphate buffered saline; "PCR" refers to polymerase chain reaction; "SCX" refers to strong cation exchange; and "HLB" refers to Hydrophilic-Lipophilic Balance.

Preparation 1

Ditert-butyl (1S,2S,5R,6S)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate

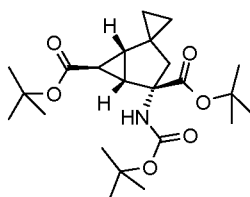


- 5 Charge an oven-dried 250 mL round-bottom flask with methyltriphenylphosphonium bromide (5.41 g, 14.9 mmol) and tetrahydrofuran (93 mL). Cool the suspension to 0°C and add dropwise 1M solution of sodium bis(trimethylsilyl)amide in tetrahydrofuran (16.08 mL, 16.08 mmol). Stir the resultant bright yellow mixture at 0°C for 20 minutes before adding a solution of *ditert*-butyl
- 10 *(1S,2S,5R,6R)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate* (5.09 g, 12.4 mmol, see WO03/104217/A2 for synthesis details) in tetrahydrofuran (31 mL). Allow the reaction to warm to room temperature and stir for 16 hours. Partition the mixture between ethyl acetate (500 mL) and water (350 mL). Discard the aqueous and wash the organic phase with brine (200 mL). Dry the organic
- 15 phase over magnesium sulfate, filter and concentrate under reduced pressure. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (5:95 to 20:80) to yield the title compound as a white solid (4.84 g, 11.2 mmol). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.45 (m, 27H), 1.87 (t, *J*=2.9 Hz, 1H), 1.98 (m, 1H), 2.43 (m, 2H), 3.07 (br m, 1H), 4.86 (br s, 1H), 5.03 (d, *J*=2 Hz, 1H), 5.1-5.3 (br s, 1H).

-10-

Preparation 2

Ditert-butyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)spiro[bicyclo[3.1.0] hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate



5

Prepare an ethanol free solution of diazomethane in diethyl ether by charging the cold-finger of an Aldrich mini-Diazald apparatus with cardice and *iso*-propanol filling it one third. In the reaction portion of the apparatus place a solution of potassium hydroxide (740 mg, 13.2 mmol) in water (1.5 mL). To this solution add a mixture of diethylene glycol monoethyl ether (4 mL) and diethyl ether (2.4 mL). Dissolve *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (1 g, 6.8 mmol) in a mixture of diethyl ether (13 mL) and diethylene glycol monoethyl ether (4 mL). Place this solution in a dropping funnel with smooth glass joints and fit to the mini-Diazald apparatus. Warm the potassium hydroxide solution in a water bath held at 70°C, ensuring that the collection flask and a bubbler filled with diethyl ether at the outlet of the apparatus are both cooled in a cardice/ *iso*-propanol bath. Allow the solution of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine to add at a rate equal to that of the resultant distillation. Once distillation is complete, add additional diethyl ether dropwise through the dropping funnel until condensate on the cold finger becomes colorless. Store the resultant solution in a cardice/*iso*-propanol bath until needed. Suspend palladium acetate (17.2 mg; 76.5 μmol) in diethyl ether (10 mL). Decant and filter the resulting pale brown solution and add carefully to a mixture of the diazomethane solution *ditert*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (330 mg, 765.5 μmol) and diethyl ether (10 mL) which has been allowed to reach ambient temperature. Once gas evolution has ceased, filter the resulting suspension and concentrate under reduced pressure to yield 260 mg of a mixture of unreacted *ditert*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-

-11-

butoxycarbonylamino)-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate and title compound.

Prepare an ethanol free solution of diazomethane in diethyl ether from a solution of potassium hydroxide (2.5 g, 44.6 mmol) in water (4 mL), diethylene glycol monoethyl ether (14 mL) and diethyl ether (8 mL) and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (4 g, 27.2 mmol) in a mixture of diethyl ether (30 mL) and diethylene glycol monoethyl ether (15 mL). Take the resulting solution of diazomethane and add it portion wise over 30 minutes to a suspension of palladium acetate (20 mg, 89.1 μ mol) in a solution of the previously prepared mixture of unreacted *ditert*-butyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate and title compound (260 mg) in diethyl ether (3 mL). Once gas evolution has ceased, leave to stand overnight, then filter through a phase separator frit and concentrate under reduced pressure to yield a dark oil. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (0:100 to 75:25) to yield 185 mg of a mixture of unreacted *ditert*-butyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate and title compound.

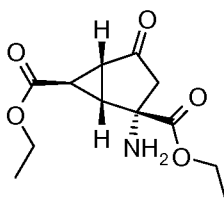
Prepare an ethanol free solution of diazomethane in diethyl ether from a solution of potassium hydroxide (3.2 g, 57 mmol) in water (5 mL), diethylene glycol monoethyl ether (4 mL) and diethyl ether (10 mL) and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (5 g, 34 mmoles) in a mixture of diethyl ether (35 mL) and diethylene glycol monoethyl ether (15 mL). Take the resulting solution of diazomethane and add it portionwise over 60 minutes to a suspension of palladium acetate (20 mg, 89.1 μ mol) in a solution of the previously prepared mixture of unreacted *ditert*-butyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate and title compound (185 mg) in diethyl ether (2 mL). Once gas evolution has ceased, leave to stand for 30 minutes, filter and concentrate under reduced pressure to yield a yellow oil. Purify by mass guided HPLC (RT = 6.4 minutes (UV), 6.37 minutes (MS); LC Column: Waters XBridge™ 30mm x 100mm 5 μ m; water w/0.1% formic acid; gradient: 28-62% acetonitrile w/0.1% formic acid in 1.35 minutes then 62-95% in 6.65 minutes, then held at

-12-

95% for 3.55 minutes. Column temperature: ambient; flow rate: 45 mL/minute) to yield the title compound as a colorless oil (55.3 mg, 130.6 μ mol). MS (m/z): 446 (M+23).

Preparation 3

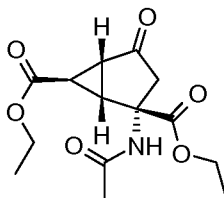
5 Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate.



Charge a 500 mL three neck flask equipped with a condenser, nitrogen inlet and a thermometer with *ditert*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (15 g, 36.4 mmol) in ethanol (365 mL). Add
 10 thionyl chloride (13.3 mL, 182.3 mmol) to a stirring solution at room temperature via syringe (small exotherm) then heat to reflux. After 24 hours cool the reaction to room temperature and concentrate *in vacuo*. Dissolve the residue in dichloromethane (50 mL) then concentrate on a rotary evaporator (repeat 3 times). Partition the residue between ethyl acetate (200 mL) and saturated sodium hydrogenate carbonate (150 mL). Wash the
 15 organic phase with brine (150 mL), dry over sodium sulfate, filter then concentrate to dryness to give the title compound as an oil (8.24 g, 32.3 mmol). MS (m/z): 256 (M+1).

Preparation 4

Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-acetamido-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate.



20

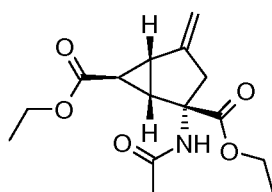
Add acetic acid anhydride (5 mL, 50.8 mmol) to a stirred solution of diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (7.2 g, 28.2 mmol) and triethylamine (7.9 mL, 56.4 mmol) in dry dichloromethane (72 mL) at room

-13-

temperature. After 2 hours, quench with water (100 mL) and stir vigorously for 20 minutes. Separate the dichloromethane layer via a hydrophobic frit and evaporate to a light brown oil (9.6 g). Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (70:30 to 90:10) to give the title compound as a pale yellow glass foaming on drying (6.53 g, 22 mmol). MS (m/z): 298 (M+1), 320 (M+23), 617 (2M+23).

Preparation 5

Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-acetamido-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate.

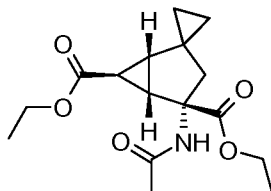


Charge an oven-dried 250 mL round-bottom flask with (methyl)triphenylphosphonium bromide (9.72 g, 26.7 mmol) and dry tetrahydrofuran (122 mL). Cool the suspension to 0 to -5°C and treat with 2M sodium *bis*(trimethylsilyl)amide in tetrahydrofuran (13.3 mL, 26.7 mmol) in a dropwise manner. Stir the resultant bright yellow mixture at 0°C for 20 minutes then treat with a solution of diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-acetamido-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (6.1 g, 20.5 mmol) in tetrahydrofuran (30 mL). Allow the reaction to warm slowly to room temperature over 3 hours. After stirring for 20 hours at room temperature quench with iced water (200 mL) and extract with ethyl acetate (200 mL). Wash extracts with water (100 mL), brine (100 mL), dry, filter and evaporate to dark brown oil. Add diethyl ether (70 mL) and *iso*-hexane (20 mL) and seed the solution with triphenylphosphine oxide. Allow to stand for 2 hours, decant the solution, add silica and concentrate under vacuum. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (60:40 to 80:20) to give a pink oil (6.81 g) contaminated with triphenylphosphine oxide. Re-purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (60:40) to give the title compound as a viscous yellow oil (3.98 g, 13.5 mmol). MS (m/z): 296 (M+1), 318 (M+23), 613 (2M+23).

-14-

Preparation 6

Diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-acetamidospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate



5

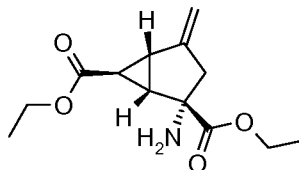
Under nitrogen, add a solution of trifluoroacetic acid (1.9 mL, 25 mmol) in dichloromethane (12.5 mL) dropwise very slowly to a cooled (ice bath) stirred solution of diethylzinc (1M in heptanes) (25 mL, 25 mmol) in dichloromethane (12.5 mL). After 10 minutes, add a solution of diiodomethane (2.01 mL, 25 mmol) in dichloromethane (12.5 mL). After 10 minutes, add a solution of diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-acetamido-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (2.46 g, 8.3 mmol) in dichloromethane (12.5 mL). After 60 minutes remove the ice bath and leave the reaction mixture to stir overnight at room temperature. Quench the clear reaction solution by dropwise addition of the reaction mixture to 0.2M aqueous hydrochloric acid (200 mL) under vigorous stirring. After 1 hour separate the dichloromethane layer, wash with brine, dry over magnesium sulfate, filter and concentrate in vacuum to yield the required product contaminated with unreacted starting material (4.4 g). Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: cyclohexane (50:50 to 100:0) to give a colorless oil (3.1 g). Purify by SFC (RT = 2.48 minutes (UV, 200 nm); HPLC Column: AD-H 30 mm x 250 mm 5 μ m; CO₂ gradient: 5% *iso*-propyl alcohol w/0.2% dimethylethylamine for 0.5 minutes, then 5%-27% in 2.2 minutes. Column temperature: 35°C; pressure: 100000 kPa; flow rate: 210 mL/minute) to yield unreacted diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-acetamido-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (580 mg, 2.0 mmol) and title compound (1.82 g, 5.9 mmol). MS (m/z): 310 (M+1), 332 (M+23).

20

-15-

Preparation 7

Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-amino-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate.

**5 Method 1:**

Prepare a solution of approximately 1M hydrogen chloride in ethanol by dropwise addition of trimethylsilyl chloride (13.8 mL, 108 mmol) to ethanol (110 mL). Dissolve *ditert*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (7.4 g, 18.1 mmol) in this acidic solution and heat to 60°C for 10 16 hours. Evaporate to a viscous yellow oil, redissolve in water (50 mL) and filter the hazy solution to remove trace insolubles. Neutralize the aqueous acidic solution with sodium bicarbonate (8.4 g, 0.1 mol) and extract with dichloromethane (2 x 100 mL). Dry the combined dichloromethane solutions via a hydrophobic frit and evaporate to a pale yellow liquid (4.14 g). Purify by chromatography on amino-bonded silica eluting with 15 ethyl acetate: *iso*-hexane (20:80 to 80:20) to give a colorless liquid (3.6 g). Repurify by chromatography on amino-bonded silica eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (20:80) to give a colorless liquid of the title product (2.81 g, 61%). MS (m/z): 254 (M+1).

Method 2:

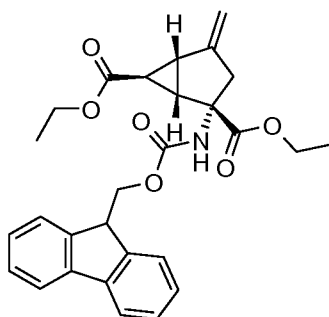
Dry *p*-toluenesulphonic acid monohydrate (6.97 g, 36.6 mmol) *in vacuo* at 50°C 20 for 3 days. Add to a stirred solution of *ditert*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (5.0 g, 12.2 mmol) in ethanol (35.5 mL) and heat to 60°C for 3 days. Remove solvent under reduced pressure to give a residue. Take up the residue into water (100 mL), make basic using sodium bicarbonate and extract with dichloromethane (3 x 100 mL). Dry the extracts

-16-

over sodium sulfate, filter and then concentrate under reduced pressure to give an orange residue of the title compound (1.52 g, 51%). MS (m/z): 254 (M+1).

Preparation 8

Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-methylene-
5 bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate

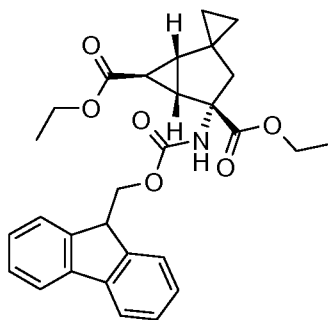


Add solid 9-fluorenylmethyl chloroformate (3.15 g, 12.2 mmol) portion wise over 5 minutes to a stirred solution of diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-amino-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (2.8 g, 11.1 mmol) and sodium bicarbonate (2.04
10 g, 24.3 mmol) in tetrahydrofuran (28 mL) and water (8.4 mL) cooled to 0-5°C. After 1 hour, add water (10 mL) and extract with ethyl acetate (50 mL). Wash the extract with brine solution (20 mL), dry, filter and evaporate to a pale yellow oil (6.5 g). Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (10:90 to 20:80) to give a viscous colorless oil (4.58 g). Repurify by flash chromatography eluting with ethyl
15 acetate: *iso*-hexane (20:80) to give a white semi-solid foam of title compound (4.22 g, 80%). MS (m/z): 476 (M+1).

-17-

Preparation 9

Diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)
spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate

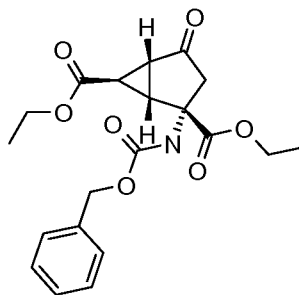


- 5 Add a solution of trifluoroacetic acid (2.66 g, 23.3 mmol) in dichloromethane (11.7 mL) dropwise over 5 minutes to a stirred solution of diethyl zinc 1M in heptanes (23.3 mL, 23.3 mmol) in dichloromethane (11.7 mL) cooled to 0-5°C under nitrogen (exothermic reaction). After 10 minutes, add a solution of diiodomethane (6.25 g, 23.3 mmol) in dichloromethane (11.7 mL). After 10 minutes, add a solution of diethyl
- 10 (*1S,2S,5R,6S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (3.70 g, 7.8 mmol) in dichloromethane (11.7 mL). After 2 hours at 0°C, allow to warm to room temperature and stir for 16 hours. Quench the reaction mixture with cold 0.5M hydrochloric acid (50 mL) and dichloromethane (20 mL) and stir vigorously. Separate the dichloromethane layer via a hydrophobic frit and
- 15 then evaporate to a pale yellow oil. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (10:90 to 20:80) to give a colorless oil (3.49 g). Repurify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (20:80) taking the centre cut fractions to give a colorless foam of title compound (2.12 g, 56%). MS (*m/z*): 490 (*M*+1). A second lot of product from the less pure fractions is obtained by repeated
- 20 chromatography (363 mg, additional 9%).

-18-

Preparation 10

Diethyl (*1S,2S,5R,6R*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate

**5 Method 1:**

Add dibenzyl dicarbonate (18.6 mL, 76.1 mmol) to a solution of diethyl (*1S,2S,5R,6R*)-2-amino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (16.2 g, 63.5 mmol) in dichloromethane (500 mL) then add dropwise triethylamine (10.6 mL, 76.1 mmol). Stir the reaction mixture for 30 minutes before washing with 1N hydrochloric acid (200 mL). Wash the dichloromethane phase with brine, separate and concentrate *in vacuo*. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (0:100 to 75:25) to yield the title compound (11.6 g, 47%). MS (*m/z*): 388 (*M*+1), 410 (*M*+23).

Method 2:

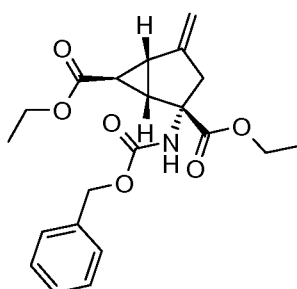
Add to a round bottom flask diethyl (*1S,2S,5R,6R*)-2-amino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate hydrochloride (226.86 g, 777.65 mmol), water (1.13 L) and tetrahydrofuran (1.13 L). Add slowly sodium bicarbonate (143.72 g, 1.71 mol) in 5 portions (observing CO₂ evolution and internal temperature from 31°C to 25°C). Add then a solution of benzyl chloroformate (120.6 mL, 855.42 mmol) in tetrahydrofuran (226.9 mL) and keep the internal temperature below 28°C (10 minutes) stirring the reaction at 25°C for 1 hour. Pour the mixture into methyl-*t*-butyl ether (1.25 L). Separate the layers, extract the aqueous with ethyl acetate (750 ml) and discard the aqueous phase. Wash the mixture with brine, dry over magnesium sulfate, filter and concentrate to

-19-

dryness to give the title compound as a colorless oil (302.82 g, 777.65 mmol). MS (m/z): 388 (M+1).

Preparation 11

Diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-
2,6-dicarboxylate



Method 1:

Charge an oven dried 500 mL round-bottom flask with (methyl)triphenylphosphonium bromide (15.4 g, 43.1 mmol) and dry tetrahydrofuran (112 mL). Cool the suspension to 0 to -5°C and treat with 2M sodium bis(trimethylsilyl)amide in tetrahydrofuran (23 mL, 46 mmol) in a dropwise manner. Stir the resultant bright yellow suspension at 0°C for 30 minutes then treat with a solution of diethyl (*1S,2S,5R,6R*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (11.2 g, 28.8 mmol) in tetrahydrofuran (22.4 mL). Allow the reaction to slowly warm to room temperature. After 4 hours, quench with ice (120 g), brine (120 mL) and extract with ethyl acetate (250 mL). Wash the extracts with brine (2 x 100 mL), dry, filter and evaporate to a red oil. Redissolve in diethyl ether (100 mL) and add *iso*-hexane (80 mL) slowly in portions to precipitate triphenylphosphine oxide as a red semi-solid (5.2 g). Treat the solution with dry silica (~50 g) and concentrate to dryness. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (20:80) to give the title compound as a colorless viscous oil (7.37 g, 66%). MS (m/z): 388 (M+1), 410 (M+23).

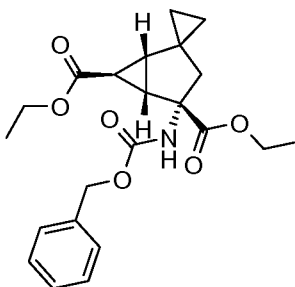
-20-

Method 2:

Add potassium *tert*-butoxide (104.72 g, 933.18 mmol) to a suspension of (methyl)triphenylphosphonium bromide (340.16 g, 933.18 mmol) in tetrahydrofuran (1.82 L) at room temperature (no change in internal temperature). Then add a solution of diethyl (*1S,2S,5R,6R*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (302.82 g, 777.65 mmol) in tetrahydrofuran (1.82 L) maintaining the temperature at 24°C. Stir the mixture at 50°C for 3 hours. Dilute the reaction with ethyl acetate (1.5 L), wash with water (2 x 3 L) and brine. Dry the organic phase over magnesium sulfate, filter and concentrate to afford a dark brown oil. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: hexanes (9:1) to give the title compound as a colorless oil (183.35 g, 473.25 mmol). MS (*m/z*). 388 (*M*+1), 410 (*M*+23).

Preparation 12

Diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate

**Method 1:**

Add a solution of 1M diethylzinc in heptanes (64.1 mL, 64.1 mmol) in dichloromethane (14.6 mL) dropwise slowly over 10 minutes to a stirred solution of trifluoroacetic acid (4.27 mL, 56.5 mmol) in dichloromethane (73 mL) cooled to 0-5°C under nitrogen. After 10 minutes, add a solution of diiodomethane (4.6 mL, 56.5 mmol) in dichloromethane (14.6 mL). After 10 minutes, add a solution of diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (7.3 g, 18.8 mmol) in dichloromethane (14.6 mL). After 1 hour, remove the ice bath and leave

-21-

the hazy solution to stir for 20 hours at room temperature. After 24 hours, quench the reaction mixture with iced 0.5M aqueous hydrochloric acid (160 mL, 80 mmol) and dichloromethane (200 mL) and stir the mixture vigorously. Separate the dichloromethane layer and then dry the dichloromethane phase filtering through 2 hydrophobic frits.

- 5 Evaporate to a pale yellow oil turning brown overnight. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (20:80) to give the title compound as a mixture with unreacted diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate as a colorless oil (5.1 g).

- Add a solution of trifluoroacetic acid (2.93 mL, 38.7 mmol) in dichloromethane
- 10 (10 mL) dropwise slowly over 10 minutes to a stirred solution of diethylzinc 1M in heptanes (38.7 mL, 38.7 mmol) in dichloromethane (50 mL) cooled to 0-5°C under nitrogen. After 10 minutes, add a solution of diiodomethane (3.12 mL, 38.7 mmol) in dichloromethane (10 mL) to the reaction mixture. After 10 minutes, add a solution of the mixture of olefin and diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (5 g, 12.9 mmol) in dichloromethane
- 15 (10 mL). After 1 hour remove the ice bath and leave the hazy solution to stir for 16 hours at room temperature. After 20 hours, quench the reaction mixture with iced 0.5M hydrogen chloride (140 mL, 70 mmol) and dichloromethane (160 mL) and stir the mixture vigorously. Wash the dichloromethane layer with 0.5M aqueous hydrochloric
- 20 acid (100 mL), dry over sodium sulfate and then filter through 2 hydrophobic frits. Evaporate to a pale yellow oil (5.89 g). Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (15:85 to 25:75) to give the title compound as a colorless oil (4.28 g) contaminated with a small amount of reactant.

- Redissolve in acetone (40 mL), water (20 mL), sodium bicarbonate (0.54 g, 6.45
- 25 mmol) and magnesium sulfate (0.78 g, 6.45 mmol). Cool to 0°C and add potassium permanganate (0.2 g, 1.29 mmol) to give a bright purple mixture. After 3 hours at room temperature, quench with solid sodium thiosulfate pentahydrate (0.32 g, 1.29 mmol) and filter the suspension through a pad of diatomaceous earth, washing through with acetone. Evaporate to a small volume, dilute with water (20 mL) and extract with ethyl acetate (60
- 30 mL). Wash the extracts with brine, dry, filter and evaporate to an oil. Purify by flash

-22-

chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (15:85 to 25:75) to give the title compound as a colorless oil (3.62 g, 70%). MS (m/z): 402 (M+1).

Method 2:

Add a solution of 1M diethylzinc in heptanes (1.6 L, 1.6 mol) *via* cannula to
5 dichloromethane (870.9 mL) at 0°C (bath temperature -5°C), then add slowly a solution of trifluoroacetic acid (121.02 mL, 1.6 mol) in dichloromethane (870.9 mL) maintaining the temperature below 3°C. After 1 hour of addition stir the mixture for 5 minutes then add diiodomethane (130.3 mL, 1.6 mol) in one portion and stir for 15 minutes. Add a solution of diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-
10 2,6-dicarboxylate (183.35 g, 449.58 mmol) in dichloromethane (348.4 mL) over 10 minutes and stir the mixture at room temperature overnight. Cool to 0°C, quench with 0.5M hydrochloric acid (1.5 L) and stir the mixture vigorously. Separate the organic layer, wash with brine and concentrate to dryness. Dissolve in water (733.4 mL) and acetone (733.4 mL), cool to 0°C then add magnesium sulfate (81.17 g, 674.37 mmol),
15 sodium bicarbonate (56.65 g, 674.37 mmol) followed by potassium permanganate (28.42 g, 179.83 mmol). Stir the mixture at room temperature. After 30 minutes add sodium thiosulfate pentahydrate (197.10 g, 311.03 mmol) followed by diatomaceous earth (100 g). Stir for 30 minutes and filter through a pad of diatomaceous earth. Wash the pad with methyl-*t*-butyl ether and extract the aqueous layer with methyl-*t*-butyl ether.
20 Dry the organic layer over magnesium sulfate, filter and concentrate *in vacuo*. Purify by flash chromatography eluting with hexanes: methyl-*t*-butyl ether (10:90 to 50:50) to yield the title compound as a colorless oil (92.67 g, 51%). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.39-0.52 (m, 1H), 0.55-0.78 (m, 3H), 1.25 (broad t, *J*= 7.1 Hz, 6H), 1.58 (broad dd, *J*=2.9 and 6.3 Hz, 1H), 1.64-1.73 (m, 1H), 1.95 (broad t, *J*=2.9 Hz, 1H), 2.03-2.17 (m, 1H), 2.52 (dd, *J*= 2.7 and 6.3 Hz, 1H), 4.09 (q, *J*= 7.1 Hz, 2H), 4.16-4.32 (m, 2H), 5.08 (broad s, 2H), 5.44 (broad s, 1H), 7.28-7.41 (m, 5H).

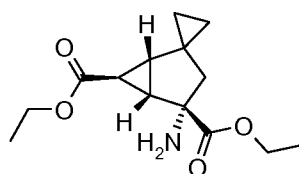
Also obtain diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-(benzyloxycarbonyl(methyl)amino)spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate as a by-product (22.67 g, 5.46 mmol). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.37-0.52 (m,
30 1H), 0.54-0.80 (m, 3H), 1.26 (broad t, *J*= 7.1 Hz, 6H), 1.55-1.68 (m, 1H), 1.64-1.73 (m,

-23-

1H), 1.70-1.80 (m, 1H), 1.97 (broad t, $J=3.1$ Hz, 1H), 2.30 (dd, $J=3.1$ and 6.3 Hz, 1H), 3.16 (s, 3H), 3.99-4.29 (m, 4H), 5.09 (broad s, 2H), 7.38-7.62 (m, 5H).

Preparation 13

Diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate



Method 1:

Add piperidine (3.16 g, 37.2 mmol) to a stirred solution of diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (2.10 g, 4.29 mmol) in dichloromethane (10.5 mL) at room temperature. After 30 minutes, evaporate to a yellow solid. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (30:70 to 80:20) to first elute 1-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-piperidine and then to elute a pale yellow liquid of title compound (1.07 g, 93%). MS (m/z): 268 ($M+1$).

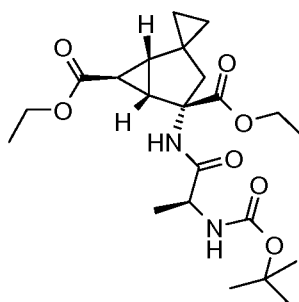
Method 2:

Dissolve diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-benzyloxycarbonylamino spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (3.62 g, 9 mmol) in ethanol (54 mL) and add solution to 10% palladium on carbon (Degussa type E101 NE/W, 0.18 g, 0.17 mmol). Hydrogenate on Parr equipment for 4 hours at 345 kPa. Filter the reaction through a pad of diatomaceous earth to remove the catalyst, wash with ethanol and evaporate to a colorless oil as the title compound (2.23 g, 93%). MS (m/z): 268 ($M+1$).

Preparation 14

Diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[*(2S)*-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate

-24-



- Combine diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (1.92 g, 7.17 mmol), (*2S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoic acid (1.92 g, 10 mmol), 4-dimethylaminopyridine (9 mg, 717 μ mol) and 1-hydroxybenzotriazole (1.36 g, 10 mmol) in dichloromethane (48 mL). Add triethylamine (1.5 mL, 10.8 mmol) and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.92 g, 10 mmol) and stir for 2 hours at room temperature under a nitrogen atmosphere. Dilute the reaction with ethyl acetate (200 mL), water (50 mL) and brine (50 mL). Stir vigorously then separate the ethyl acetate layer, wash with 0.2M hydrochloric acid (50 mL), water (50 mL), saturated sodium hydrogen carbonate (50 mL) and brine (50 mL). Dry, filter and concentrate the solution to give a yellow oil (3.48 g). Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (15:85 to 25:75) then (25:75 to 40:60) to give the material as an oil. Redissolve in dichloromethane, concentrate and dry under vacuum to give the title compound as a white foamy material (3.05 g, 6.95 mmol). MS (*m/z*): 461 (*M*+23).

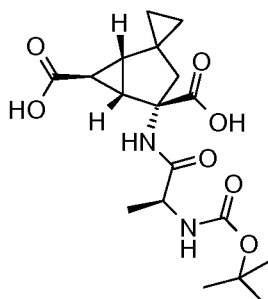
The following compounds are prepared essentially by the method of preparation 14.

-25-

Prep. No.	Chemical name	Structure	Physical data
15	Diethyl (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[[(2 <i>S</i>)-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate		MS (m/z): 499 (M+1), 521 (M+23)
16	Diethyl (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[2-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)acetyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate		MS (m/z): 447 (M+23).

Preparation 17

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[[(2*S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)propanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid



-26-

Method 1:

Add a solution of 2M lithium hydroxide in water (27.8 mL, 55.6 mmol) to a cold stirred solution of diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[*(2S)*-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (3.05 g, 6.9 mmol) in tetrahydrofuran (36 mL) under nitrogen. Stir the bilayer solution at room temperature for 20 hours. Acidify with 2M hydrochloric acid (29 mL), ice (~20 g) and extract with ethyl acetate (100 mL). Wash the extracts with brine (50 mL), dry on sodium sulfate, filter and evaporate to a white semi-solid foam. Redissolve the material in hot ethyl acetate (15 mL). Filter and dry the material under vacuum to give the title compound as a white solid (2.06 g, 5.4 mmol). MS (*m/z*): 405 (*M*+23).

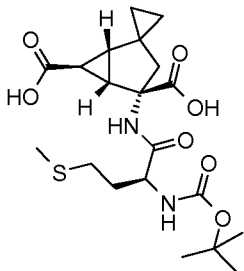
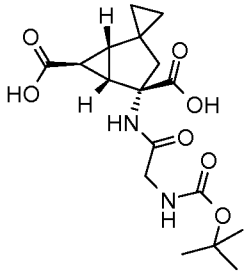
Method 2:

Dissolve diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-benzyloxycarbonylaminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (159 g, 396.05 mmol) in ethanol (792.1 mL), and add 10% palladium on carbon (15.9 g, 14.94 mmol) followed by a 37.5%wt/wt hydrochloric acid solution in water (6.62 mL, 79.21 mmol). Hydrogenate on a 2 L Parr equipment at 413 kPa at room temperature. After 4 hours filter the mixture through diatomaceous earth and a glass microfiber filter (Whatman) and concentrate *in vacuo*. Dissolved the crude in tetrahydrofuran (396 mL), add chlorodimethoxytriazine (74.50 g, 415.86 mmol) and (*2S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino) propanoic acid (79.88 g 415.86 mmol). Cool this mixture to 0°C and add *N*-methylmorpholine (131.06 mL, 1.19 mol). Stir the mixture at room temperature. After 5 hours filter the crude through diatomaceous earth and wash the cake with tetrahydrofuran (200 mL). Remove the solvent partially under vacuum and cool the resulting orange solution to 0°C. Add 2M sodium hydroxide in water (792.1 mL, 1.58 mol) dropwise. Stir the mixture overnight, allowing the reaction to reach room temperature. Add dichloromethane (1 L) and separate the phases. Wash the organic layer with more water (300 mL). Acidify the combined aqueous layers to pH=2-3 with 1N potassium hydrogen sulfate and then extract with ethyl acetate. Dry the organic layer over magnesium sulfate, filter and evaporate under vacuum. Dissolve the crude in

-27-

tetrahydrofuran (600 mL) and heat to reflux. Add heptane (2.1 L) and cool the solution. Filter the solid and dry under vacuum to give the title compound as a white solid (149 g, 98%). MS (m/z): 405 (M+23).

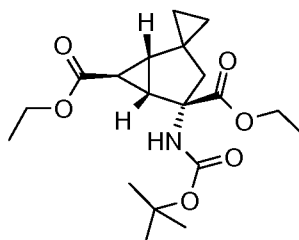
The following compounds are prepared essentially by the method 1 of preparation 17.

Prep No.	Chemical name	Structure	Physical data
18	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[2-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid		MS (m/z): weak 465 (M+23)
19	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[2-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)acetyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid		MS (m/z): 391 (M+23),

5

Preparation 20

Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate.



10

Method 1:

To a solution of diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (0.47 g, 722.38 μ mol) in dichloromethane (5 mL) add polymer supported *diiso*-propyl-ethylamine (1.02 g, 3.61 mmol) followed by di-
5 butyldicarbonate (0.41 g, 1.88 mmoles) in dichloromethane (6.00 mL) and stir the reaction mixture at room temperature overnight. Add additional di-*t*-butyldicarbonate (0.32 g, 1.36 mmole) stir for a further 2 hours. Dilute with ethanol (20 mL) and purify by SCX-2 ion exchange resin cartridge (10 g) pretreated with 2 column volumes of ethanol. After loading the cartridge wash with 4 column volumes of ethanol before concentrating
10 the eluent *in vacuo* to yield the crude product (808 mg). Purify the crude material by flash chromatography eluting with ethyl acetate: cyclohexane (0:100 to 40:60) to yield the desired material (100 mg). Flush the cartridge with 2 column volumes of 3M ammonia in methanol to yield a yellow solid (430 mg) of unreacted crude diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate. Add di-
15 butyldicarbonate (0.32 g, 1.44 mmol) to the recovered diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate in tetrahydrofuran (20 mL), stir at room temperature overnight. Add then triethylamine (201.37 μ L, 1.44 mmol) and additional di-*t*-butyldicarbonate (0.32 g, 1.44 mmol) and maintain stirring for 72 hours. Add excess triethylamine (201.37 μ L, 1.44 mmol), di-*t*-butyldicarbonate (0.32
20 g, 1.44 mmol) and catalytic *N,N*-dimethyl 4-aminopyridine (40.93 μ mol) and stir overnight. Dilute with ethanol (30 mL) and purify the solution by SCX-2 ion exchange resin cartridge (10 g) pretreated with 2 column volumes of ethanol. Wash with 4 column volumes of ethanol and concentrate the solution *in vacuo* to yield 757 mg of crude desired product. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: cyclohexane (0:100
25 to 40:60) to yield a second fraction of the desired title product (24 mg). Combine both fractions to yield the title compound (337.47 μ mol, 47%). MS (*m/z*): 390 (*M*+23), 757 (2*M*+23).

Method 2:

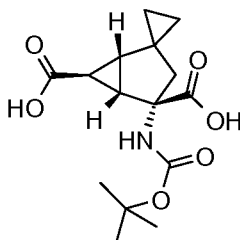
30 Add di-*t*-butyldicarbonate (0.88 g, 4.01 mmol) to a solution of diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate

-29-

(1.4 g, 5.24 mmol) in tetrahydrofuran (30 mL) and stir the reaction mixture at room temperature overnight under nitrogen. Filter through a hydrophobic frit, wash colorless gel, with ethyl acetate. Concentrate the combined organics layers *in vacuo* to give a colorless oil. Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane
5 (0:100 to 30:70) to yield 1.82 g of oil. Dry further under high vacuum to yield the title compound (1.79 g, 93%). MS (*m/z*): 390 (*M*+23), 757 (2*M*+23).

Preparation 21

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid
10

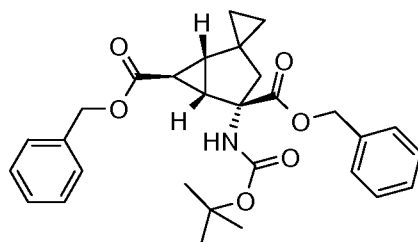


Add diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (1.79g, 4.87 mmol) in tetrahydrofuran (29.2 mL) to a freshly prepared solution of lithium
15 hydroxide monohydrate (1.64 g, 38.97 mmol) in water (19.5 mL) and stir overnight at 60°C. Dilute with water (30 mL), extract with ethyl acetate (2 x 50 mL). Separate aqueous and organic layers. Wash organic layer with 2M hydrochloric acid. Wash the aqueous layer with 2M hydrochloric acid (25 mL) then extract with ethyl acetate (2 x 50 mL). Combine the organic layers and wash with brine (15 mL). Dry on magnesium
20 sulfate, filter and concentrate to dryness. Redissolve in dichloromethane and concentrate to dryness to give the title compound (1.49 g, 98%). MS (*m/z*): 334 (*M*+23).

-30-

Preparation 22

Dibenzyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate



5

Add cesium carbonate (0.24 g, 730.7 μmol) and benzyl bromide (87.16 μL , 730.7 μmol) to a solution of (*1S,2S,5R,6S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid (0.09 g, 292.29 μmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL). Stir at room temperature for 1.5 hours under nitrogen. Quench with water and extract with ethyl acetate. Separate the layers and filter the organics through a hydrophobic frit before concentrating to dryness to yield the crude product (134 mg). Purify by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (1:99 to 25:75) to give a clear oil. Purify further by flash chromatography eluting with ethyl acetate: *iso*-hexane (1:99 10:90) to yield the title product (105 mg, 68%) as a clear oil. MS (*m/z*): 514 (*M*+23).

15

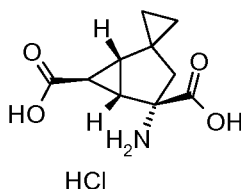
The following compound is prepared essentially by the method of preparation 22.

Prep No.		Chemical name	Structure	Physical data
23		<i>bis</i> [(2-fluorophenyl)methyl] (<i>1S,2S,5R,6S</i>)-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)-spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate		MS (<i>m/z</i>): 550 (<i>M</i> +23)

-31-

Example 1

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-Aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride



5

Charge a 5 mL ReactiVial with *tert*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (55 mg, 129.8 μ mol). To this add a 5N aqueous hydrochloric acid solution (3 mL; 20.8 mmol) and 1,4-dioxane (1 mL). Stir the mixture at 90°C for one hour. Seal the

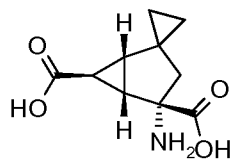
10 ReactiVial and continue stirring at 90°C for 3 hours. Cool to ambient temperature and stand for 3 days. Concentrate under reduced pressure to a dark solid. Prepare a Oasis® HLB Waters (1 g) cartridge by washing with 2 column volumes of methanol, followed by 6 column volumes of water. Dissolve the dark solid in water and load onto the cartridge. Wash the cartridge with water (2 column volumes) and collect the eluent. Freeze-dry the

15 solution to yield title compound (16.1 mg, 65 μ mol). MS (*m/z*): 212 (*M*+1). ¹H NMR (D₂O) δ 0.45 (m, 1H), 0.53 (m, 1H), 0.64 (m, 1H), 0.74 (m, 1H), 1.72-1.78 (m, 2H) 1.86 (d, *J*=14.2 Hz, 1H), 2.07 (m, 1H), 2.37 (m, 1H).

Example 2

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-Aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid

20



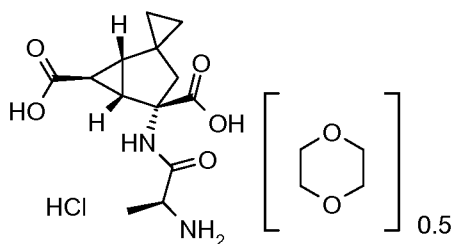
Add 2M sodium hydroxide (11.5 mL, 23.1 mmol) with diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-acetamidospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (1.19 g, 3.8 mmol). Upon addition heat the reaction mixture to reflux under a blanket of nitrogen.

-32-

After 21 hours add excess 2M sodium hydroxide (5.8 mL, 11.5 mmol) and resume heating for 120 hours. Purify by cation exchange chromatography (Dowex™ 50X8-100) as follows. Filter any insoluble particles and rinse with HPLC grade water. Concentrate the solution by half. Load the solution onto the resin, allowing to flow through the column at a drip rate of about 1 drop every 1-2 seconds. After the initial loading volume has dropped to the resin surface, rinse the resin with HPLC grade water (~ 1 to 2 column volumes) and repeat 3 times. Monitor the pH of the effluent and pursue rinsing with HPLC grade water until application complete (return of pH back to pH=7.). Once the complete pH cycle has been observed and the effluent has returned to pH=7, wash the column with at least one column volume each of HPLC grade water, HPLC grade water: tetrahydrofuran (1:1), then HPLC grade water. Displace the product from the resin with 10% pyridine: HPLC grade water and continue elution with 10% pyridine: HPLC grade water until no additional product was detected by TLC. Combine the fractions containing the desired material, concentrate to dryness to give a white solid. Freeze-dry to yield the title compound (795 mg, 3.8 mmol). MS (m/z): 212 (M+1). ¹H NMR (D₂O + 5% d₅-pyridine) δ: 0.38 (m, 1H), 0.45 (m, 1H), 0.55 (m, 1H), 0.69 (m, 1H), 1.50 (dd, *J*=2.9 Hz, 1H), 1.62 (d, *J*=13.7 Hz, 1H), 1.78 (m, 2H), 2.11 (dd, *J*=2.9 Hz, 1H).

Example 3

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(2S)*-2-Aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid; 1,4-dioxane (1: 0.5); hydrochloride.



Add a solution of 4M hydrogen chloride in 1,4-dioxane (1.57 mL, 6.3 mmol) to a stirred suspension of (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(2S)*-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid (0.16 g, 418.4 μmol) in 1,4-dioxane (1.6 mL) at room temperature under nitrogen. After 16 hours filter a white solid, wash with 1,4-dioxane, dry in vacuum at 60°C overnight to

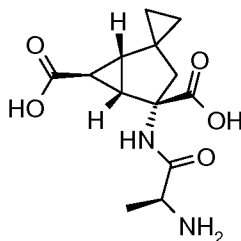
-33-

yield the title compound (0.14 g): MS (m/z): 283 (M+1). ¹H NMR (D₂O) δ 0.46 (m, 1H), 0.65 (m, 1H), 1.47 (d, *J*=7 Hz, 3H), 1.70 (dd, *J*=2.7 Hz, 1H), 1.81 (q, *J*=15 Hz, 2H), 1.87 (broad t, *J*=2.7 and 2.9 Hz, 1H), 2.65 (dd, *J*=2.7 and 2.9 Hz, 1H), 3.68 (s, 4H), 4.00 (q, *J*= 7 Hz, 1H), 4.70 (m, 2H).

5

Example 4

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(2S)*-2-Aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0] hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid

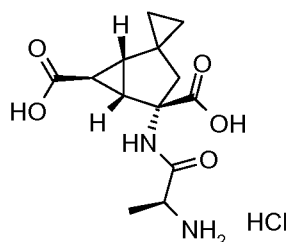


- 10 Add concentrated hydrochloric acid (36.94 mL, 430.11 mmol) to a solution of
(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(2S)*-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoyl]amino]
spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid (82.24 g, 215.06
mmol) in acetone (822.4 mL), and stir the mixture at 50°C. After 1.5 hours cool the
mixture to 0°C and add 50% sodium hydroxide in water to pH=3.6-3.8. Stir the solid
15 obtained for 1 hour, filter and wash with water. Dry under vacuum for 48 hours to yield
the title compound as a white solid (36 g, 127.53 mmol). MS (m/z): 283 (M+1).

-34-

Example 5

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(2S)*-2-Aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0] hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride

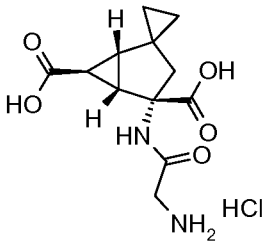


- 5 Add 4M hydrogen chloride in 1,4-dioxane (20 mL, 80 mmol) to a stirred suspension of (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(2S)*-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid (2.06 g, 5.4 mmol) in 1,4-dioxane (21 mL) at room temperature under nitrogen. Sonicate the reaction mixture few minutes and then maintain stirring 16 hours. Filter the solid,
- 10 wash with 1,4-dioxane, dry in vacuum at 60°C for 6 hours to give 2.2 g of white solid. Redissolve the material in HPLC grade water (20 mL), filter to remove any insoluble particles and freeze-dry the filtrate to yield title compound (1.51 g, 4.75 mmol). MS (m/z): 283 (M+1). ¹H NMR (D₂O) δ 0.46 (m, 1H), 0.65 (m, 1H), 1.46 (d, *J*=7.1 Hz, 3H), 1.69 (dd, *J*=2.9 Hz, 1H), 1.81 (q, *J*=14.3 Hz, 2H), 1.87 (broad t, *J*= 2.9 Hz, 1H), 2.65 (dd, *J*= 2.9 Hz, 1H), 4.00 (q, *J*= 7.02 Hz, 1H), 4.70 (m, 2H).
- 15

The following compounds are prepared essentially by the method of Example 4.

Ex. No.	Chemical name	Structure	Physical data
6	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[<i>(2S)</i> -2-Amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride		MS (m/z): 343 (M+1)

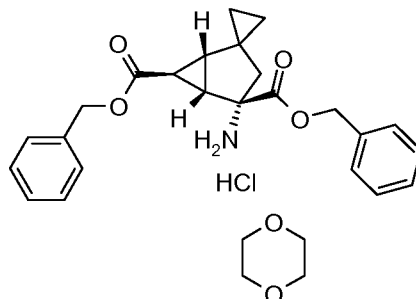
-35-

Ex. No.	Chemical name	Structure	Physical data
7	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[(2-Aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride		MS (m/z): 269 (M+1)

Example 8

Dibenzyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate; 1,4-dioxane; hydrochloride

5



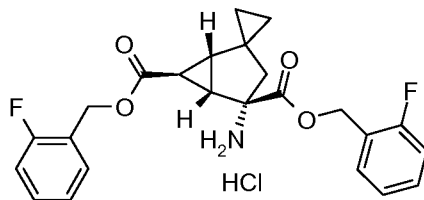
Add 4M hydrogen chloride in 1,4-dioxane (493.30 μ L, 1.97 mmol) to a stirred suspension of dibenzyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (0.1 g, 0.2 mmol) in 1,4-dioxane (970 μ L) at room temperature under nitrogen and stir for 20 hours. Add excess 4M hydrogen chloride solution in 1,4-dioxane (493.30 μ L, 1.97 mmol) and heat to 80°C. Concentrate to dryness, triturate with acetonitrile and freeze-dry the suspension to give the title compound as a white solid (89.9 mg, 88%) as a (1:1) adduct with 1,4-dioxane. MS (m/z): 392 (M+1).

15

Example 9

Bis[(2-fluorophenyl)methyl] (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate hydrochloride

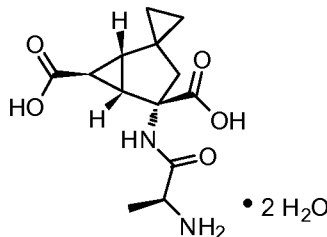
-36-



Add 4M hydrogen chloride solution in 1,4-dioxane (4.64 mL, 18.58 mmol) to a stirred solution of bis[(2-fluorophenyl)methyl] (*1S,2S,5R,6S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (0.98 g, 1.86 mmol) in 1,4-dioxane (4.64 mL) at room temperature under nitrogen and stir the solution for 20 hours. Concentrate *in vacuo* to give an oil (0.93 g). Dissolve in a mixture of acetonitrile (10 mL), water (30 mL) and freeze dry over the weekend to give a white solid (820 mg) as a mixture of title compound contaminated with (*1S,2S,5R,6S*)-2-amino-2-[(2-fluorophenyl)methoxycarbonyl]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-6-carboxylic acid (~7-10%). MS (*m/z*): 320 (*M*+*H*). Dissolve the white solid in acetonitrile (8 mL) to yield a translucent solution. Allow to stand for 1 hour, before filtering. Concentrate the filtrate *in vacuo* to yield a sticky foam. Redissolve in ethyl acetate, wash with a saturated solution of sodium hydrogen carbonate, dry over magnesium sulfate, filter and concentrate *in vacuo* to yield 774 mg. Redissolve in diethyl ether (11 mL), add 1M hydrogen chloride in diethyl ether (1.86 mL, 1.86 mmol), concentrate *in vacuo* to yield a white solid foam. Dry further overnight *in vacuo* at 50°C to yield the title compound (0.74 g, 85%). MS (*m/z*): 428 (*M*+1), 450 (*M*+23).

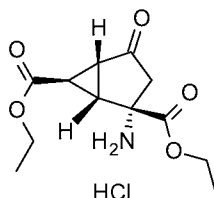
Example 10

(*1S,2S,5R,6S*)-2-[[*(2S)*-2-Aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0] hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid dihydrate



-37-

Step 1: Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate hydrochloride

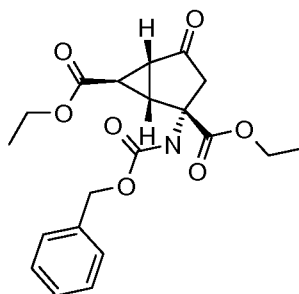


- 5 Under a nitrogen atmosphere, add acetyl chloride (86.5 mL, 1.2 mol) to absolute ethanol (1.0 L, 17.2 mol) drop-wise while maintaining the internal reaction temperature below 30 °C. Stir the resulting mixture for 15 minutes and add *di-t*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (100 g, 0.24 mol) in one portion. Heat the resulting mixture to reflux for 16-20 hours. Concentrate
- 10 the reaction mixture to an oil under reduced pressure. Dissolve the crude product in methylene chloride (250 mL) and concentrate *in vacuo*. Repeat the methylene chloride/concentration process to afford a white foam. Add ethyl acetate (150 mL) and heat the mixture to 65 °C. Add methyl *t*-butyl ether (100 mL) and stir the mixture at 65 °C for 15 minutes. Add methyl *t*-butyl ether (300 mL) over 15 minutes, stir at 65 °C for
- 15 15 minutes, then shut heat and allow the slurry to cool to ambient temperature. Filter the mixture and wash the filter cake with methyl *t*-butyl ether (150 mL). Transfer the cake to a vacuum oven and dry overnight at 25 °C to afford the crude product (67.5 g). Transfer the solids to a round bottom flask, dilute with ethyl acetate (170 mL) and heat the mixture to 65 °C. Stir the mixture for 1 hour, add tetrahydrofuran (68 mL) and ethanol (3 mL).
- 20 Shut heat source and add methyl *t*-butyl ether (272 mL) over 20 minutes, allowing the mixture to cool to ambient temperature. Filter the slurry, wash the cake with 95/5 methyl *t*-butyl ether /ethyl acetate (2 x 75 mL) and further dry the solids in a vacuum oven overnight at 25 °C to afford the title compound as a white solid (60.0g, 98.0%). MS (m/z): 256 (M+1).

25

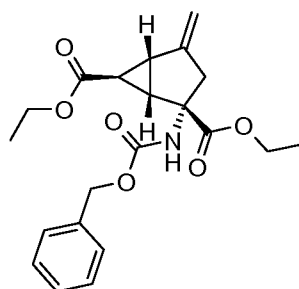
Step 2: Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate

-38-



Suspend diethyl-(1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-4-oxo-bicyclo[3.1.0] hexane-2,6-dicarboxylate-hydrochloride (55.0 g, 188.5 mmol) in tetrahydrofuran (220 mL), then add water (220 mL) and potassium carbonate (92.1 g, 659.9 mmol). Stir the resulting mixture for 30 minutes. Add benzyl chloroformate (26.7 mL, 175.3 mmol) to the mixture over 45 minutes, keeping the reaction temperature below 25 °C. Stir reaction mixture for 30 minutes, then dilute with ethyl acetate (550 mL) and water (275 mL). Separate the phases and back extract the aqueous layer with ethyl acetate (250 mL). Combine the organics and wash it sequentially with aqueous HCl (0.5N, 100 mL), saturated NaHCO₃ (100 mL) and brine (100 mL). Dry the organic solution over Na₂SO₄, filter and concentrate *in vacuo* to afford the title compound as a clear oil (67.6 g, 92.1%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.24-1.26 (m, 6H), 2.36 (bs, 1H), 2.47(dd, 1H), 2.78 (dd, 1H), 2.90 (dd, 1H), 4.09-4.19 (m, 4H), 5.08 (s, 2H), 5.73 (s, 1H), 7.24-7.36 (m, 5H).

Step 3: Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-benzoyloxycarbonylamino-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate

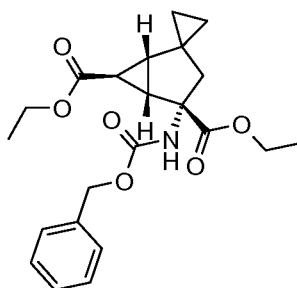


Under a nitrogen atmosphere, combine methyl-triphenylphosphonium bromide (67.4 g, 184.9 mmol) and tetrahydrofuran (300 mL) with agitation. Add a solution of potassium *tert*-butoxide (1M) in tetrahydrofuran, 184.9 mL, 184.9 mmol) to the reaction mixture over 15 minutes and stir the resulting slurry at ambient temperature for 3 hours.

-39-

Dissolve diethyl (*1S,2S,5R,6R*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (12.3 kg, 31.6 mol) in tetrahydrofuran (120 mL) and add to the reaction mixture over 1 hour, maintaining the reaction temperature below 30 °C. Stir the resulting slurry overnight at ambient temperature, then dilute with ethyl acetate (600 mL) and
5 quench with water (300 mL). After stirring the biphasic mixture for 30 minutes, separate the layers and wash the organics with water (300 mL) followed by 0.25M HCl (300 mL). Dry the organics over Na₂SO₄, filter, and concentrate *in vacuo* (45 °C) to afford the crude product as a dark oil (111.0 g). Purify the material by silica gel plug chromatography (1 Kg Kieselgel-60, 4 L 15% EtOAc in heptanes, then 10 L 30% EtOAc in heptanes) to
10 afford the title compound as a clear oil (37.3 g, 87.9% potency, 54.9%). MS (m/z): 388 (M+1).

Step 4: Diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-benzyloxycarbonylamino-4-oxo-bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate



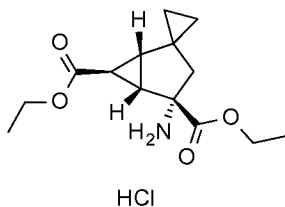
15

To a jacketed reaction flask connected to a chiller unit, add diethylzinc solution (157.2 mL, 157.2 mmol, 1M in heptanes) under a nitrogen atmosphere. Cool the solution to -15 °C and dilute with cold (-15 °C), dry dichloroethane (157.2 mL). Dissolve trifluoroacetic acid (11.1 mL, 146.7 mmol) in dichloroethane (11.1 mL) and add to the
20 reaction vessel over 50 minutes, keeping the internal temperature below -10 °C. Stir the resulting suspension at -10 to -15 °C for 30 minutes. Dissolve diiodomethane (12.7 mL, 42.1 g, 157.2 mmol) in dichloroethane (12.7 mL) and add to the reaction mixture over 50 minutes, keeping the internal temperature below -10 °C. Stir the resulting thin, white suspension at -10 to -15 °C for 30 minutes. Dissolve diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-
25 benzyloxycarbonylamino-4-methylene-bicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (20.3 g, 87.9% potency, 46.0 mmol) in dichloroethane (30.4 mL) and add to the reaction mixture

-40-

over 10 minutes, keeping the internal temperature below -10 °C. Stir the clear, pale yellow solution at -10 °C for 5 minutes and monitor for latent exotherms. Change the set point on the chiller to 0 °C and stir the reaction mixture at that temperature for 48 hours. Quench the reaction mixture by addition of 5N HCl (62.9 mL, 314.4 mmol) over 15 minutes, keeping the internal temperature below 6 °C. Stir the resulting mixture at 0-5 °C for 20 minutes, then transfer to a funnel and separate the layers. Wash the organic layer with 1N HCl (2 x 50 mL) followed by 1:1 saturated NaHCO₃/H₂O (60 mL), 1:1 saturated Na₂CO₃/H₂O (60 mL) and water (50 mL). Dry the organics over Na₂SO₄ and concentrate in vacuo to afford the title compound as a pale yellow oil (19.6 g, 60.3% potent, 63.9% corrected yield). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 0.37 (m, 2H), 0.52-0.55 (dm, 2H), 1.13-1.17 (m, 6H), 1.49-1.50 (m, 1H), 1.51-1.56 (m, 1H), 1.60-1.79 (m, 2H), 3.97-4.10 (m, 5H), 5.00 (s, 2H), 7.29-7.34 (m, 5H), 8.04 (s, 1H).

Step 5: Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate hydrochloride

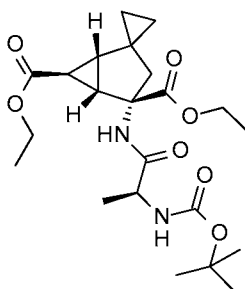


Charge absolute ethanol (100 mL, 10 volumes), concentrate. HCl (2.1 mL, 1.0 N) and diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-benzyloxycarbonylamino-2,6-dicarboxylate (9.7 g, 24.16 mmol) to a HEL reactor followed by Pd black (3.9 g, 40 wt%). Purge the reactor three times with nitrogen followed by three hydrogen purges and pressurization to 40 psi hydrogen. Allow the reaction to stir between 20-30°C for at least two hours until the completion of the reaction monitored by HPLC. Filter the resulting slurry through a pad of Hyflo Super Cel® and wash the wet cake with absolute ethanol (2 x 30 mL, 3 volumes). Transfer the filtrate to a clean reactor and displace ethanol with isopropyl acetate to approximately 5 volumes based on *in-situ* product yield from calibration curve. Cool the resulting slurry to 0-5°C over at least 3 hours. Filter the resulting slurry and wash the wet cake washed with cold isopropyl

-41-

acetate (3 x 5 mL, 0.5 volumes). Dry under reduced pressure at 30°C for at least 12 hours to provide the title compound (4.66 g, 15.34 mmol, 63.5%) ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.84 (s, 3H), 4.31-4.15 (m, 2H), 4.03 (q, J = 7.0, 2H), 2.42 (dd, J = 3.1, 2.6, 1H), 2.24 (dd, J = 6.2, 2.6, 1H), 1.94 (d, J = 14.1, 1H), 1.68 (d, J = 14.1, 1H), 1.63 (dd, J = 6.6, 3.1, 1H), 1.25 (t, J = 7.0, 3H), 1.17 (t, J = 7.0, 3H), 0.77-0.71 (m, 1H), 0.65-0.59 (m, 1H), 0.56-0.51 (m, 1H), 0.50-0.44 (m, 1H).

Step 6: Diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(2S)*-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate



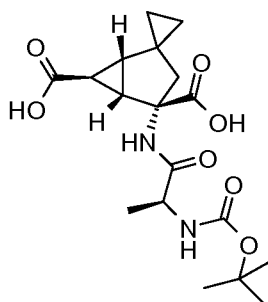
Charge tetrahydrofuran (45 mL, 10 volumes) and (*2S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoic acid (3.4 g, 1.2 equivalents) to a reactor followed by *N*-methylmorpholine (1.96 mL, 1.2 equivalents) and 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (3.12 g, 1.2 equivalents). Stir the resulting thin slurry between 20-25°C for at least 3 hours until the reaction is complete by HPLC. Charge diethyl (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate hydrochloride (4.55 g, 14.81 mmol) in one portion between 20-25°C followed by *N*-methylmorpholine (1.63 mL, 1.0 equivalents) over at least 10 minutes keeping the temperature between 20-25°C. Stir the resulting slurry between 20-25°C for at least 2 hours until the reaction is complete by HPLC. Filter the resulting solids and wash the wet cake with tetrahydrofuran (2 x 10 mL, 2.2 volumes) to provide the title compound assuming 100% yield. Use the pale amber tetrahydrofuran solution of the title compound without further purification assuming a 100% yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.46 (s, 1H), 6.72 (d, J = 7.9, 1H), 4.08-3.92 (m, 5H), 2.42-2.37 (m, 1H), 1.81-1.64 (m, 3H), 1.47 (dd, J =

-42-

6.6, 3.1, 1H), 1.34 (s, 9H), 1.18-1.08 (m, 9H), 0.66-0.59 (m, 1H), 0.57-0.52 (m, 1H), 0.46-0.36 (m, 2H).

Step 7: (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[*(2S)*-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)propanoyl]amino]

5 spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid



Charge 2 N NaOH (37 mL, 5.0 equivalents) and diethyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[*(2S)*-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-

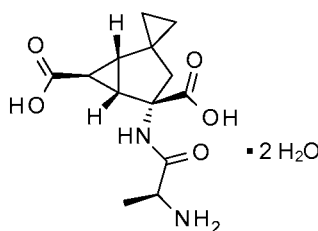
10 cyclopropane]-2,6-dicarboxylate (6.50 g, 14.81 mmol) to a reactor and allow to stir for at least 12 hours between 20-30°C until the reaction is complete by HPLC. Transfer the reaction to a separatory funnel and allow it to settle for at least 10 minutes. Separate the phases and return the lower aqueous layer to the reactor. Add ethyl acetate (90 mL, 13.8 volumes) to the mixture, and then add 1 N NaHSO₄ until pH reaches 2 to 2.5. Separate

15 layers and wash the organic with water (45 mL, 6.9 volumes). Remove water in organic phase atmospheric distillation with ethyl acetate to remove residual water. Cool the resulting slurry between 20-30°C over at least 2 hours and allowed to granulate at that temperature for at least 90 minutes. Filter the resulting solids and wash the wet cake with ethyl acetate (3 x 15 mL, 2.3 volumes). Dry under reduced pressure at 45°C to provide

20 the title compound as a white solid (4.45 g, 11.64 mmol, 78.6%) ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 50°C): δ 12.01 (s, 2H), 8.22 (s, 1H), 6.49 (bs, 1H), 4.00 (bs, 1H), 2.43 (dd, J = 6.5, 2.8, 1H), 1.83 (d, J = 14.0, 1H), 1.68-1.62 (m, 2H), 1.42 (dd, J = 6.5, 2.8, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.15 (d, J = 7.1, 3H), 0.67-0.61 (m, 1H), 0.56-0.51 (m, 1H), 0.46-0.36 (m, 2H).

25 **Step 8:** (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[*(2S)*-2-Aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0] hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid dihydrate

-43-



Charge water (32 mL, 8 volumes) and (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[[(2*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propanoyl]amino] spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid (3.99 g, 10.4 mmol) to a reactor followed by concentrated HCl (1.80 mL, 2.0 equivalents) and then heat the reaction to 45-55°C until the reaction complete (monitor by HPLC). Cool the reaction mixture to 20-30°C and adjust the pH to approximately 3.6 with 5 N NaOH. Add absolute ethanol (15 mL, 3.75 volumes) over at least 30 minutes between 20-30°C to the resulting slurry. Allow the resulting slurry to granulate between 20-30°C for at least 12 hours. Cool the mixture between -5-5°C and allow it to granulate for at least 60 minutes. Filter the resulting solids and wash the cake with 30% absolute ethanol in water (2 x 9 mL, 2.25 volumes). Dry the solids under reduced pressure at 35°C for at least 12 hours, and then allow the resulting solids to stay on the balance until no additional weight change for at least 2 hours to provide the title compound as a white solid (2.71 g, 8.51 mmol, 81.6%). ¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ 3.90 (q, *J* = 7.2, 1H), 2.56 (dd, *J* = 6.5, 2.9, 1H), 1.74-1.66 (m, 2H), 1.62-1.54 (m, 2H), 1.39 (d, *J* = 7.1, 3H), 0.61-0.56 (m, 1H), 0.55-0.49 (m, 1H), 0.40-0.30 (m, 2H).

The X-ray powder diffraction (XRD) patterns of crystalline solids are obtained on a Bruker D4 Endeavor X-ray powder diffractometer, equipped with a CuKα source ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) and a Vantec detector, operating at 35 kV and 50 mA. The sample is scanned between 4 and 40° in 2θ, with a step size of 0.0087° in 2θ and a scan rate of 0.5 seconds/step, and with 0.6 mm divergence, 5.28 mm fixed anti-scatter, and 9.5 mm detector slits. The dry powder is packed on a quartz sample holder and a smooth surface is obtained using a glass slide. The diffraction pattern were adjusted based on NIST 675 standard peaks at 8.85 and 26.77 degrees 2-theta. It is well known in the crystallography art that, for any given crystal form, the relative intensities of the diffraction peaks may vary due to preferred orientation resulting from factors, such as crystal habit, and the

-44-

angular peak positions may vary slightly. For example, peak positions can shift due to a variation in the temperature or humidity at which a sample is analyzed, sample displacement. In the present case, a peak position variability of ± 0.2 in 2θ will take into account these potential variations without hindering the unequivocal identification of the indicated crystal form. Confirmation of a crystal form may be made based on any unique combination of distinguishing peaks (in units of $^\circ 2\theta$), typically the more prominent peaks. The crystal form diffraction patterns are collected at ambient temperature and relative humidity.

Thus, a prepared sample of Example 10 is characterized by an XRD pattern using CuK α radiation as having diffraction peaks (2-theta values) as described in Table 1 below. Specifically the pattern contains a peak at 5.20 in combination with one or more of the peaks selected from the group consisting of 10.45, 11.70, 15.75, 21.06 and 23.59 with a tolerance for the diffraction angles of 0.2 degrees.

Table 1: X-ray powder diffraction peaks of Example 10

Peak	Angle (2-Theta $^\circ$)	Intensity (%)
1	5.20	100
2	10.45	43.9
3	11.70	23.8
4	13.09	24.1
5	15.75	45.9
6	16.80	56.4
7	20.49	15.3
8	21.06	79.3
9	23.58	96
10	26.44	20.9

The mGlu receptors are G-protein-coupled receptors that modulate neuronal excitability. More particularly, altered glutamate neurotransmission has been linked to neurological disorders such as chronic pain conditions including persistent pain,

-45-

neuropathic pain, chronic inflammatory pain, or visceral pain; psychiatric disorders, such as schizophrenia, bipolar disorder, generalized anxiety disorder, or post traumatic stress disorder; or neurogenerative disorders.

Since the compounds of the present invention are mGlu2/3 agonists, they may be
5 suitable for treating the aforementioned conditions.

Human mGlu2 and mGlu3 Agonist FLIPR Assay

AV-12 cell lines, derived from Syrian Hamster fibroblasts and stably expressing the human mGlu2 or mGlu3 receptor and co-transfected with the rat glutamate transporter
10 EAAT 1 (Excitatory Amino Acid Transporter 1) and the G α 15 subunit, are used for these studies. The expression of G α 15 allows Gi-coupled receptors to signal through the phospholipase C pathway, resulting in the ability to measure receptor activation by a fluorometric calcium response assay. The cell lines are maintained by culturing in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with high glucose and pyridoxine
15 hydrochloride supplemented with 5% dialyzed fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 1 mM of L-glutamine, and 5 μ g/mL blasticidin (all media are purchased from Invitrogen). Confluent cultures are passaged biweekly using an enzyme-free dissociation solution (Chemicon S-004-B). Cells are harvested 24 hours prior to assay and dispensed using a
20 Matrix Well-Mate cell seeder at 85,000 (mGlu2) or 115,000 (mGlu3) cells per well into 96-well, black-walled, poly-D-lysine-coated plates (BD BioCoat #354640) in medium containing only 250 (mGlu2) or 125 (mGlu3) μ M L-glutamine (freshly added). Intracellular calcium levels are monitored before and after the addition of compounds using a Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR, Molecular Devices). The assay
25 buffer is comprised of Hank's Buffered Salt Solution (HBSS; Sigma) supplemented with 20 mM HEPES. The medium is removed and the cells are incubated with 8 μ M Fluo-3AM (Molecular Probes, F-1241; 50 μ L per well) in assay buffer for 90 minutes (mGlu2) or 120 minutes (mGlu3) at 25°C. The dye solution is removed and replaced with fresh assay buffer (50 μ L per well). A single-addition FLIPR assay generating an 11-point
30 concentration response curve (3X dilutions starting at 10 μ M) for the agonist glutamate (Fisher A125-100) is conducted prior to each experiment to confirm the typical EC₅₀

-46-

response. Results are analyzed using Prism v4.03 (GraphPad Software). Compounds of the invention are tested in a single-addition FLIPR assay using a 10-point concentration response profile using 3X dilutions starting at a final concentration of 25 μ M.

Compounds of the invention are solubilized as 10mM stocks in 0.1N NaOH and stored at
5 -20C. They are diluted through a three-fold dilution series into assay buffer. After taking an initial 5-sec fluorescent read on the FLIPR instrument, a compound of the invention is added to the cell plate (50 μ L per well). Data are collected every second for the first 30 seconds and then every 3 seconds for a total of 90 seconds in order to detect agonist activity. The maximal response is defined as that induced by EC_{max} (100 μ M
10 glutamate). The compound effect is measured as maximal minus minimal peak heights in relative fluorescent units (RFUs) corrected for basal fluorescence measured in the absence of glutamate. Determinations are carried out using single plates. Agonist effects are quantified as percent stimulation induced by compound alone relative to the maximal glutamate response. All data are calculated as relative EC₅₀ values using a four-
15 parameter logistic curve fitting program (ActivityBase v5.3.1.22).

Example 2 is measured in the hmGlu2 FLIPR assay run substantially as above to have an EC₅₀ of 39.0 nM $\pm$ 5.9 (n = 3, error calculated as SEM). Example 2 is also measured in the hmGlu3 FLIPR assay run substantially as above to have an EC₅₀ of 285 nM $\pm$ 52.5 (n = 8, error calculated as SEM). These results demonstrate that Example 2 is
20 a potent mGlu2 and mGlu3 agonist.

Reversal of Persistent Pain Induced by Formalin Injection

The administration of formalin into plantar surface of the rat hind paw results in two phases of nocifensive behavior (such as licking, biting, and flinching of the injected
25 paw): an early phase during approximately the 5 minutes after formalin administration and a late phase from approximately minute 10 through minute 60 after formalin injection. A quiescent period from approximately minute 5 to minute 10 separates the two phases. The scoring of these formalin-induced behaviors can be automated using startle chambers (SR-Lab, San Diego Instruments, San Diego, CA) which detects
30 movements of the rats by means of an accelerometer. A test compound (active) is dosed (intraperitoneal route) in non-fasted male Sprague-Dawley rats within a range of 0.3 - 10 mg/kg 1 hour prior to the injection of intraplantar formalin. The rats are then individually

-47-

placed in cylinders within the test chambers for acclimation. A test compound (prodrug) is orally dosed within a range of 0.45 - 15 mg/kg, in non-fasted male Sprague-Dawley rats two hours prior to the injection of intraplantar formalin. The rats are then individually placed in cylinders within the test chambers for acclimation. At specified

5 time points, the rats are removed from the cylinders and administered formalin (50 μ L of a 5% solution in saline) subcutaneously into the plantar surface of the right hind paw and immediately placed back into the cylinders. The cylinders are positioned on the load cells of the detection system within the test chambers, thereby allowing for the response to be monitored continuously for 60 minutes in 1-second bins. The number of nocifensive

10 events [the number of 1-second bins with >20-load units] is totaled in 5-minute intervals. The 20-load unit threshold is large enough to eliminate the inclusion of normal physiological events such as breathing or sniffing, but of a significant magnitude to detect nocifensive events. Data are converted determining the number of events over threshold (20 load units) in each 1 second time bin over the 60 minutes of data collection. The early

15 phase score is the sum of events greater than 20 load units from Time 0 to 5 minutes. The late-phase score is obtained by adding the total number events greater than 20 load units from Minute 11 to Minute 40 of the data collection period. Formalin data are evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) and the appropriate contrasts analyzed by Dunnett's 't' test for two-sided comparisons using JMP (v 6.0.2) statistical analysis

20 program (SAS Institute Inc, Cary, NC). Differences are considered to be significant if the p-value is less than 0.05. ED₅₀ calculations are performed using non-linear regression curve fitting on percent reversal transformed data for each dose.

Example 2 is measured in this assay, run substantially as above, to have an ED₅₀ of 0.7 mg/kg (i.p.). Example 10 is measured in this assay, run substantially as above, to

25 have an ED₅₀ of 4.8 mg/kg (p.o.). These results demonstrate that compounds within the scope of the present invention are useful medications for persistent pain.

Reversal of L5/L6 Nerve Ligation Induced Tactile Allodynia

Unilateral ligation of nerves innervating the hind leg region will result in a chronic

30 persistent pain manifested as tactile allodynia in rats. L5/L6 nerve ligation is performed (Kim *et al. Pain* (1992) 50, 355-363). Neuropathic injury is produced by tightly ligating the left L5 and L6 spinal nerves under gaseous anesthesia with a mixture of isoflurane

-48-

(3% for induction and 2% for maintenance) and oxygen. After a minimum of 14 days after surgery, tactile allodynia is evaluated by measuring tactile sensitivity of the injured paw to von Frey filaments with incremental bending forces (0.3 to 15 g) (Chaplan *et al. J. of Neuroscience Methods* (1994) 53, 55-63). Rats are considered to be hypersensitive when they demonstrate tactile allodynia (paw withdrawal in response to the application of a bending force of less than 2 grams). Baseline values are determined immediately prior to assessment of test compound. A test compound (prodrug) is orally dosed at 15 mg/kg and the tactile threshold for paw withdrawal is measured at 1, 2 and 4 hours post dosing. Data are expressed as response threshold in grams (g) and values are with standard errors of means ($\pm$ SE mean) for each time point. Data are analyzed using an analysis of variance followed by a Dunnett's post hoc analysis and represent absolute change in pain threshold (C_{max} = maximum Response Baseline) and expressed as Mean [$\log$ (maximum response) – $\log$ predose score)] (g).

Example 10 dosed orally at 15 mg/kg (wherein $n=8$; error calculated as SEM) is measured in this assay, run substantially as above, to have significantly increased mechanical threshold at one, two and four hours: 9.06 ± 2.26 , 12.31 ± 1.86 and 8.63 ± 1.98 , respectively, as compared to the corresponding values after vehicle treatment: 1.50 ± 0.60 , 1.34 ± 0.75 , and 2.35 ± 0.62 at one, two and four hours respectively. These results demonstrate that compounds within the scope of the present invention are useful medications for neuropathic pain conditions.

Reversal of CFA-Induced Mechanical Hyperalgesia

Induction of local inflammation in the rat hind paw will cause a persistent mechanical hyperalgesia that can be measured by determining the threshold to pressure stimuli to give a painful response. The method for complete Freund's adjuvant (CFA) induced mechanical hyperalgesia in rats is largely described in Iadarola *et al. Brain Res.* (1988) 455, 205-212. Rats are placed under isoflurane anesthesia while the right paw is injected with 50 μ l of CFA (Sigma C5881, 1 mg/ml mycobacterium extract in 85% paraffin oil, 15% mannide monooleate) intraplantar. Animals are allowed to recover in soft bedding cages and mechanical hyperalgesia changes measured 24 hours post-CFA injection. Mechanical hyperalgesia (Randall Sellito Test) is determined by gently restraining the rat and placing the paw between the plinth and pusher (Ugo Basile

-49-

Analgesy-meter). The gram force when the animal withdraws the paw is recorded. A maximal force of no more than 250 grams is applied and if the rat does not withdraw the paw, a value of 250 grams is recorded.

Rats are tested for baseline response prior to CFA injection. Post-CFA response is tested the next morning (about 24 hours post injection of CFA). Rats are randomized based on post-CFA response with any rat showing a score of >150 grams excluded from further testing. A test compound (prodrug) is orally dosed within a range of 1.5 to 15 mg/kg and mechanical threshold for paw withdrawal is measured at 1 and 2 hours post dosing. Statistical significance is defined as a p value < 0.05 in an analysis of covariance followed by a Dunnett's post hoc test for each time point. Table 2 below provides the statistically significant results for Example 10 run substantially as above. These results demonstrate that compounds within the scope of the present invention are useful medications for chronic inflammatory pain conditions such as osteoarthritis or rheumatoid arthritis.

Table 2

	Paw withdrawal Threshold (grams, force)			
	Baseline (Pre CFA)	24 hours (post CFA)	One hour (post dosing)	Two hours (post dosing)
Vehicle (1% HEC)	236 ± 7	112 ± 9	98 ± 7	109 ± 14
1.5 mg/kg po of Example 10	243 ± 5	113 ± 8	180 ± 14*	186 ± 19*
4.5 mg/kg po of Example 10	221 ± 10	114 ± 9	153 ± 20*	221 ± 20*
15 mg/kg po of Example 10	244 ± 4	108 ± 12	250 ± 0*	232 ± 15*

Values are mean ± SEM for an N = 8-10 per group.

* p value < 0.05 vs. vehicle at same time point (ANOVA and Dunnett's t-test)

Reversal of Colorectal Distension-Induced Pain Behaviors.

Visceral pain in rats can be induced by distension of the colorectal cavity and pain monitored by accessing the reflex contraction of abdominal muscles. Measurement of abdominal muscle reflex contractions with pain caused by colorectal distension in the rat

-50-

is performed substantially as described by Fioramonti *et al. Neurogastroenterology and Motility* (2003) 15, 363-369 and Urban *et al. J. of Pharmacology and Exp. Ther.* (1999) 290, 207-213. Male Sprague Dawley rats are surgically implanted with electromyographic (EMG) electrodes in the oblique abdominal muscle and allowed to recover for one week, during which animals are acclimated to handling and partial restraint to minimize effects of stress. Baseline EMG measurements are collected and recorded after the insertion into the rectum (8 cm) of a lubricated latex balloon attached to a pressure monitor/regulator to step the pressure between 20, 40, and 60 mm Hg for a 20 second duration with a 3 minute resting period between trials. A set of three exposures at each pressure is recorded before stepping the pressure up to the next level. Data are collected as the area under the curve for EMG reading (μ volts per second) during the pressure stimulations, and averaged over the three trials. A test compound (prodrug) is orally dosed within a range of 1.5 to 17 mg/kg 90 minutes prior to the beginning of the colorectal distension. Statistical significance is defined as a p value < 0.05 in an analysis of covariance followed by a Dunnett's post hoc test. Table 3 below provides the statistically significant results for Example 10 run substantially as above. These results demonstrate that compounds within the scope of the present invention are useful medications for visceral pain conditions.

Table 3

	AUC of EMG reading for abdominal muscle (μ V/sec) with 60 mm Hg colorectal pressure	
AUC of EMG reading for abdominal muscle (μ V/sec) with 60 mm Hg colorectal pressure	Baseline (pre-dosing)	90 minutes (postdosing)
Vehicle (1% HEC)	813 $\pm$ 101	849 $\pm$ 65
1.5 mg/kg po of example 10	853 $\pm$ 142	618 $\pm$ 92
4.5 mg/kg po of example 10	887 $\pm$ 152	531 $\pm$ 99*
17 mg/kg po of example 10	773 $\pm$ 134	266 $\pm$ 87*

Values are mean $\pm$ SEM for an N = 8-16 per group.

* p value < 0.05 vs. vehicle at same time point (ANOVA and Dunnett's t-test)

Reversal of Phencyclidine (PCP)-Induced Hyperlocomotor Activity in Rats

Administration of NMDA receptor antagonists, such as ketamine or phencyclidine (PCP), produces psychotomimetic-like effects in humans that are similar to those symptoms observed in patients with schizophrenia. The ability of agents to reverse the locomotor-stimulating effects of NMDA antagonists are often used as an animal model of psychosis, demonstrating good predictive validity for detecting clinical efficacy of medications for schizophrenia and bipolar disorder.

Motor activity is monitored by placing individual male, Sprague-Dawley (Harlan, Indianapolis, IN) rats in transparent, plastic shoe-box cages of the dimensions 45 x 25 x 20cm, with 1 cm depth of wood chips as bedding, and a metal grill on top of the cage. Motor monitors (Kinder Scientific) consist of a rectangular rack of 12 photobeams arranged in an 8 x 4 formation, (or a high density grouping of 22 in a 15x7 pattern) at a height of 5 cm, with a second rack (for measuring rearing behaviors) at a height of 15 cm. The shoe box cage is placed inside of these racks, with the racks on a 3 foot high tabletop in an isolated room. A compound of the invention (active) is dosed (intraperitoneal route) within a range of 0.3 - 10 mg/kg, 30 minutes prior to a 5 mg/kg challenge dose of phencyclidine (PCP). A compound of the invention (prodrug) is orally dosed within a range of 0.3 - 30 mg/kg, in overnight fasted rats, 4 hours prior to a 5 mg/kg challenge dose of PCP. On the test day, rats are placed in the test cage and allowed to acclimate for 30 minutes prior to PCP challenge; rats are monitored for an additional 60 minutes following PCP administration.

Data analysis and ED₅₀ calculations are conducted using GraphPad Prism (San Diego, CA. USA). Power analyses have determined that 8-10 rats per group are needed to have appropriate statistical power for detecting treatment differences (power = 0.8). A one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Dunnett's multiple comparison test is conducted on the total 60 minute locomotor activity. ED₅₀ calculations are performed using non-linear regression curve fitting on percent reversal transformed data for each dose.

Example 2 is measured in this assay run substantially as above to have an ED₅₀ of 1.46 mg/kg (i.p.). Examples 5 and 6 are measured in this assay run substantially as above

-52-

to have 2.95 mg/kg (p.o.) and 4.31 mg/kg (p.o.), respectively. These results demonstrate that compounds within the scope of the present invention are useful medications for schizophrenia and bipolar disorder.

5 Attenuation of Stress-Induced Hyperthermia in Rats

Hyperthermia, a rise in core body temperature, is a general phenomenon that has been reliably demonstrated in many mammals, including humans, in response to stress. In many anxiety disorders, hyperthermia occurs as part of the pathology and is considered a symptom of the disease. Compounds which attenuate stress-induced hyperthermia in
10 animals are believed to be useful in treating anxiety disorders in humans. Generalized anxiety disorder and post traumatic stress disorder are among the disorders that may be treated with such compounds. The conventional and minimally-invasive method for analyzing stress-induced hyperthermia is by measuring body temperature, and stress-induced increases in body temperature, via rectal thermometer. Male Fischer F-344 rats
15 (Harlan, Indianapolis, IN, USA) weighing between 275 – 350 g are tested. All animals are individually-housed with food and automated water available ad libitum, and maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:00). Animals are fasted for approximately 12-18 hours before the experiment, which is conducted during the light phase. Rats are dosed intraperitoneal (IP) in a dose volume of 1 mL/kg with compounds
20 of the invention in the range of 0.3, 1, 3, and 10, mg/kg. Vehicle is saline + NaOH added to achieve a pH of 5-7. The mGluR5 antagonist MTEP (3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]pyridine), which has demonstrated robust anxiolytic-like activity in preclinical models, is used as a comparator (5 mg/kg, IP route, dissolved in water). Immediately following dosing, rats are returned to their home cage, and the experimenter turns off the
25 lights and leaves the room. The dosing room is darkened for the remainder of the 1- hr pretreatment period.

After the pretreatment period, rats are taken individually to a brightly lit adjacent room where baseline body temperatures are determined by insertion of a rectal probe lubricated with mineral oil. Body temperature is assessed using a PHYSITEMP BAT-
30 12[®] Microprobe Thermometer with a PHYSITEMP RET-2[®] rat rectal probe (Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, USA). The probe is inserted approximately 2 cm into the rectum, to measure the core body temperature (this is the baseline body temperature, T1,

-53-

in degrees Celsius). Ten minutes later a second body temperature measurement is recorded (T2). The difference in body temperature (T2 – T1) is defined as the stress-induced hyperthermic response. The dose at which a compound of the invention produces a 35% reduction in stress-induced hyperthermic response, relative to the vehicle response, is defined as the T₃₅ dose.

Example 2 is measured in this assay run substantially as above to have a T₃₅ of 0.57 mg/kg. Example 5 is measured in this assay run substantially as above to have a T₃₅ of 6.4 mg/kg. These results demonstrate that compounds within the scope of the present invention are useful medications for anxiety disorders. More particularly, compounds within the scope of the present invention may be useful medications for generalized anxiety disorder and/or post traumatic stress disorder.

In Vitro PepT1 GlySar Inhibition Screen and IC₅₀ Determination

PepT1 assays are established to examine the ability of the prodrugs to interact with the intestinal absorption transporter PepT1.

HeLa cells, derived from human intestine, (American Type Culture Collection) are grown in Hyclone Medium (Invitrogen, Cat# SH30243) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 0.1 mM non essential amino acids (NEAA), and 100 units/mL penicillin with 100 µg/mL streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The cell line is used for up to 40 passages and then discarded. Frozen cells in 1 mL vials are thawed in water bath for 1-2 minutes and added to 5 mL of cell medium at 37°C. Each of the T-flasks is provided with 8.5 mL of the fresh medium and 1.5 mL of the cell stock. Cells are passaged twice during a week. This is achieved by rinsing the flasks with 10 mL of phosphate buffered saline-ethylene diaminetetra acetic acid (PBS-EDTA), adding 2 mL of trypsin for 2-5 minutes, to detach the cells, and adding 8 mL of fresh medium to inhibit further activity of trypsin. Each new flask receives a combination of 8.5 mL of fresh medium and 1.5 mL of cell stock, in order to obtain 1:6 cell dilution. Cells are incubated at 37°C, until ready for the uptake study.

Cells that are 70-80% confluent in the T-flasks are plated 1 day prior to the transfection procedure. The flask with the cell stock is treated with PBS-EDTA and trypsin to detach the cells, and transfection medium is used from this point. Transfection medium consists of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + NEAA. To each

-54-

well, 0.5 mL of the cell mixture is added (1.3×10^5 is the desired cell concentration) and the cells are incubated at 37°C overnight. Twenty four hours before the assay, cells are transfected with PEPT1. Transfection mixture is prepared by mixing 600 μ L of serum free transfection medium, 18 μ L of FuGene6 (Roche Diagnostics), and 11 μ g of the
5 PepT1 DNA. The transfection reagent-DNA complex is incubated for 20 minutes and 24 μ L of the reagent-DNA complex is added to each well.

Inhibition of PEPT1-mediated [glycyl-1-2- ^{14} C]Glycylsarcosine (GlySar) uptake activity is measured in the cells cultured in the 24-well plates 24-hours post transfection as previously published (Zhang et al. 2004. J. Pharm. Exper Ther. 310:437-445). To
10 measure the ability of a compound of the invention to inhibit the uptake of [^{14} C]Gly-Sar, prodrugs are incubated with 80 to 90% confluent PepT1 transiently transfected HeLa cells at 5 mM in pH 6.0 uptake medium in the presence of 5 μ M [^{14} C]Gly-Sar (Moravcek Biochemicals) and 20 μ M cold Gly-Sar. Uptake media consists of 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 5 mM Glucose, 25 mM
15 tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer (TRIS). The solution is then brought to pH 6.0 using 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid. The incubation volume is 500 μ L and is performed at room temperature for 3 minutes. To stop the uptake at the conclusion of the incubation time, the uptake media is aspirated off of the cell monolayer and 500 μ L of ice cold PBS added to the well. The cells are washed 3 times with 500 μ L of room
20 temperature PBS without Ca⁺² and Mg⁺². The cells are then lysed with 300 μ L of 1% Triton X100 H₂O solution. A 200 μ L aliquot is removed and radioactivity is determined by liquid scintillation counting to measure the [^{14} C]Gly-Sar present in each of the incubation wells. A no inhibitor control is established and the percent inhibition of each prodrug is calculated with respect to this control. A negative control (Glycine) and two
25 positive controls (Cefadroxil and Cefalexin) are performed in parallel with each experiment to demonstrate viability of the assay system. Prodrugs with GlySar uptake inhibition equal or better than Cephallexin are considered acceptable. Mean values $\pm$ standard deviation are $10.1 \pm 9.5\%$ (n=19) for Glycine, $53.2 \pm 13.2\%$ (n=19) for Cefadroxil, and $37.5 \pm 14.7\%$ (n=18) for Cephallexin.

30 For the PepT IC₅₀ assay, prodrugs are incubated at a range of concentrations (0.0625 to 25 mM) in the presence of 5 μ M [^{14} C]Gly-Sar and 20 μ M cold Gly-Sar. The incubation and sampling procedures are exactly the same as the PepT1 screen described

-55-

above. [^{14}C]Gly-Sar uptake data are evaluated for each of the prodrug concentrations and IC_{50} values are calculated.

Examples 5, 6, and 7 are measured in this assay run substantially as above to have hPepT1 [^3H]Gly-Sar uptake inhibition at 5mM of 89%, 87%, and 78%, respectively.

- 5 Examples 5 and 6 are measured in this assay run substantially as above to have hPepT1 [^3H]Gly-Sar uptake inhibition IC_{50} of 1.98 mM and 0.25 mM, respectively. These results demonstrate that compounds within the scope of the present invention are orally absorbed via the PepT1 transporter.

10 *In Vitro* Intestinal Prodrug Hydrolysis Assay

Frozen human duodenum intestinal homogenates (1:2 tissue:buffer ratio using 100 mM Tris Phosphate buffer, pH 7.4) are obtained from Celsius *In Vitro* Technologies (Baltimore, MD) that were both phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF) and EDTA free.

- 15 Each lot of human duodenum is obtained from a single donor and the intestine is scraped and the sections are frozen separate. All original tissue collections are performed at 4°C and immediately frozen at -70°C. Human intestinal homogenates are thawed and diluted to a final protein concentration of 0.5 mg/mL in 100 mM PBS buffer, pH 7.4 immediately prior to the incubations.

- Incubations are conducted in 96-well plates and all prodrugs are run in duplicate
20 on each day. Stock prodrug solutions are prepared in water at a concentration of 1 mM. A 200 μL aliquot of 0.5 mg/mL intestinal homogenate and 196 μL of 100 mM PBS buffer are placed in a 96-well plate in a 37°C water bath. Using a 96-well pipettor, 4 μL of the 1 mM prodrug solution is transferred into the homogenate. Immediately after addition of the prodrug (time zero) and after 1 hour incubation, 50 μL samples of the incubation
25 mixture are removed using an automated disposable simultaneous 96 well pipettor and added directly to 200 μL of methanol quench solution containing 100 ng/mL of Internal Standard. The samples are then centrifuged at 3500 rpm for 5 minutes at 10 °C. The supernatant (200 μL) is transferred to a final 96 well PCR plate and sealed for analysis by LC/MS/MS.

- 30 Concentrations of hydrolyzed active metabolite in the incubation mixtures are determined using LC/MS/MS detection on a Sciex API 4000 quadrapole mass

-56-

spectrometer with Analyst version 1.4.2, TurboIonSpray, positive ionization, and Selected Reaction Monitoring (SRM). A Waters Atlantis® T3 (20 x 2.1 mm, 5 µM) HPLC column is used at ambient temperature with a flow rate of 1.0 mL/min and a mobile phase gradient from 0.1% mobile phase A to 99% mobile phase A. Mobile phase A is 1000:5
5 water: heptafluorobutyric acid and mobile phase B is 1:1 methanol:glacial acetic acid.

Concentrations of hydrolyzed active metabolite in the intestinal incubation mixtures are determined from standard curves prepared by replicate two-fold dilution starting at 10 µM in 100 mM PBS pH 7.4 and subsequently quenched with methanol-internal standard solution identical to the samples. Averages and standard deviations are
10 calculated using Microsoft® Office Excel® 2007. Amount of hydrolysis is determined as a molar percentage of active metabolite formed relative to prodrug concentration added. Hydrolysis of the positive control, Internal Prodrug A to Internal Active Metabolite Drug A, run in every batch averaged 75.3% (n=20). Final values are then normalized relative to the formation of Internal Active Metabolite Drug A.

15 Examples 5, 6, and 7 are measured in this assay run substantially as above to have human intestinal hydrolysis relative to Internal Prodrug A of 36% (n=3, SD = 2.7), 44% (n=3, SD = 4.1), and 34% (n=1), respectively. These results demonstrate that compounds within the scope of the present invention are hydrolyzed in the human intestine.

20 *In Vitro* Human Liver S-9 Homogenate Hydrolysis Assay

Liver S9 fractions are obtained from Xenotech LLC (Lenexa, MO). The lot is from a pool of two donors, one male and one female. The liver S9 fraction is prepared and diluted using a homogenization buffer consisting of 50mM Tris, pH 7.4 at 4°C and 150mM potassium chloride without EDTA. Prodrugs are incubated in the liver
25 homogenate for 2 hours at 37°C, after which the concentration of active metabolite is determined by LC/MS/MS. Hydrolysis of Clopidogrel to Clopidogrel Carboxylic Acid is utilized as an assay positive control.

Incubations are conducted in 96-well format and all prodrugs are run in duplicate on each day. Stock prodrug solutions are prepared in water at a concentration of 1 mM.

30 Human liver S9 fraction is diluted to a final protein concentration of 0.5mg/ml in 100mM PBS buffer, pH 7.4.

-57-

A 200 μ L aliquot of 0.5mg/mL human liver S-9 homogenate and 196 μ L of 100mM PBS buffer are placed in a 96-well plate in a 37°C water bath. Using a 96-well pipettor, 4 μ L of the 1 mM prodrug solution is transferred into the homogenate. To ensure hydrolysis is not due to chemical instability, prodrugs are also incubated with PBS buffer alone without liver S-9. Immediately after addition of the prodrug (time zero) and after 1 hour incubation, 50 μ L samples of the incubation mixture are removed using an automated disposable simultaneous 96-well pipettor and added directly to 200 μ L of methanol quench solution containing 100 ng/mL of Internal Standard. The samples are then centrifuged at 3500 rpm for 5 minutes at 10°C. The supernatant (200 μ L) is transferred to a final 96 well PCR plate and sealed for analysis by LC/MS/MS.

LC/MS/MS quantification of active metabolite formed during the incubation is performed on a Sciex API 4000, Analyst version 1.4.2, TurboIonSpray, positive ionization, and Selected Reaction Monitoring (SRM). The HPLC column used is a Waters Atlantis® T3 (20 x 2.1 mm, 5 μ m) at ambient temperature with a mobile phase flow rate of 1.0 mL/min. Mobile phase A is 1000:5 water: heptafluorobutyric acid and mobile phase B is 1:1 methanol/ glacial acetic acid. A mobile phase gradient is utilized starting mobile phase ratio A/B of 99.9/ 0.1 and finishing at 1/99.

Concentrations of hydrolyzed active metabolite in the incubation mixtures are determined from standard curves prepared by replicate two-fold dilution starting at 10 μ M in 100 mM PBS pH 7.4 and subsequently quenched with methanol-internal standard solution identical to the samples. Averages and standard deviations are calculated using Microsoft® Office Excel® 2007. Final values are presented as a molar percentage of active metabolite formed relative to prodrug concentration added. Hydrolysis of Clopidogrel to Clopidogrel Carboxylic Acid is used as the positive control and averages 73.0% (n=27).

Examples 8 and 9 are measured in this assay run substantially as above to have human liver S9 hydrolysis of 23% and 59.3%, respectively. These results demonstrate that compounds within the scope of the present invention are hydrolyzed in the human liver.

The data demonstrate that the exemplified amino acid prodrugs inhibit the uptake of the PepT1 substrate GlySar as good as or better than cefadroxil and cephalixin (Zhang

-58-

et al, 2004. JPET 310:437-445), suggesting potential for human oral absorption via the PepT1 transporter. In addition to prodrug absorption, upon entering the body, prodrug hydrolysis to yield the active metabolite is essential. The present *in vitro* hydrolysis studies suggest the exemplified amino acid prodrugs can be hydrolyzed by human intestine. Hydrolysis of the exemplified diester prodrugs occur in human liver homogenates suggesting the potential for the exemplified diester prodrugs to have hydrolysis in humans following oral exposure. Together these data indicate the potential for the exemplified amino acid prodrugs and exemplified diester prodrugs to be hydrolyzed in humans to liberate the active metabolite.

Pharmacokinetics Assay

Fasted, male Sprague Dawley rats are administered Example 2 intravenously at 1 mg/kg or Example 5 by oral gavage at a dose of 7.5 mg/kg (equal to a 5 mg/kg molar equivalents of Example 2) in a standard cross-over design (N=3 with each rat receiving both an intravenous and oral dose). For intravenous administration, Example 2 is dissolved in water and for the oral dose Example 5 is prepared in an aqueous vehicle of hydroxyethylcellulose (1%), polysorbate 80 (0.25%) and antifoam 1510-US (0.05%). Cannulas are surgically implanted to facilitate serial blood collection. Blood is collected in EDTA tubes over a period of 0-24 hours post-dosing, centrifuged and plasma is stored frozen until time of analysis.

Plasma samples are thawed, 50 μ L aliquots are transferred to a 96-well plate, 50 μ L of internal standard solution is added, and the samples are mixed. Three hundred μ L of acetonitrile is then added, the samples are vortexed for 3 minutes and centrifuged. A 300 μ L aliquot of the supernatant is transferred to a separate plate and evaporated under nitrogen at 40 degrees C. The residue is reconstituted in 100 μ L of 0.5 % heptafluorobutyric acid in water, vortexed, and centrifuged. A 20 μ L aliquot is subsequently analyzed by LC/MS/MS using a Shimadzu autosampler and HPLC system interfaced with an AB Sciex 4000 mass spectrometer under positive ion turbospray mode. MS/MS transitions are 283.2->44.2 amu for prodrug Example 5 and 212.1->103.1 amu for active Example 2. An Atlantis T3, 50 x 2.1 mm, 5 micron HPLC column at a mobile phase flow rate of 1.0 mL/minute and a binary mobile phase of (A) 0.2% formic acid in

-59-

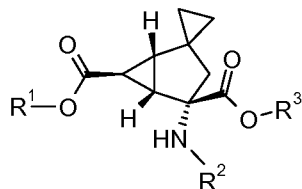
water and (B) acetonitrile-water (1:1,v/v) and a gradient of 2% B to 98%B over 0.8 minutes is utilized. The retention time of Example 2 is approximately 0.53 minutes.

Pharmacokinetic parameters are calculated from the plasma concentration data using Watson for Windows (Thermo Scientific). Relative oral bioavailability is
5 determined by comparing the area under the plasma concentration time curve (AUC) of active Example 2 after intravenous administration with the AUC of active metabolite after oral administration of the prodrug Example 5.

A successful prodrug must be both well absorbed after oral administration and subsequently hydrolyzed to release the active metabolite into the systemic circulation.
10 Relative bioavailability includes both parameters by comparing the AUC of active metabolite after oral administration of prodrug to the AUC of active after intravenous administration of the active compound. In male rats, the relative bioavailability of active metabolite after oral administration of prodrug Example 5 as measured in this assay run substantially as above is $60 \pm 14\%$ (mean $\pm$ standard deviation) demonstrating the
15 prodrug Example 5 is both well absorbed and extensively hydrolyzed to yield the active metabolite in vivo.

WE CLAIM:

1. A compound of Formula I



Formula I

wherein

R¹ is hydrogen, R² is hydrogen, and R³ is hydrogen;

R¹ is hydrogen, R² is (2*S*)-2-aminopropanoyl, and R³ is hydrogen;

R¹ is hydrogen, R² is (2*S*)-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl, and R³ is hydrogen;

- 10 R¹ is hydrogen, R² is 2-aminoacetyl, and R³ is hydrogen;

R¹ is benzyl, R² is hydrogen, and R³ is benzyl; or

R¹ is (2-fluorophenyl)methyl, R² is hydrogen, and R³ is (2-fluorophenyl)methyl;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. The compound according to Claim 1 which is (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

3. The compound according to Claim 1 which is (1S,2S,5R,6S)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride.

4. The compound according to Claim 1 which is (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[*(*2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0] hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5. The compound according to Claim 1 which is (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0] hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride.

- 25 6. The compound according to Claim 1 which is (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0] hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid dihydrate.

-61-

7. The compound according to Claim 1 which is (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[*(2S)*-2-aminopropanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid; 1,4-dioxane (1: 0.5); hydrochloride.

8. The compound according to Claim 1 which is (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[*(2S)*-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

9. The compound according to Claim 1 which is (*1S,2S,5R,6S*)-2-[[*(2S)*-2-amino-4-methylsulfanyl-butanoyl]amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride.

10. The compound according to Claim 1 which is (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2-aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

11. The compound according to Claim 1 which is (*1S,2S,5R,6S*)-2-[(2-aminoacetyl)amino]spiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylic acid hydrochloride.

12. The compound according to Claim 1 which is dibenzyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

13. The compound according to Claim 1 which is dibenzyl (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate; 1,4-dioxane; hydrochloride.

14. The compound according to Claim 1 which is bis[(2-fluorophenyl)methyl] (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

15. The compound according to Claim 1 which is bis[(2-fluorophenyl)methyl] (*1S,2S,5R,6S*)-2-aminospiro[bicyclo[3.1.0]hexane-4,1'-cyclopropane]-2,6-dicarboxylate hydrochloride.

16. A pharmaceutical composition comprising the compound or salt of any one of Claims 1-15 and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient.

17. The compound or salt of any one of Claims 1-15 for use in therapy.

-62-

18. The compound or salt of any one of Claims 1-15 for use in the treatment of a neurological disorder selected from the group consisting of persistent pain, neuropathic pain, chronic inflammatory pain, and visceral pain.

5 19. The compound or salt for use of Claim 18, wherein the neurological disorder is persistent pain.

20. The compound or salt for use of Claim 18, wherein the neurological disorder is neuropathic pain.

21. The compound or salt for use of Claim 18, wherein the neurological disorder is chronic inflammatory pain.

10 22. The compound or salt for use of Claim 18, wherein the neurological disorder is visceral pain.

23. The compound or salt of any one of Claims 1-15 for use in the treatment of a psychiatric disorder selected from the group consisting of schizophrenia, bipolar disorder, generalized anxiety disorder, and post traumatic stress disorder.

15 24. The compound or salt for use of Claim 23, wherein the psychiatric disorder is schizophrenia.

25. The compound or salt for use of Claim 23, wherein the psychiatric disorder is bipolar disorder.

20 26. The compound or salt for use of Claim 23, wherein the psychiatric disorder is generalized anxiety disorder.

27. The compound or salt for use of Claim 23, wherein the psychiatric disorder is post traumatic stress disorder.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/023529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07C271/18 C07C271/24 C07C229/50 C07C237/04 A61K31/16
 A61K31/325 A61K31/195 A61K31/215 A61P25/18 A61P29/00
 C07C323/25

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M.J. O'NEIL ET AL: "Recent developments in metabotropic glutamate receptors as novel drug targets", DRUGS OF THE FUTURE, vol. 35, no. 4, 1 January 2010 (2010-01-01), page 307, XP055059811, ISSN: 0377-8282, DOI: 10.1358/dof.2010.035.04.1487693 page 314 - page 316 -----	1-27
A	WO 03/104217 A2 (LILLY CO ELI [US]; MOHER ERIC DAVID [US]; MONN JAMES ALLEN [US]; PEDRE) 18 December 2003 (2003-12-18) cited in the application the whole document ----- -/--	1-27



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 April 2013

Date of mailing of the international search report

02/05/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Österle, Carmen

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/023529

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/084437 A1 (LILLY CO ELI [US]; MONN JAMES ALLEN [US]; PRIETO LOURDES [ES]; TABOADA) 14 July 2011 (2011-07-14) the whole document	1-27
A	----- WO 97/17952 A1 (LILLY CO ELI [US]; DOMINGUEZ FERNANDEZ CARMEN [ES]; MONN JAMES A [US];) 22 May 1997 (1997-05-22) cited in the application the whole document -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/023529

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03104217	A2	18-12-2003	AR 040257 A1 23-03-2005
		AT 421526 T 15-02-2009	
		AU 2003232146 A1 22-12-2003	
		BR 0311558 A 27-04-2007	
		CA 2488167 A1 18-12-2003	
		CO 5631438 A2 28-04-2006	
		CR 7616 A 13-01-2005	
		DK 1517915 T3 16-03-2009	
		EA 200801711 A1 30-12-2008	
		EC SP085481 A 30-05-2008	
		EP 1517915 A2 30-03-2005	
		EP 1897550 A2 12-03-2008	
		ES 2319116 T3 04-05-2009	
		HK 1075259 A1 12-02-2010	
		HR P20041179 A2 30-06-2005	
		HR P20090058 A2 30-04-2009	
		JP 4342437 B2 14-10-2009	
		JP 2006503807 A 02-02-2006	
		JP 2008201779 A 04-09-2008	
		KR 20080058509 A 25-06-2008	
		MX PA04012518 A 17-02-2005	
		MY 146238 A 31-07-2012	
		NO 331780 B1 26-03-2012	
		NZ 536459 A 28-03-2008	
		NZ 556437 A 28-11-2008	
		NZ 564692 A 31-05-2009	
		PE 05552004 A1 30-08-2004	
		PT 1517915 E 09-04-2009	
		SI 1517915 T1 30-06-2009	
		US 2005222231 A1 06-10-2005	
		US 2008182889 A1 31-07-2008	
		US 2010113579 A1 06-05-2010	
		US 2011207672 A1 25-08-2011	
		US 2012172422 A1 05-07-2012	
		WO 03104217 A2 18-12-2003	
WO 2011084437	A1	14-07-2011	AR 079343 A1 18-01-2012
		AU 2010340039 A1 09-08-2012	
		CA 2784667 A1 14-07-2011	
		CN 102695701 A 26-09-2012	
		CR 20120322 A 10-07-2012	
		DO P2012000173 A 30-11-2012	
		EA 201290558 A1 28-12-2012	
		EP 2516406 A1 31-10-2012	
		KR 20120094056 A 23-08-2012	
		MA 33824 B1 03-12-2012	
		PE 16882012 A1 05-12-2012	
		SG 181836 A1 30-08-2012	
		TW 201144290 A 16-12-2011	
		US 2011152334 A1 23-06-2011	
		WO 2011084437 A1 14-07-2011	
WO 9717952	A1	22-05-1997	AU 703094 B2 18-03-1999
		BR 9611509 A 02-03-1999	
		CA 2237404 A1 22-05-1997	
		CN 1207678 A 10-02-1999	
		EP 0774454 A1 21-05-1997	
		JP 2000500754 A 25-01-2000	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/023529

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		W0 9717952 A1	22-05-1997

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual

Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional

8 Agosto 2013 (08.08.2013)



(10) Número de Publicación Internacional:

WO 2013/116174 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07C 271/18 (2006.01) A61K31/195 (2006.01)
C07C 271/24 (2006.01) A61K31/215 (2006.01)
C07C 229/50 (2006.01) A61P 25/18 (2006.01)
C07C 237/04 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K31/16 (2006.01) C07C 323/25 (2006.01)
A61K31/325 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional:

PCT/US2013/023529

(22) Fecha de Presentación Internacional:

29 Enero 2013 (29.01.2013)

(25) Lenguaje de presentación:

Inglés

(26) Lenguaje de Publicación:

Inglés

(30) Fecha de Prioridad:

12382038.3 1 Febrero 2012 (01.02.2012) EP
61/619,139 2 Abril 2012 (02.04.2012) US

(71) Solicitante (todos los estados contratantes excepto US): **ELI LILLY AND COMPANY** [US/US]; Lilly Corporate Center Indianapolis, Indiana 46285 (US).

(72) Inventores: **BAKER, Stephen, Richard**; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US). **BEADLE, Christopher David**; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US). **CLARK, Barry Peter**; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US). **MONN, James Allen**; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US). **PRIETO, Lourdes**; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US).

(74) Agentes: **HOSTETTLER, Danica** et al; Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US).

(81) Estados Designados (a menos que se indique de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que se indique de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaración bajo la Regla 4.17:

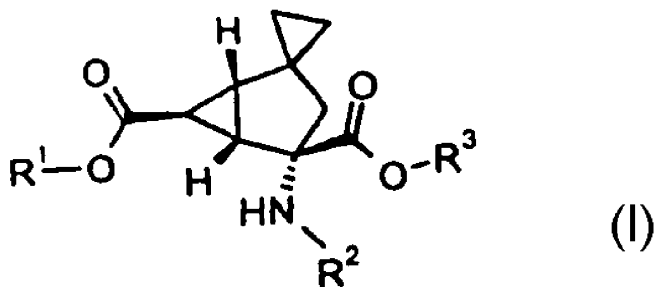
- el derecho del solicitante para solicitar y ser otorgada una patente (Regla 4.17(ii))

- el derecho del solicitante para reivindicar la prioridad de la primera solicitud (Regla 4.17(iii))

Publicada

- con el reporte de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Título: AGONISTAS DE MGLU 2/3



(57) Resumen: La presente invención se refiere a nuevos agonistas de mGlu2/3 útiles en el tratamiento de trastornos neurológicos o psiquiátricos.

AGONISTAS DE MGLU 2/3

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a agonistas de
5 mGlu2/3, más específicamente, a un nuevo biciclo[3.1.0]hexano
4-sustituido y profármacos del mismo, composiciones
farmacéuticas del mismo, y usos terapéuticos del mismo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El L-Glutamato es el principal neurotransmisor
excitatorio en el sistema nervioso central y es referido como
un aminoácido excitatorio. Los receptores de glutamato
metabotrópico (mGlu) son receptores acoplados a la proteína G
que modulan la excitabilidad neuronal. El tratamiento de
15 trastornos neurológicos o psiquiátricos ha sido unido a
activación selectiva de receptores de aminoácido excitatorios
mGlu. Más particularmente, estudios han demostrado que los
agonistas de mGlu2/3 tienen propiedades analgésicas,
antipsicóticas, ansiolíticas, antidepresivas y
20 neuroprotectoras. Por lo tanto, estas propiedades de
agonistas de mGlu2/3 pueden ser útiles en el tratamiento de
trastornos neurológicos, tal como condiciones de dolor
crónico o trastornos psiquiátricos, tales como esquizofrenia,
trastorno bipolar, también conocido como trastorno
25 maniacodepresivo, trastorno de ansiedad generalizada y

trastorno de estrés post-traumático.

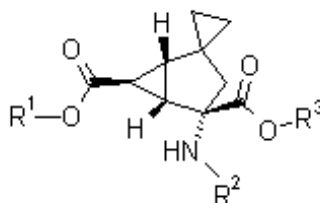
El documento W09717952 describe ciertos compuestos biciclo[3.1.0]hexano 4-sustituido que se afirman que son antagonistas del receptor de aminoácido excitatorio.

5 El tono glutamatérgico excesivo se ha implicado en muchos estados de enfermedad del sistema nervioso central; sin embargo, los agentes efectivos para corregir estos estados están carentes en la práctica clínica. En particular, la aplicación clínica no ha sido realizada debido a una
10 carencia de antagonistas de mGlu2/3 con propiedades similares al fármaco apropiadas. Así, aún existe una necesidad para antagonistas de mGlu2/3 eficaces, potentes. La presente invención proporciona un nuevo biciclo[3.1.0]hexano 4-sustituido, y profármacos del mismo, que son agonistas de
15 mGlu2/3 potentes y efectivos. Profármacos particulares dentro del alcance de la presente invención son bien absorbidos después de la administración oral y subsecuentemente hidrolizados para liberar el metabolito activo en la circulación sistémica y, por lo tanto, son adecuados para
20 desarrollo clínico. Estos nuevos compuestos de la presente invención pueden dirigir la necesidad para tratamientos potentes, efectivos de trastornos neurológicos, tal como condiciones de dolor crónico que incluye dolor persistente, dolor neuropático, dolor inflamatorio crónico o dolor
25 visceral, o trastornos psiquiátricos, tales como

esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno de ansiedad generalizada o trastorno de estrés post-traumático.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona un compuesto de fórmula I



10

Formula I

en donde

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

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

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

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

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

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

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

25 La presente invención proporciona ácido

(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

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

Como una modalidad particular, la presente invención proporciona la sal de ácido clorhídrico de ácido
10 (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

La presente invención proporciona ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
15 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

Como una modalidad particular, la presente invención proporciona clorhidrato del ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-
20 4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

Como una modalidad particular, la presente invención proporciona ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico; 1,4-dioxano (1:0.5);
25 clorhidrato.

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

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

La presente invención proporciona ácido
(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[(2-
aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
15 farmacéuticamente aceptable.

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

20 La presente invención proporciona (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-
aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
dicarboxilato de dibencilo, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable.

Como una modalidad particular, la presente
25 invención proporciona clorhidrato (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-

aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato; 1,4-dioxano de dibencilo.

La presente invención proporciona bis[(2-fluorofenil)metil] (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-

5 aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

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

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-
15 aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[(2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
20 farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[(2*S*)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[(2-
25 aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-

ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-
aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
dicarboxilato de dibencilo, o una sal del mismo
5 farmacéuticamente aceptable, o bis[(2-fluorofenil)metil]
(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxilato, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, junto con un portador
farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros
10 ingredientes terapéuticos.

La presente invención proporciona una composición
farmacéutica que comprende ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-
aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente
15 aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-
aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-
amino-4-metilsulfanil-
20 butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[(2-
aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
25 farmacéuticamente aceptable, (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-

aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
dicarboxilato de dibencilo, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, o bis[(2-fluorofenil)metil]
(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
5 ciclopropano]-2,6-dicarboxilato, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, y un portador, diluyente o
excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona un método para
tratar un trastorno neurológico o psiquiátrico, que comprende
10 administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad
efectiva de ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-
aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente
aceptable, ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[(2*S*)-2-
15 aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[(2*S*)-2-
amino-4-metilsulfanil-
butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
20 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2-
aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-
25 aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-

dicarboxilato de dibencilo, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, o bis[(2-fluorofenil)metil]
(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxilato, o una sal del mismo
5 farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona el uso de ácido
(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-
10 aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-
amino-4-metilsulfanil-
butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
15 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[(2-
aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-
20 aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
dicarboxilato de dibencilo, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, o bis[(2-fluorofenil)metil]
(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxilato, o una sal del mismo
25 farmacéuticamente aceptable, para la elaboración de un

medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico o psiquiátrico.

La presente invención proporciona ácido
(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
5 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-
aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-
10 amino-4-metilsulfanil-
butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[(2-
aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
15 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-
aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
dicarboxilato de dibencilo, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, o bis[(2-fluorofenil)metil]
20 (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxilato, o una sal del mismo
farmacéuticamente aceptable, para uso en terapia.

La presente invención también proporciona ácido
(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
25 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo

farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[(2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[(2*S*)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[(2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, o bis[(2-fluorofenil)metil] (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de un trastorno neurológico o psiquiátrico.

Además, la presente invención proporciona modalidades preferidas de los métodos y usos como se describe en la presente, en la cual el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste de dolor persistente, dolor neuropático, dolor inflamatorio crónico, y dolor visceral, y el trastorno psiquiátrico se selecciona del grupo que consiste de esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno de

ansiedad generalizada, y trastorno de estrés post-traumático.

Como se usa anteriormente, y a través de la descripción de la invención, los términos siguientes, a menos que se indique de otra forma, se debe entender que tiene los
5 siguientes significados:

“Compuesto(s) de la invención” y “compuesto(s) de la presente invención” incluyen profármacos, compuestos activos, y/o metabolitos activos. Un “profármaco” es una clase de fármacos, inicialmente en forma inactiva que es
10 convertido a forma activa en el cuerpo por procesos metabólicos normales, en donde al menos uno de R^1 , R^2 , y R^3 en la Fórmula I es diferente que hidrógeno (por ejemplo, R^1 es hidrógeno, R^2 es (2S)-2-aminopropanoilo, y R^3 es hidrógeno; R^1 es hidrógeno, R^2 es (2S)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoilo, y
15 R^3 es hidrógeno; R^1 es hidrógeno, R^2 es 2-aminoacetilo, y R^3 es hidrógeno; R^1 es bencilo, R^2 es hidrógeno, y R^3 es bencilo; o R^1 es (2-fluorofenil)metilo, R^2 es hidrógeno, y R^3 es (2-fluorofenil)metilo). Un “compuesto activo” o “activo” es otro nombre para una forma activa administrada al cuerpo, por
20 ejemplo, intravenosamente o intraperitonealmente, en donde R^1 , R^2 , y R^3 en la Fórmula I son hidrógeno. Un “metabolito activo” es otro nombre para una forma activa que resulta de esta conversión de un profármaco en el cuerpo por procesos metabólicos normales, en donde R^1 , R^2 , y R^3 en la Fórmula I
25 son hidrógeno.

Un "portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" es un medio generalmente aceptado en la técnica para el suministro de agentes biológicamente activos a mamíferos, por ejemplo, humanos.

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

"Cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto, o sal del mismo farmacéuticamente aceptable, de la presente invención o
10 composición farmacéutica que contiene un compuesto, o sal del mismo farmacéuticamente aceptable, de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de un efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o
15 humano que está siendo buscado por el investigador, veterinario, doctor médico u otro especialista.

Los términos "tratamiento," "trata," "tratar," y similares, están significando incluir reducir o revertir el progreso de un trastorno. Estos términos también incluyen
20 aliviar, aminorar, atenuar, eliminar o reducir uno o más síntomas de un trastorno o condición, aún si el trastorno o condición no es actualmente eliminado y aún si el progreso del trastorno o condición no es el mismo retardado o revertido.

25 Bajo nomenclatura estándar usada a través de esta

descripción, la porción terminal de la cadena lateral designada es descrita primero, seguida por la funcionalidad adyacente hacia el punto de unión. Por ejemplo, un sustituyente metilsulfonilo es equivalente a $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-}$.

5 Los compuestos de la presente invención son capaces de reaccionar, por ejemplo, con un número de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición básica o sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Tales sales farmacéuticamente aceptables y metodología común para
10 prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, et al., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts, " *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 66, No. 1, Enero 1977.

15 Los compuestos de la presente invención son preferiblemente formulados como composiciones farmacéuticas usando un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y administrados por una variedad de rutas. Preferiblemente, tales composiciones son para administración
20 oral o intravenosa. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, et al., eds., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005).

25 El compuesto de la presente invención actualmente

administrado será determinado por un especialista bajo las circunstancias relevantes, incluyendo la condición a ser tratada, la ruta elegida de administración, el compuesto o compuestos actuales de la presente invención administrados, 5 la edad, peso y respuesta del paciente individual, la severidad de los síntomas del paciente. Las dosificaciones por día normalmente caerán dentro del intervalo de aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 300 mg. En algunos casos los niveles de dosificación por debajo del límite superior del intervalo mencionado antes pueden ser más que 10 adecuados, mientras en otros casos dosis todavía más grandes pueden ser empleadas.

Los compuestos de la presente invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden ser 15 preparados por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, así como también aquellos descritos en las Preparaciones y Ejemplos abajo. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las rutas descritas pueden ser combinadas en diferentes formas para preparar los compuestos 20 de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los sustituyentes, a menos que se indique de otra forma, son como se definen previamente. Los reactivos y materiales de partida son en general fácilmente disponibles 25 para uno de habilidad ordinaria en la técnica. Otros pueden

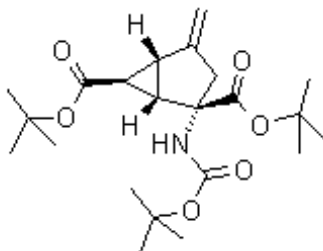
ser elaborados por técnicas estándares de química orgánica y heterocíclica, técnicas las cuales son análogas a las síntesis de compuestos activos conocidos estructuralmente similares y profármacos, y los procedimientos descritos en
5 las Preparaciones y Ejemplos los cuales singuen que incluyen algunos procedimientos novedosos. La denominación de las siguientes Preparaciones y Ejemplos se hace usando Symyx Draw 3.1.

Como se usa en la presente, los términos siguientes
10 tienen los significados indicados: "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alta presión; "LC" se refiere a cromatografía líquida; "MS (ES+)" se refiere a espectroscopia de masas usando ionización por electro-rocío; "MS" se refiere a espectroscopia de masas; "SFC" se refiere a cromatografía
15 de fluido supercrítico; "NMR" se refiere a resonancia magnética nuclear; "TLC" se refiere a cromatografía de capa delgada; "RT" se refiere a tiempo de retención; "UV" se refiere a ultravioleta; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminatetraacético; "PBS" se refiere a salina
20 amortiguada de fosfato; "PCR" se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa; "SCX" se refiere al intercambio catiónico fuerte; y "HLB" se refiere al Balance Hidrofílico-Lipofílico.

Preparación 1

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

5



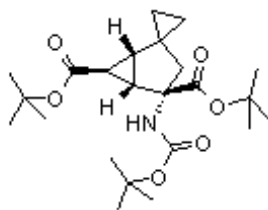
Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 ml
10 secado en horno con bromuro de metiltrifenilfosfonio (5.41 g,
14.9 mmol) y tetrahidrofurano (93 mL). Se enfrió la
suspensión a 0°C y se agregó por goteo solución 1M de
bis(trimetilsilil)amida de sodio en tetrahidrofurano (16.08
mL, 16.08 mmol). Se agitó la mezcla amarillo brillante
15 resultante a 0°C por 20 minutos antes de agregar una solución
de (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*R*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-oxo-
biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo (5.09
g, 12.4 mmol, véase documento W003/104217/A2 para detalles de
síntesis) en tetrahidrofurano (31 mL). La reacción se dejó
20 calentar a temperatura ambiente y se agitó por 16 horas. La
mezcla se dividió entre acetato de etilo (500 mL) y agua (350
mL). Se desechó lo acuoso y la fase orgánica se lavó con
salmuera (200 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de
magnesio, se filtró y concentró bajo presión reducida. Se
25 purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato

de etilo: *iso*-hexano (5:95 a 20:80) para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (4.84 g, 11.2 mmol). ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.45 (m, 27H), 1.87 (t, $J=2.9$ Hz, 1H), 1.98 (m, 1H), 2.43 (m, 2H), 3.07 (br m, 1H), 4.86 (br s, 1H),
5 5.03 (d, $J=2$ Hz, 1H), 5.1-5.3 (br s, 1H).

Preparación 2

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

10



Se preparó una solución libre de etanol de
15 diazometano en éter dietílico cargando el dedo frío de un
aparato mini-Diazald Aldrich con cardice e *iso*-propanol
rellenándolo a una tercera parte. En la porción de reacción
del aparato se colocó una solución de hidróxido de potasio
(740 mg, 13.2 mmol) en agua (1.5 mL). A esta solución se
20 agregó una mezcla de monoetil éter de dietilen glicol (4 mL)
y éter dietílico (2.4 mL). Se disolvió *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-
nitrosoguanidina (1 g, 6.8 mmol) en una mezcla de éter
dietílico (13 mL) y monoetil éter de dietilen glicol (4 mL).
Esta solución se colocó en un embudo de goteo con
25 articulaciones de cristal liso y se ajustó al aparato mini-

Diazald. Se calentó la solución de hidróxido de potasio en un baño de agua mantenido a 70°C, asegurando que el matraz de recolección y un burbujeador relleno con éter dietílico a la salida del aparato ambos sean enfriados en un baño de cardice/*iso*-propanol. Se permitió que la solución de *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina se agregara a una velocidad igual a la de la destilación resultante. Una vez que la destilación se completó, se agregó por goteo éter dietílico adicional a través del embudo de goteo hasta que lo condensado en el dedo

frío se volvió incoloro. Se almacenó la solución resultante en un baño cardice/*iso*-propanol hasta que se necesite. Se suspendió acetato de paladio (17.2 mg; 76.5 µmol) en éter dietílico (10 mL). Se decantó y filtró la solución marrón pálido resultante y se agregó cuidadosamente a una mezcla de la solución diazometano de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo (330 mg, 765.5 µmol) y éter dietílico (10 mL) el cual se ha permitido llegar a temperatura ambiente. Una vez que la evolución de gas terminó, se filtró la suspensión resultante y se concentró bajo presión reducida para proporcionar 260 mg de una mezcla sin reaccionar de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo y compuesto del título.

Se preparó una solución libre de etanol de

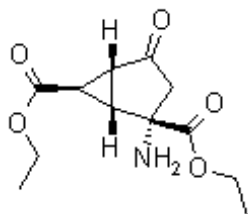
diazometano en éter dietílico a partir de una solución de hidróxido de potasio (2.5 g, 44.6 mmol) en agua (4 mL), monoetil éter de dietilen glicol (14 mL) y éter dietílico (8 mL) y *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (4 g, 27.2 mmol) en
5 una mezcla de éter dietílico (30 mL) y monoetil éter de dietilen glicol (15 mL). Se recuperó la solución resultante de diazometano y se agregó en porciones durante 30 minutos a una suspensión de acetato de paladio (20 mg, 89.1 μ mol) en una solución de la mezcla sin reaccionar previamente
10 preparada de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo y compuesto del título (260 mg) en éter dietílico (3 mL). Una vez que la evolución de gas ha terminado, se dejó reposar durante la noche, entonces se filtró a través de una
15 frita separadora de fase y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un aceite oscuro. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo:*iso*-hexano (0:100 a 75:25) para proporcionar 185 mg de una mezcla sin reaccionar de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-
20 4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo y compuesto del título.

Se preparó una solución libre de etanol de diazometano en éter dietílico a partir de una solución de hidróxido de potasio (3.2 g, 57 mmol) en agua (5 mL),
25 monoetil éter de dietilen glicol (4 mL) y éter dietílico (10

mL) y *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (5 g, 34 mmoles) en una mezcla de éter dietílico (35 mL) y monoetil éter de dietilen glicol (15 mL). Se recuperó la solución resultante de diazometano y se agregó en porciones durante 60 minutos a una suspensión de acetato de paladio (20 mg, 89.1 µmol) en una solución de la mezcla previamente preparada sin reaccionar de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo y compuesto del título (185 mg) en éter dietílico (2 mL). Una vez que la evolución de gas ha terminado, se dejó reposar por 30 minutos, se filtró y concentró bajo presión reducida para proporcionar un aceite amarillo. Se purificó por HPLC de masa guiada (RT = 6.4 minutos (UV), 6.37 minutos (MS); Columna LC: Waters XBridge™ 30mm x 100mm 5µm; agua p/0.1% ácido fórmico; gradiente: 28-62% acetonitrilo p/0.1% ácido fórmico en 1.35 minutos después 62-95% en 6.65 minutos, después mantenido a 95% por 3.55 minutos. Temperatura de columna: ambiente; velocidad de flujo: 45 mL/minuto) para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (55.3 mg, 130.6 µmol). MS (m/z): 446 (M+23).

Preparación 3

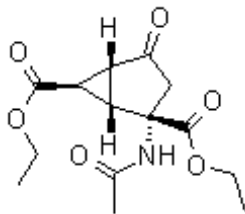
(1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo



5 Se cargó un matraz de tres cuellos de 500 ml
 equipado con un condensador, entrada de nitrógeno y un
 termómetro con (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-
 oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo
 (15 g, 36.4 mmol) en etanol (365 mL). Se agregó cloruro de
 10 tionilo (13.3 mL, 182.3 mmol) a una solución agitada a
 temperatura ambiente por medio de jeringa (exoterma pequeña)
 después se calentó a reflujo. Después de 24 horas, se enfrió
 la reacción a temperatura ambiente y se concentró *in vacuo*.
 Se disolvió el residuo en diclorometano (50 mL) entonces se
 15 concentró en un evaporador rotatorio (repetición 3 veces). Se
 dividió el residuo entre acetato de etilo (200 mL) y
 carbonato hidrogenado de sodio saturado (150 mL). La fase
 orgánica se lavó con salmuera (150 mL), se secó sobre sulfato
 de sodio, se filtró entonces se concentró a sequedad para dar
 20 el compuesto del título como un aceite (8.24 g, 32.3 mmol).
 MS (*m/z*): 256 (*M*+1).

Preparación 4

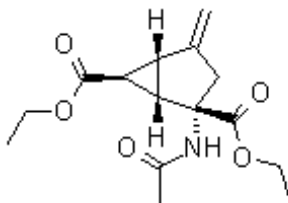
(1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-acetamido-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-
 dicarboxilato de dietilo



5 Se agregó anhídrido de ácido acético (5 mL, 50.8 mmol) a una solución agitada de (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (7.2 g, 28.2 mmol) y trietilamina (7.9 mL, 56.4 mmol) en diclorometano seco (72 mL) a temperatura ambiente. Después de
10 2 horas, se apagó con agua (100 mL) y se agitó vigorosamente por 20 minutos. Se separó la capa de diclorometano por medio de una frita hidrofóbica y se evaporó a un aceite marrón ligero (9.6 g). Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo:*iso*-hexano (70:30 a 90:10) para
15 dar el compuesto del título como una espuma cristalina amarillo pálido en secado (6.53 g, 22 mmol). MS (m/z): 298 (M+1), 320 (M+23), 617 (2M+23).

Preparación 5

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-acetamido-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-
20 dicarboxilato de dietilo



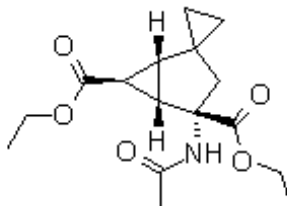
25 Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 mL

secado en horno con bromuro de (metil)trifenilfosfonio (9.72 g, 26.7 mmol) y tetrahidrofurano seco (122 mL). Se enfrió la suspensión a 0 hasta -5°C y se trató con bis(trimetilsilil)amida de sodio 2M en tetrahidrofurano (13.3 mL, 26.7 mmol) en una manera por goteo. Se agitó la mezcla amarillo brillante resultante a 0°C por 20 minutos después se trató con una solución de (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*R*)-2-acetamido-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (6.1g, 20.5 mmol) en tetrahidrofurano (30 mL). La reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de la agitación por 20 horas a temperatura ambiente se apagó con agua helada (200 mL) y se extrajo con acetato de etilo (200 mL). Se lavaron los extractos con agua (100 mL), salmuera (100 mL), se secaron, se filtraron y se evaporaron a aceite marrón oscuro. Se agregó éter dietílico (70 mL) e iso-hexano (20 mL) y se sembró la solución con óxido de trifenilfosfina. Se permitió reposar por 2 horas, se decantó la solución, se agregó sílice y se concentró bajo vacío. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: iso-hexano (60:40 a 80:20) para dar un aceite rosado (6.81 g) contaminado con óxido de trifenilfosfina. Se purificó nuevamente por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: iso-hexano (60:40) para dar el compuesto del título como un aceite amarillo viscoso (3.98 g, 13.5 mmol). MS (m/z): 296 (M+1), 318 (M+23), 613 (2M+23).

Preparación 6

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

5

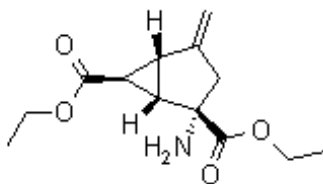


Bajo nitrógeno, se agregó una solución de ácido trifluoroacético (1.9 mL, 25 mmol) en diclorometano (12.5 mL) por goteo muy lentamente a una solución de dietilzinc enfriada (baño de hielo) agitada (1M en heptanos) (25 mL, 25 mmol) en diclorometano (12.5 mL). Después de 10 minutos, se agregó una solución de diyodometano (2.01 mL, 25 mmol) en diclorometano (12.5 mL). Después de 10 minutos, se agregó una solución de (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-acetamido-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (2.46 g, 8.3 mmol) en diclorometano (12.5 mL). Después de 60 minutos se removi6 el ba6o de hielo y se dej6 que la mezcla de reacci6n se agitara durante la noche a temperatura ambiente. Se apag6 la soluci6n de reacci6n clara por adici6n por goteo de la mezcla de reacci6n a 6cido clorh6drico acuoso 0.2M (200 mL) bajo agitaci6n vigorosa. Despu6s de 1 hora se separ6 la capa de diclorometano, se lav6 con salmuera, se sec6 sobre sulfato de magnesio, se filtr6 y concentr6 a vaci6 para proporcionar el producto requerido contaminado con material

de partida sin reaccionar (4.4 g). Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: ciclohexano (50:50 a 100:0) para dar un aceite incoloro (3.1 g). Se purificó por SFC (RT = 2.48 minutos (UV, 200 nm); HP
5 Columna LC: AD-H 30 mm x 250 mm 5 µm; gradiente CO₂: 5% *alcohol iso*-propílico p/0.2% dimetiletilamina por 0.5 minutos, después 5%-27% en 2.2 minutos. Temperatura de columna: 35°C; presión: 100000 kPa; velocidad de flujo: 210 mL/minuto) para proporcionar (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-acetamido-4-
10 metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo sin reaccionar.(580 mg, 2.0 mmol) y compuesto del título (1.82 g, 5.9 mmol). MS (m/z): 310 (M+1), 332 (M+23).

Preparación 7

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-amino-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-
15 dicarboxilato de dietilo



20 Método 1:

Se preparó una solución de aproximadamente 1M de cloruro de hidrógeno en etanol por adición por goteo de cloruro de trimetilsililo (13.8 mL, 108 mmol) a etanol (110 mL). Se disolvió (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-
25 4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-

butilo (7.4 g, 18.1 mmol) en esta solución ácida y se calentó a 60°C por 16 horas. Se evaporó a un aceite amarillo viscoso, se disolvió nuevamente en agua (50 mL) y se filtró la solución turbia para remover restos insolubles. Se
5 neutralizó la solución ácida acuosa con bicarbonato de sodio (8.4 g, 0.1 mol) y se extrajo con diclorometano (2 x 100 mL). Se secaron las soluciones de diclorometano combinadas por medio de una frita hidrofóbica y se evaporó a un líquido amarillo pálido (4.14 g). Se purificó por
10 cromatografía en sílice unido a amino eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80 a 80:20) para dar un líquido incoloro (3.6 g). Se purificó nuevamente por cromatografía en sílice unido a amino eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80) para dar un líquido incoloro del producto del
15 título (2.81 g, 61%). MS (m/z): 254 (M+1).

Método 2:

Se secó monohidrato ácido de *p*-toluensulfónico (6.97 g, 36.6 mmol) *in vacuo* a 50°C por 3 días. Se agregó a una solución agitada de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(*terc*-
20 butoxicarbonilamino)-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo (5.0 g, 12.2 mmol) en etanol (35.5 mL) y se calentó a 60°C por 3 días. Se removió el solvente bajo presión reducida para dar un residuo. Se recuperó el residuo en agua (100 mL), se volvió básico usando
25 bicarbonato de sodio y se extrajo con diclorometano (3 x 100

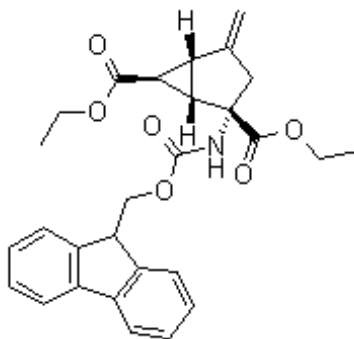
mL). Se secaron los extractos sobre sulfato de sodio, se filtraron y entonces se concentraron bajo presión reducida para dar un residuo anaranjado del compuesto del título (1.52 g, 51%). MS (m/z): 254 (M+1).

5

Preparación 8

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

10



Se agregó cloroformiato de 9-fluorenilmétilo sólido
15 (3.15 g, 12.2 mmol) en porciones durante 5 minutos a una
solución agitada de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-amino-4-metilen-
biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (2.8 g,
11.1 mmol) y bicarbonato de sodio (2.04 g, 24.3 mmol) en
tetrahidrofurano (28 mL) y agua (8.4 mL) enfriada a 0-5°C.
20 Después de 1 hora, se agregó agua (10 mL) y se extrajo con
acetato de etilo (50 mL). Se lavó lo extraído con solución de
salmuera (20 mL), se secó, se filtró y se evaporó a un aceite
amarillo pálido (6.5 g). Se purificó por cromatografía
instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (10:90
25 a 20:80) para dar un aceite incoloro viscoso (4.58 g). Se

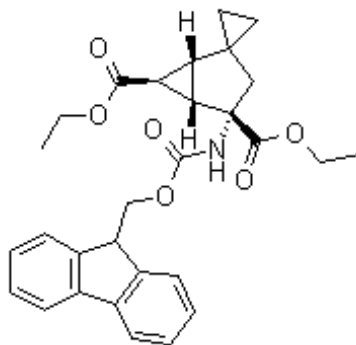
purificó nuevamente por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80) para dar una espuma semi-sólida blanca del compuesto del título (4.22 g, 80%). MS (m/z): 476 (M+1).

5

Preparación 9

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

10



15

Se agregó una solución de ácido trifluoroacético (2.66 g, 23.3 mmol) en diclorometano (11.7 mL) por goteo durante 5 minutos a una solución agitada de dietil zinc 1M en heptanos (23.3 mL, 23.3 mmol) en diclorometano (11.7 mL) enfriada a 0-5°C bajo nitrógeno (reacción exotérmica).

20

Después de 10 minutos, se agregó una solución de diyodometano (6.25 g, 23.3 mmol) en diclorometano (11.7 mL). Después de 10 minutos, se agregó una solución de (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-4-metilen-

25

biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (3.70 g, 7.8 mmol) en diclorometano (11.7 mL). Después de 2 horas a

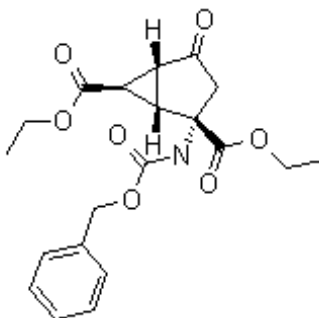
0°C, se permitió que se calentara a temperatura ambiente y se agitó por 16 horas. Se apagó la mezcla de reacción con ácido clorhídrico 0.5M frío (50 mL) y diclorometano (20 mL) y se agitó vigorosamente. Se separó la capa de diclorometano por medio de una frita hidrofóbica y después se evaporó a un aceite amarillo pálido. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (10:90 a 20:80) para dar un aceite incoloro (3.49 g). Se purificó nuevamente por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80) tomando las fracciones de corte central para dar una espuma incolora de compuesto del título (2.12 g, 56%). MS (m/z): 490 (M+1). Un segundo lote del producto de las fracciones menos puras se obtiene por cromatografía repetida (363 mg, 9% adicional).

15

Preparación 10

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

20



Método 1:

25

Se agregó dicarbonato de dibencilo (18.6 mL, 76.1

mmol) a una solución de (1S,2S,5R,6R)-2-amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (16.2 g, 63.5 mmol) en diclorometano (500 mL) entonces se agregó por goteo trietilamina (10.6 mL, 76.1 mmol). Se agitó la mezcla
5 de reacción por 30 minutos antes del lavado con ácido clorhídrico 1N (200 mL). Se lavó la fase de diclorometano con salmuera, se separó y se concentró *in vacuo*. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (0:100 a 75:25) para proporcionar el compuesto del
10 título (11.6 g, 47%). MS (m/z): 388 (M+1), 410 (M+23).

Método 2:

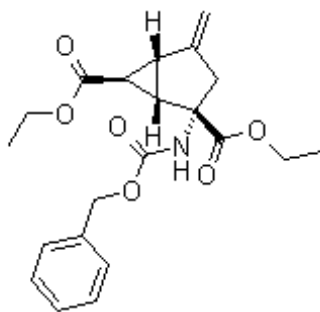
Se agregó a un matraz de fondo redondo clorhidrato (1S,2S,5R,6R)-2-amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (226.86 g, 777.65 mmol), agua (1.13
15 L) y tetrahidrofurano (1.13 L). Se agregó lentamente bicarbonato de sodio (143.72 g, 1.71 mol) en 5 porciones (observando evolución de CO₂ y temperatura interna de 31°C a 25°C). Se agregó después una solución de cloroformiato de bencilo (120.6 mL, 855.42 mmol) en tetrahidrofurano (226.9
20 mL) y manteniendo la temperatura interna por debajo de 28°C (10 minutos) con agitación de la reacción a 25°C por 1 hora. Se vertió la mezcla en éter metil-t-butílico (1.25 L). Se separaron las capas, se extrajo lo acuoso con acetato de etilo (750 ml) y se desechó la fase acuosa. Se lavó la mezcla
25 con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y

concentró a sequedad para dar el compuesto del título como un aceite incoloro (302.82 g, 777.65 mmol). MS (m/z): 388 (M+1).

Preparación 11

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

10



Método 1:

Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 ml
secado en horno con bromuro de (metil)trifenilfosfonio (15.4
15 g, 43.1 mmol) y tetrahidrofurano seco (112 mL). Se enfrió la
suspensión a 0 hasta -5°C y se trató con
bis(trimetilsilil)amida de sodio 2M en tetrahidrofurano (23
mL, 46 mmol) en una manera por goteo. Se agitó la suspensión
amarillo brillante resultante a 0°C por 30 minutos después se
20 trató con una solución de (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-
benciloxycarbonilamino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-
dicarboxilato de dietilo (11.2 g, 28.8 mmol) en
tetrahidrofurano (22.4 mL). Se permitió que la reacción
lentamente se calentara a temperatura ambiente. Después de 4
25 horas, se apagó con hielo (120 g), salmuera (120 mL) y se

extrajo con acetato de etilo (250 mL). Se lavaron los extractos con salmuera (2 x 100 mL), se secaron, se filtraron y se evaporaron a un aceite rojo. Se disolvió nuevamente en éter dietílico (100 mL) y se agregó *iso*-hexano (80 mL)
5 lentamente en porciones a óxido de trifenilfosfina precipitado como un semi-sólido rojo (5.2 g). Se trató la solución con sílice seco (~50 g) y se concentró a sequedad. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (20:80) para dar el compuesto
10 del título como un aceite viscoso incoloro (7.37 g, 66%). MS (m/z): 388 (M+1), 410 (M+23).

Método 2:

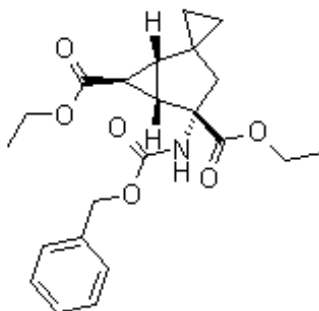
Se agregó *terc*-butóxido de potasio (104.72 g, 933.18 mmol) a una suspensión de bromuro de
15 (metil)trifenilfosfonio (340.16 g, 933.18 mmol) en tetrahidrofurano (1.82 L) a temperatura ambiente (sin cambio en temperatura interna). Entonces se agregó una solución de (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-benciloxicarbonilamino-4-oxo-
biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (302.82 g,
20 777.65 mmol) en tetrahidrofurano (1.82 L) manteniendo la temperatura a 24°C. Se agitó la mezcla a 50°C por 3 horas. Se diluyó la reacción con acetato de etilo (1.5 L), se lavó con agua (2 x 3 L) y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y concentró para proporcionar
25 un aceite marrón oscuro. Se purificó por cromatografía

instantánea eluyendo con acetato de etilo: hexanos (9:1) para dar el compuesto del título como un aceite incoloro (183.35 g, 473.25 mmol). MS (m/z). 388 (M+1), 410 (M+23).

Preparación 12

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

10



Método 1:

Se agregó una solución de dietilzinc 1M en heptanos
15 (64.1 mL, 64.1 mmol) en diclorometano (14.6 mL) por goteo lentamente durante 10 minutos a una solución agitada de ácido trifluoroacético (4.27 mL, 56.5 mmol) en diclorometano (73 mL) enfriada a 0-5°C bajo nitrógeno. Después de 10 minutos, se agregó una solución de diiodometano (4.6 mL, 56.5 mmol) en
20 diclorometano (14.6 mL). Después de 10 minutos, se agregó una solución de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-benciloxycarbonilamino-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (7.3 g, 18.8 mmol) en diclorometano (14.6 mL). Después de 1 hora, se removi6 el ba6o de hielo y la soluci6n turbia se dej6 agitar
25 por 20 horas a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se

apagó la mezcla de reacción con ácido clorhídrico acuoso 0.5M congelado (160 mL, 80 mmol) y diclorometano (200 mL) y se agitó la mezcla vigorosamente. Se separó la capa de diclorometano y después se secó la fase de diclorometano por
5 filtración a través de 2 fritas hidrofóbicas. Se evaporó a un aceite amarillo pálido volviéndose marrón durante la noche. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: iso-hexano (20:80) para dar el compuesto del título como una mezcla con (1S,2S,5R,6S)-2-
10 benciloxicarbonilamino-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo sin reaccionar como un aceite incoloro (5.1 g).

Se agregó una solución de ácido trifluoroacético (2.93 mL, 38.7 mmol) en diclorometano (10 mL) por goteo
15 lentamente durante 10 minutos a una solución agitada de dietilzinc 1M en heptanos (38.7 mL, 38.7 mmol), en diclorometano (50 mL) enfriada a 0-5°C bajo nitrógeno. Después de 10 minutos, se agregó una solución de diyodometano (3.12 mL, 38.7 mmol) en diclorometano (10 mL) a la mezcla de
20 reacción. Después de 10 minutos, se agregó una solución de la mezcla de (1S,2S,5R,6S)-2-benciloxicarbonilaminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de olefina y dietilo (5 g, 12.9 mmol) en diclorometano (10 mL). Después de 1 hora se
25 removió el baño de hielo y la solución turbia se dejó agitar

por 16 horas a temperatura ambiente. Después de 20 horas, se apagó la mezcla de reacción con cloruro de hidrógeno 0.5M congelado (140 mL, 70 mmol) y diclorometano (160 mL) y se agitó la mezcla vigorosamente. Se lavó la capa de
5 diclorometano con ácido clorhídrico acuoso 0.5M (100 mL), se secó sobre sulfato de sodio y entonces se filtró a través de 2 fritas hidrofóbicas. Se evaporó a un aceite amarillo pálido (5.89 g). Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (15:85 a 25:75) para dar el
10 compuesto del título como un aceite incoloro (4.28 g) contaminado con una cantidad pequeña del reactivo.

Se disolvió nuevamente en acetona (40 mL), agua (20 mL), bicarbonato de sodio (0.54 g, 6.45 mmol) y sulfato de magnesio (0.78 g, 6.45 mmol). Se enfrió a 0°C y se agregó
15 permanganato de potasio (0.2 g, 1.29 mmol) para dar una mezcla púrpura brillante. Después de 3 horas a temperatura ambiente, se apagó con tiosulfato de sodio pentahidratado sólido (0.32 g, 1.29 mmol) y se filtró la suspensión a través de una almohadilla de tierra diatomácea, con lavado a través
20 de acetona. Se evaporó a un volumen pequeño, se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con acetato de etilo (60 mL). Se lavaron los extractos con salmuera, se secaron, se filtraron y se evaporaron a un aceite. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (15:85
25 a 25:75) para dar el compuesto del título como un aceite

incoloro (3.62 g, 70%). MS (m/z): 402 (M+1).

Método 2:

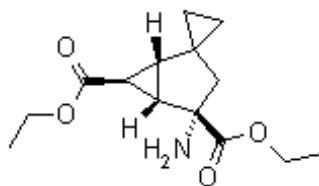
Se agregó una solución de dietilzinc 1M en heptanos (1.6 L, 1.6 mol) por medio de cánula a diclorometano (870.9 mL) a 0°C (temperatura del baño -5°C), entonces se agregó lentamente una solución de ácido trifluoroacético (121.02 mL, 1.6 mol) en diclorometano (870.9 mL) manteniendo la temperatura por debajo de 3°C. Después de 1 hora de adición se agitó la mezcla por 5 minutos, entonces se agregó diyodometano (130.3 mL, 1.6 mol) en una porción y se agitó por 15 minutos. Se agregó una solución de (1S,2S,5R,6S)-2-benciloxicarbonilamino-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (183.35 g, 449.58 mmol) en diclorometano (348.4 mL) durante 10 minutos y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se enfrió a 0°C, se apagó con ácido clorhídrico 0.5M (1.5 L) y se agitó la mezcla vigorosamente. Se separó la capa orgánica, se lavó con salmuera y se concentró a sequedad. Se disolvió en agua (733.4 mL) y acetona (733.4 mL), se enfrió a 0°C entonces se agregó sulfato de magnesio (81.17 g, 674.37 mmol), bicarbonato de sodio (56.65 g, 674.37 mmol) seguido por permanganato de potasio (28.42 g, 179.83 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente. Después de 30 minutos se agregó tiosulfato de sodio pentahidratado (197.10 g, 311.03 mmol) seguido por tierra diatomácea (100 g). Se agitó por 30

minutos y se filtró a través de una almohadilla de tierra diatomácea. Se lavó la almohadilla con éter metil-t-butílico y se extrajo la capa acuosa con éter metil-t-butílico. Se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtró y
5 concentró *in vacuo*. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con hexanos: éter metil-t-butílico (10:90 a 50:50) para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (92.67 g, 51%). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.39-0.52 (m, 1H), 0.55-0.78 (m, 3H), 1.25 (amplio t, J= 7.1 Hz, 6H), 1.58
10 (amplio dd, J=2.9 y 6.3 Hz, 1H), 1.64-1.73 (m, 1H), 1.95 (amplio t, J=2.9 Hz, 1H), 2.03-2.17 (m, 1H), 2.52 (dd, J= 2.7 y 6.3 Hz, 1H), 4.09 (q, J= 7.1 Hz, 2H), 4.16-4.32 (m, 2H), 5.08 (amplio s, 2H), 5.44 (amplio s, 1H), 7.28-7.41 (m, 5H).

También se obtuvo (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(benciloxicarbonil(metil)amino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-
15 4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo como un derivado (22.67 g, 5.46 mmol). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.37-0.52 (m, 1H), 0.54-0.80 (m, 3H), 1.26 (amplio t, J= 7.1 Hz, 6H), 1.55-1.68 (m, 1H), 1.64-1.73 (m, 1H), 1.70-1.80 (m, 1H), 1.97
20 (amplio t, J=3.1 Hz, 1H), 2.30 (dd, J= 3.1 y 6.3 Hz, 1H), 3.16 (s, 3H), 3.99-4.29 (m, 4H), 5.09 (amplio s, 2H), 7.38-7.62 (m, 5H).

Preparación 13

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



5 **Método 1:**

Se agregó piridina (3.16 g, 37.2 mmol) a una solución agitada de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ilmetoxycarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]2,6-dicarboxilato de dietilo (2.10 g, 4.29 mmol) en diclorometano (10.5 mL) a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se evaporó a un sólido amarillo. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: iso-hexano (30:70 a 80:20) para primero eluir 1-(9*H*-fluoren-9-ilmetil)-piridina y después para eluir un líquido amarillo pálido del compuesto del título (1.07 g, 93%). MS (*m/z*): 268 (M+1).

10

15

Método 2:

Se disolvió (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-benciloxycarbonilaminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (3.62 g, 9 mmol) en etanol (54 mL) y se agregó solución a paladio en carbono 10% (Degussa tipo E101 NE/W, 0.18 g, 0.17 mmol). Se hidrogenó en equipamiento Parr por 4 horas a 345 kPa. Se filtró la reacción a través de una almohadilla de tierra diatomácea para remover el catalizador, se lavó con etanol y se evaporó

20

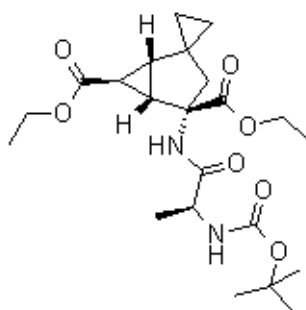
25

a un aceite incoloro como el compuesto del título (2.23 g, 93%). MS (m/z): 268 (M+1).

Preparación 14

(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-(*terc*-
5 butoxycarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexa
no-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo

10



Se combinó (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
15 dicarboxilato de dietilo (1.92 g, 7.17 mmol), ácido (2*S*)-2-(*terc*-butoxycarbonilamino)propanoico (1.92 g, 10 mmol), 4-dimetilaminopiridina (9 mg, 717 μ mol) y 1-hidroxibenzotriazol (1.36 g, 10 mmol) en diclorometano (48 mL). Se agregó trietilamina (1.5 mL, 10.8 mmol) y clorhidrato de 1-(3-
20 dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1.92 g, 10 mmol) y se agitó por 2 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Se diluyó la reacción con acetato de etilo (200 mL), agua (50 mL) y salmuera (50 mL). Se agitó vigorosamente entonces se separó la capa de acetato de etilo, se lavó con
25 ácido clorhídrico 0.2M (50 mL), agua (50 mL), carbonato

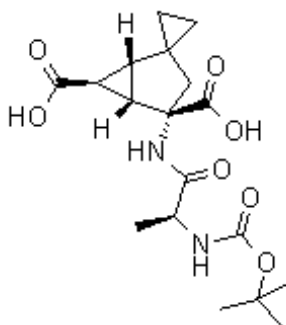
hidrógeno de sodio saturado (50 mL) y salmuera (50 mL). Se
 secó, se filtró y concentró la solución para dar un aceite
 amarillo (3.48 g). Se purificó por cromatografía instantánea
 eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (15:85 a 25:75)
 5 después (25:75 a 40:60) para dar el material como un aceite.
 Se disolvió nuevamente en diclorometano, se concentró y se
 secó bajo vacío para dar el compuesto del título como un
 material espumoso blanco (3.05 g, 6.95 mmol). MS (m/z): 461
 (M+23).

10 Los siguientes compuestos se prepararon
 esencialmente por el método de la preparación 14.

Prep. No.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
15	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[<i>(2S)</i> -2-(<i>terc</i> - butoxycarbonilamino)-4- metilsulfanil-butanoil] amino]espiro[biciclo[3.1. 0]hexano-4,1'- ciclopropano]-2,6- dicarboxilato de dietilo		MS (m/z): 499 (M+1), 521 (M+23)
20	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[2-(<i>terc</i> - butoxycarbonilamino) acetil]amino]espiro [biciclo[3.1.0]hexano- 4,1'-ciclopropano]-2,6- dicarboxilato de dietilo		MS (m/z): 447 (M+23).
25			

Preparación 17

ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[(2*S*)-2-(*terc*-
Butoxicarbonilamino)propanoil]amino]
espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
5 dicarboxílico



Método 1:

Se agregó una solución de hidróxido de litio 2M en
agua (27.8 mL, 55.6 mmol) a una solución agitada fría de
15 (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[(2*S*)-2-(*terc*-
butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexa
no-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (3.05 g,
6.9 mmol) en tetrahidrofurano (36 mL) bajo nitrógeno. Se
agitó la solución bicapa a temperatura ambiente por 20 horas.
20 Se acidificó con ácido clorhídrico 2M (29 mL), hielo (~20 g)
y se extrajo con acetato de etilo (100 mL). Se lavaron los
extractos con salmuera (50 mL), se secaron en sulfato de
sodio, se filtraron y se evaporaron a una espuma semi-sólida
blanca. Se disolvió nuevamente el material en acetato de
25 etilo caliente (15 mL). Se filtró y se secó el material bajo

vacío para dar el compuesto del título como un sólido blanco (2.06 g, 5.4 mmol). MS (m/z): 405 (M+23).

Método 2:

Se disolvió (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-benciloxycarbonilaminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (159 g, 396.05 mmol) en etanol (792.1 mL), y se agregó paladio en carbono 10% (15.9 g, 14.94 mmol) seguido por una solución de ácido clorhídrico a 37.5%p/p en agua (6.62 mL, 79.21 mmol). Se hidrogenó en un equipamiento Parr 2 L a 413 kPa a temperatura ambiente. Después de 4 horas se filtró la mezcla a través de tierra diatomácea y un filtro de microfibra de vidrio (Whatman) y se concentró *in vacuo*. Lo crudo disuelto en tetrahidrofurano (396 mL), se agregó clorodimetoxitriazina (74.50 g, 415.86 mmol) y ácido (2*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)propanoico (79.88 g 415.86 mmol). Se enfrió esta mezcla a 0°C y se agregó *N*-metilmorfolina (131.06 mL, 1.19 mol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente. Después de 5 horas se filtró lo crudo a través de tierra diatomácea y se lavó la torta con tetrahidrofurano (200 mL). Se removió el solvente parcialmente bajo vacío y se enfrió la solución anaranjada resultante a 0°C. Se agregó hidróxido de sodio 2M en agua (792.1 mL, 1.58 mol) por goteo. Se agitó la mezcla durante la noche, dejando que la reacción alcance la temperatura ambiente. Se agregó diclorometano (1 L) y se

separaron las fases. Se lavó la capa orgánica con más agua (300 mL). Se acidificaron las capas acuosas combinadas a pH=2-3 con sulfato hidrógeno de potasio 1N y después se extrajo con acetato de etilo. Se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó bajo vacío. Se disolvió lo crudo en tetrahidrofurano (600 mL) y se calentó a reflujo. Se agregó heptano (2.1 L) y se enfrió la solución. Se filtró lo sólido y se secó bajo vacío para dar el compuesto del título como un sólido blanco (149 g, 98%). MS (m/z): 405 (M+23).

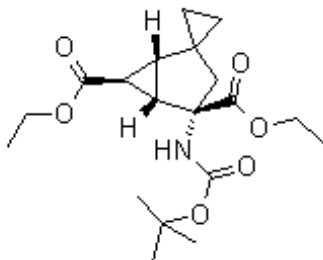
Los siguientes compuestos se prepararon esencialmente por el método 1 de la preparación 17.

Prep No.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
15 18	ácido (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[(2 <i>S</i>)-2-(<i>terc</i> -Butoxicarbonilamino)-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo [3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico		MS (m/z): débil 465 (M+23)
20 19	ácido (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[2-(<i>terc</i> -Butoxicarbonilamino)acetil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico		MS (m/z): 391 (M+23),

Preparación 20

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

5



10

Método 1:

A una solución de (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (0.47 g, 722.38 μ mol) en diclorometano (5 mL) se agregó *di-iso-propil-etilamina* soportada por polímero (1.02 g, 3.61 mmol) seguido por *di-t-butildicarbonato* (0.41 g, 1.88 mmoles) en diclorometano (6.00 mL) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó *di-t-butildicarbonato* adicional (0.32 g, 1.36 mmole) se agitó por 2 horas adicionales. Se diluyó con etanol (20 mL) y se purificó por cartucho de resina de intercambio iónico SCX-2 (10 g) pretratado con 2 volúmenes en columna de etanol. Después de la carga, el cartucho se lavó con 4 volúmenes en columna de etanol antes de concentrar el eluyente *in vacuo* para proporcionar el

15

20

25 producto crudo (808 mg). Se purificó el material crudo por

cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: ciclohexano (0:100 a 40:60) para proporcionar el material deseado (100 mg). Se lavó a chorro el cartucho con 2 volúmenes en columna de amoníaco 3M en metanol para
5 proporcionar un sólido amarillo (430 mg) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo crudo sin reaccionar. Se agregó di-*t*-butildicarbonato (0.32 g, 1.44 mmol) al (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
10 dicarboxilato de dietilo recuperado en tetrahidrofurano (20 mL), se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó después trietilamina (201.37 μ L, 1.44 mmol) y di-*t*-butildicarbonato adicional (0.32 g, 1.44 mmol) y manteniendo la agitación por 72 horas. Se agregó trietilamina en exceso
15 (201.37 μ L, 1.44 mmol), di-*t*-butildicarbonato (0.32 g, 1.44 mmol) y *N,N*-dimetil 4-aminopiridina catalítica (40.93 μ mol) y se agitó durante la noche. Se diluyó con etanol (30 mL) y se purificó la solución por cartucho de resina de intercambio iónico SCX-2 (10 g) pretratado con 2 volúmenes en columna de
20 etanol. Se lavó con 4 volúmenes en columna de etanol y se concentró la solución *in vacuo* para proporcionar 757 mg del producto deseado crudo. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: ciclohexano (0:100 a 40:60) para proporcionar una segunda fracción del producto
25 del título deseado (24 mg). Se combinaron ambas fracciones

para proporcionar el compuesto del título (337.47 μmol , 47%).

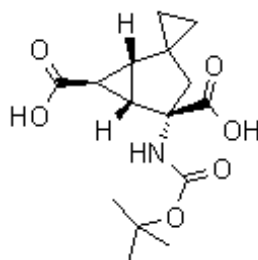
MS (m/z): 390 (M+23), 757 (2M+23).

Método 2:

Se agregó di-*t*-butildicarbonato (0.88 g, 4.01 mmol)
5 a una solución de (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (1.4 g, 5.24 mmol) en tetrahidrofurano (30 mL) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche bajo nitrógeno. Se
10 filtró a través de una frita hidrofóbica, se lavó gel incoloro, con acetato de etilo. Se concentraron las capas orgánicas combinadas *in vacuo* para dar un aceite incoloro. Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (0:100 a 30:70) para proporcionar 1.82 g
15 de aceite. Se secó adicionalmente bajo alto vacío para proporcionar el compuesto del título (1.79 g, 93%). MS (m/z): 390 (M+23), 757 (2M+23).

Preparación 21

ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-(*terc*-
20 Butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico



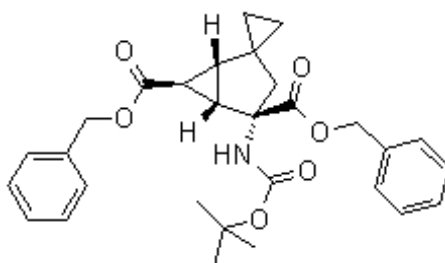
5

Se agregó (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (1.79g, 4.87 mmol) en tetrahidrofurano (29.2 mL) a una solución recientemente preparada de monohidrato hidróxido de litio (1.64 g, 38.97 mmol) en agua (19.5 mL) y se agitó durante la noche a 60°C. Se diluyó con agua (30 mL), se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 mL). Se separaron las capas acuosa y orgánica. Se lavó la capa orgánica con ácido clorhídrico 2M. Se lavó la capa acuosa con ácido clorhídrico 2M (25 mL) después se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 mL). Se combinaron las capas orgánicas y se lavaron con salmuera (15 mL). Se secaron en sulfato de magnesio, se filtraron y concentraron a sequedad. Se disolvió nuevamente en diclorometano y se concentró a sequedad para dar el compuesto del título (1.49 g, 98%). MS (m/z): 334 (M+23).

Preparación 22

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

25

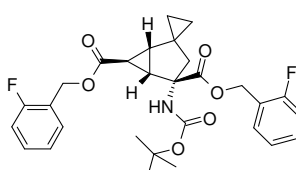


5

Se agregó carbonato de cesio (0.24 g, 730.7 μmol) y bromuro de bencilo (87.16 μL , 730.7 μmol) a una solución de ácido
 (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-

10 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico (0.09 g, 292.29 μmol) en *N,N*-dimetilformamida (2 mL). Se agitó a temperatura ambiente por 1.5 horas bajo nitrógeno. Se apagó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Se separaron las capas y se filtraron los orgánicos a través de una frita hidrofóbica antes de la
 15 concentración a sequedad para proporcionar el producto crudo (134 mg). Se purificó por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (1:99 a 25:75) para dar a aceite claro. Se purificó adicionalmente por cromatografía instantánea eluyendo con acetato de etilo: *iso*-hexano (1:99
 20 10:90) para proporcionar el producto del título (105 mg, 68%) como un aceite claro. MS (*m/z*): 514 (*M*+23).

El siguiente compuesto se preparó esencialmente por el método de la preparación 22.

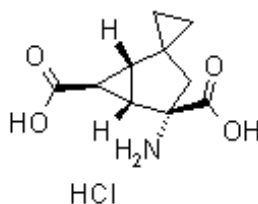
Prep No.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
23	<i>bis</i> [(2-fluorofenil)metil] (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-(<i>terc</i> - butoxicarbonilamino)- espiro[biciclo[3.1.0]hexano- 4,1'-ciclopropano]-2,6- dicarboxilato		MS (<i>m/z</i>): 550 (<i>M</i> +23)

10

Ejemplo 1

clorhidrato del ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-
Aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
dicarboxílico

15



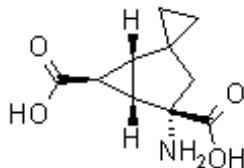
Se cargó un ReactiVial de 5 mL con (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-
(*terc*-butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de *diterc*-butilo (55 mg,
129.8 μ mol). A esto se agregó una solución de ácido
clorhídrico acuoso 5N (3 mL; 20.8 mmol) y 1,4-dioxano (1 mL).
Se agitó la mezcla a 90°C por una hora. Se selló el
ReactiVial y la agitación se continuó a 90°C por 3 horas. Se
enfrió a temperatura ambiente y se dejó reposar por 3 días.

Se concentró bajo presión reducida a un sólido oscuro. Se preparó un cartucho HLB Waters (1 g) Oasis® con lavado de 2 volúmenes en columna de metanol, seguido por 6 volúmenes en columna de agua. Se disolvió lo sólido oscuro en agua y se cargó en el cartucho. Se lavó el cartucho con agua (2 volúmenes en columna) y se recolectó el eluyente. Se liofilizó la solución para proporcionar compuesto del título (16.1 mg, 65 µmol). MS (m/z): 212 (M+1). ¹H NMR (D₂O) δ 0.45 (m, 1H), 0.53 (m, 1H), 0.64 (m, 1H), 0.74 (m, 1H), 1.72-1.78 (m, 2H) 1.86 (d, J=14.2 Hz, 1H), 2.07 (m, 1H), 2.37 (m, 1H).

Ejemplo 2

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

15



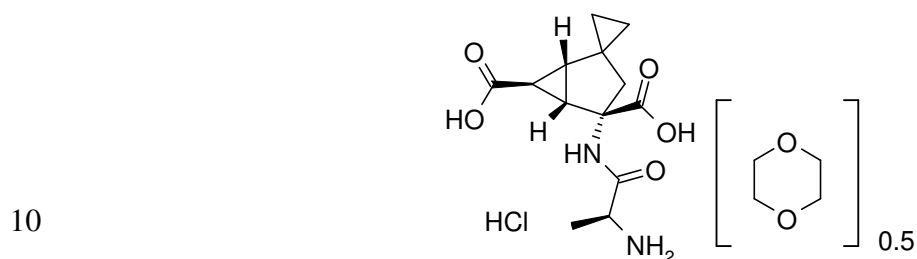
Se agregó hidróxido de sodio 2M (11.5 mL, 23.1 mmol) con (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-acetamidoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (1.19 g, 3.8 mmol). Bajo calentamiento adicional de la mezcla de reacción a reflujo bajo un blanco de nitrógeno. Después de 21 horas se agregó exceso de hidróxido de sodio 2M (5.8 mL, 11.5 mmol) y se reanudo el calentamiento por 120 horas. Se purificó por

cromatografía de intercambio catiónico (Dowex™ 50X8-100) como sigue. Se filtró cualquier partícula insoluble y enjuagó con agua de grado HPLC. Se concentró la solución a la mitad. Se cargó la solución en la resina, dejando que fluya a través de la columna a una velocidad de goteo de aproximadamente 1 gota cada 1-2 segundos. Después que el volumen de carga inicial ha goteado a la superficie de resina, se enjuagó la resina con agua de grado HPLC (~ 1 a 2 volúmenes en columna) y repetición 3 veces. Se monitoreó el pH del eluyente se consiguió enjuagar con Agua de grado HPLC hasta que se completó la aplicación (regreso de pH nuevamente a pH=7.). Una vez que el ciclo de pH completo se ha observado y el efluente ha regresado a pH=7, se lavó la columna con al menos un volumen de columna cada una de Agua de grado HPLC, Agua de grado HPLC: tetrahidrofurano (1:1), después Agua de grado HPLC. Se desplazó el producto de la resina con 10% de piridina: Agua de grado HPLC y se continuó la elución con 10% de piridina: Agua de grado HPLC hasta que no se detectó producto adicional por TLC. Se combinaron las fracciones que contienen el material deseado, se concentraron a sequedad para dar un sólido blanco. Se secó por congelamiento para proporcionar el compuesto del título (795 mg, 3.8 mmol). MS (m/z): 212 (M+1). ¹H NMR (D₂O + 5% d₅-piridina) δ 0.38 (m, 1H), 0.45 (m, 1H), 0.55 (m, 1H), 0.69 (m, 1H), 1.50 (dd, J=2.9 Hz, 1H), 1.62 (d, J=13.7 Hz, 1H), 1.78 (m, 2H), 2.11

(dd, $J=2.9$ Hz, 1H).

Ejemplo 3

ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[(2*S*)-2-
Aminopropanol]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
5 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico; 1,4-dioxano (1: 0.5);
clorhidrato

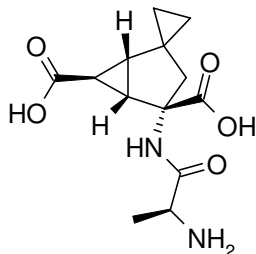


Se agregó una solución de cloruro de hidrógeno 4M en 1,4-dioxano (1.57 mL, 6.3 mmol) a una suspensión agitada de ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[(2*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanol]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
15 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico (0.16 g, 418.4 μ mol) en 1,4-dioxano (1.6 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de 16 horas se filtró un sólido blanco, se lavó con 1,4-dioxano, se secó a vacío a 60°C durante la noche para
20 proporcionar el compuesto del título (0.14 g): MS (m/z): 283 ($M+1$). ^1H NMR (D_2O) δ 0.46 (m, 1H), 0.65 (m, 1H), 1.47 (d, $J=7$ Hz, 3H), 1.70 (dd, $J=2.7$ Hz, 1H), 1.81 (q, $J=15$ Hz, 2H), 1.87 (amplio t, $J=2.7$ y 2.9 Hz, 1H), 2.65 (dd, $J=2.7$ y 2.9 Hz, 1H), 3.68 (s, 4H), 4.00 (q, $J=7$ Hz, 1H), 4.70 (m, 2H).

Ejemplo 4

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

5

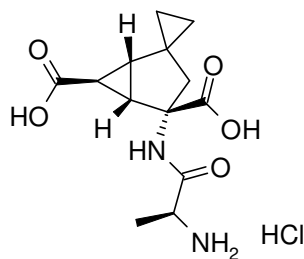


10 Se agregó ácido clorhídrico concentrado (36.94 mL,
430.11 mmol) a una solución de ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-
2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanol]amino]
espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
dicarboxílico (82.24 g, 215.06 mmol) en acetona (822.4 mL), y
15 se agitó la mezcla a 50°C. Después de 1.5 horas se enfrió la
mezcla a 0°C y se agregó 50% de hidróxido de sodio en agua a
pH=3.6-3.8. Se agitó el sólido obtenido por 1 hora, se filtró
y se lavó con agua. Se secó bajo vacío por 48 horas para
proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco
20 (36 g, 127.53 mmol). MS (m/z): 283 (M+1).

Ejemplo 5

clorhidrato del ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-
Aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0] hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxílico

25



5

Se agregó cloruro de hidrógeno 4M en 1,4-dioxano (20 mL, 80 mmol) a una suspensión agitada de ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[[(2*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonilamino)propanoic acid]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-

10 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico (2.06 g, 5.4 mmol) en 1,4-dioxano (21 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se sonicó la mezcla de reacción algunos minutos y después se mantuvo agitando 16 horas. Se filtró el sólido, se lavó con 1,4-dioxano, se secó a vacío a 60°C por 6 horas para dar 2.2
15 g de sólido blanco. Se disolvió nuevamente el material en agua de grado HPLC (20 mL), se filtró para remover algunas partículas insolubles y secó por congelamiento lo filtrado para proporcionar compuesto del título (1.51 g, 4.75 mmol).
MS (*m/z*): 283 (*M*+1). ¹H NMR (D₂O) δ 0.46 (m, 1H), 0.65 (m, 1H), 1.46 (d, *J*=7.1 Hz, 3H), 1.69 (dd, *J*=2.9 Hz, 1H), 1.81 (q, *J*=14.3 Hz, 2H), 1.87 (amplio t, *J*= 2.9 Hz, 1H), 2.65 (dd, *J*= 2.9 Hz, 1H), 4.00 (q, *J*= 7.02 Hz, 1H), 4.70 (m, 2H).

20

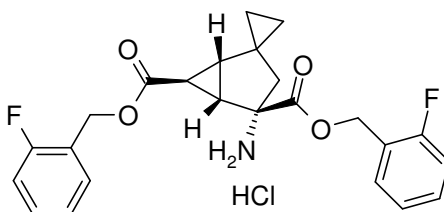
Los siguientes compuestos se prepararon esencialmente por el método del Ejemplo 4.

25

(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-(*terc*-
butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo (0.1 g, 0.2
mmol) en 1,4-dioxano (970 μ L) a temperatura ambiente bajo
5 nitrógeno y se agitó por 20 horas. Se agregó solución en
exceso de cloruro de hidrógeno 4M en 1,4-dioxano (493.30 μ L,
1.97 mmol) y se calentó a 80°C. Se concentró a sequedad,
trituroó con acetonitrilo y secó por congelamiento la
suspensión para dar el compuesto del título como un sólido
10 blanco (89.9 mg, 88%) como un aducto (1:1) con 1,4-dioxano.
MS (*m/z*): 392 (*M*+1).

Ejemplo 9

clorhidrato de Bis[(2-fluorofenil)metil](1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-
aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
15 dicarboxilato

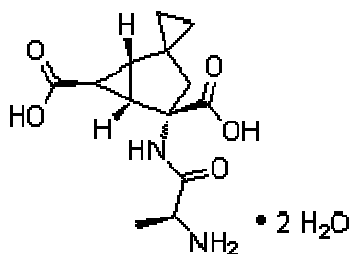


20 Se agregó cloruro de hidrógeno 4M solución en 1,4-
dioxano (4.64 mL, 18.58 mmol) a una solución agitada de
bis[(2-fluorofenil)metil](1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-(*terc*-
butoxicarbonilamino)espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxilato (0.98 g, 1.86 mmol) en 1,4-
25 dioxano (4.64 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y se

agitó la solución por 20 horas. Se concentró *in vacuo* para dar un aceite (0.93 g). Se disolvió en una mezcla de acetonitrilo (10 mL), agua (30 mL) y se secó por congelamiento durante el fin de semana para dar un sólido
5 blanco (820 mg) como una mezcla de compuesto del título contaminado con ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-amino-2-[(2-fluorofenil)methoxycarbonil]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-6-carboxílico (~7-10%). MS (m/z): 320 (M+H). Se disolvió el sólido blanco en acetonitrilo (8 mL) para
10 proporcionar una solución translúcida. Se permitió reposar por 1 hora, antes de la filtración. Se concentró lo filtrado *in vacuo* para proporcionar una espuma viscosa. Se disolvió nuevamente en acetato de etilo, se lavó con una solución saturada de carbonato hidrógeno de sodio, se secó sobre
15 sulfato de magnesio, se filtró y concentró *in vacuo* para proporcionar 774 mg. Se disolvió nuevamente en éter dietílico (11 mL), se agregó cloruro de hidrógeno 1M en éter dietílico (1.86 mL, 1.86 mmol), se concentró *in vacuo* para proporcionar una espuma blanca sólida. Se secó además durante la noche *in*
20 *vacuo* a 50°C para proporcionar el compuesto del título (0.74 g, 85%). MS (m/z): 428 (M+1), 450 (M+23).

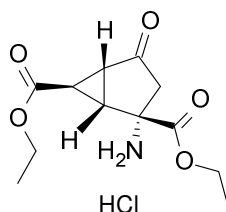
Ejemplo 10

Dihidrato de ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-Aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0] hexano-4,1'-
25 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico



5

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

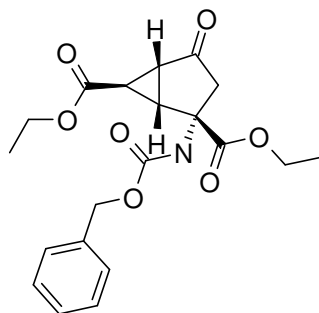


10

Bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó cloruro de acetilo (86.5 mL, 1.2 mol) a etanol absoluto (1.0 L, 17.2 mol) por goteo mientras se mantiene la temperatura de reacción interna por debajo de 30 °C. Se agitó la mezcla resultante por 15 minutos y se agregó (1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de *di-t*-butilo (100 g, 0.24 mol) en una porción. Se calentó la mezcla resultante a reflujo por 16-20 horas. Se concentró la mezcla de reacción a un aceite bajo presión reducida. Se disolvió el producto crudo en cloruro de metileno (250 mL) y se concentró *in vacuo*. Se repitió el proceso de concentración/cloruro de metileno para proporcionar una espuma blanca. Se agregó acetato de etilo (150 mL) y se calentó la mezcla a 65 °C. Se agregó *t*-butil

éter metílico (100 mL) y se agitó la mezcla a 65 °C por 15 minutos. Se agregó t-butil éter metílico (300 mL) durante 15 minutos, se agitó a 65 °C por 15 minutos, después se cerró el calor y se permitió que la suspensión se enfriara a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla y se lavó la torta de filtro con t-butil éter metílico (150 mL). Se transfirió la torta a un horno de vacío y se secó durante la noche a 25 °C para proporcionar el producto crudo (67.5 g). Se transfirieron los sólidos a un matraz de fondo redondo, se diluyó con acetato de etilo (170 mL) y se calentó la mezcla a 65 °C. Se agitó la mezcla por 1 hora, se agregó tetrahidrofurano (68 mL) y etanol (3 mL). Se cerró la fuente de calor y se agregó t-butil éter metílico (272 mL) durante 20 minutos, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente. Se filtró la suspensión, se lavó la torta con 95/5 de t-butil éter metílico/acetato de etilo (2 x 75 mL) y además se secaron los sólidos en un horno a vacío durante la noche a 25 °C para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (60.0g, 98.0%). MS (m/z): 256 (M+1).

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



5

Se suspendió (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*R*)-2-amino-4-oxo-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato-clorhidrato de dietilo (55.0 g, 188.5 mmol) en tetrahidrofurano (220 mL), entonces se agregó agua (220 mL) y carbonato de potasio (92.1 g, 659.9 mmol). Se agitó la mezcla resultante por 30 minutos. Se agregó cloroformiato de bencilo (26.7 mL, 175.3 mmol) a la mezcla durante 45 minutos, se mantuvo la temperatura de reacción por debajo de 25 °C. Se agitó la mezcla de reacción por 30 minutos, después se diluyó con acetato de etilo (550 mL) y agua (275 mL). Se separaron las fases y nuevamente se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (250 mL). Se combinaron los orgánicos y se lavaron secuencialmente con HCl acuoso (0.5N, 100 mL), NaHCO₃ saturado (100 mL) y salmuera (100 mL). Se secó la solución orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y concentró *in vacuo* para proporcionar el compuesto del título como un aceite claro (67.6 g, 92.1%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.24-1.26 (m, 6H), 2.36 (bs, 1H), 2.47(dd, 1H), 2.78 (dd, 1H), 2.90 (dd, 1H), 4.09-4.19 (m, 4H), 5.08 (s, 2H), 5.73 (s, 1H), 7.24-7.36 (m, 5H).

10

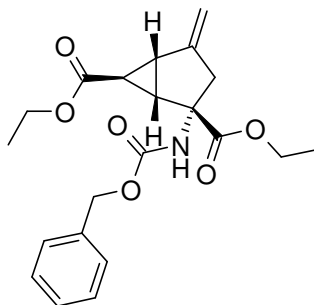
15

20

25

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

5

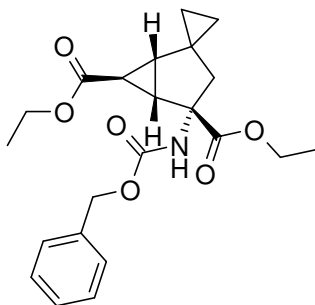


Bajo una atmósfera de nitrógeno, se combinó bromuro
10 de metil-trifenilfosfonio (67.4 g, 184.9 mmol) y
tetrahidrofurano (300 mL) con agitación. Se agregó una
solución de *terc*-butóxido de potasio (1M) en
tetrahidrofurano, 184.9 mL, 184.9 mmol) a la mezcla de
reacción durante 15 minutos y se agitó la suspensión
15 resultante a temperatura ambiente por 3 horas. Se disolvió
(1*S*,2*S*,5*R*,6*R*)-2-benciloxycarbonilamino-4-oxo-
biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (12.3 kg,
31.6 mol) en tetrahidrofurano (120 mL) y se agregó a la
mezcla de reacción durante 1 hora, manteniendo la temperatura
20 de reacción por debajo de 30 °C. Se agitó la suspensión
resultante durante la noche a temperatura ambiente, después
se diluyó con acetato de etilo (600 mL) y se apagó con agua
(300 mL). Después de la agitación de la mezcla bifásica por
30 minutos, se separaron las capas y se lavaron los orgánicos
25 con agua (300 mL) seguido por 0.25M HCl (300 mL). Se secaron

los orgánicos sobre Na₂SO₄, filtraron, y se concentró *in vacuo* (45 °C) para proporcionar el producto crudo como un aceite oscuro (111.0 g). Se purificó el material por cromatografía de obturador de gel de sílice (1 Kg Kieselgel-60, 4 L 15% de EtOAc en heptanos, después 10 L 30% de EtOAc en heptanos) para proporcionar el compuesto del título como un aceite claro (37.3 g, 87.9% potencia, 54.9%). MS (m/z): 388 (M+1).

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

15



25 la suspensión resultante de -10 a -15 °C por 30 minutos. Se

disolvió diiodometano (12.7 mL, 42.1 g, 157.2 mmol) en dicloroetano (12.7 mL) y se agregó a la mezcla de reacción durante 50 minutos, se mantuvo la presión interna por debajo de -10 °C. Se agitó la suspensión blanca resultante, delgada de -10 a -15 °C por 30 minutos. Se disolvió (1S,2S,5R,6S)-2-benciloxicarbonilamino-4-metilen-biciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo (20.3 g, 87.9% potencia, 46.0 mmol) en dicloroetano (30.4 mL) y se agregó a la mezcla de reacción durante 10 minutos, se mantuvo la presión interna por debajo de -10 °C. Se agitó la solución amarillo pálida, clara de -10 °C por 5 minutos y monitoreó para exotermas latentes. Se cambió el punto de ajuste en el enfriador a 0 °C y se agitó la mezcla de reacción a tal temperatura por 48 horas. Se apagó la mezcla de reacción por adición de HCl 5N (62.9 mL, 314.4 mmol) durante 15 minutos, se mantuvo la presión interna por debajo de 6 °C. Se agitó la mezcla resultante a 0-5 °C por 20 minutos, después se transfirió a un embudo y se separaron las capas. Se lavó la capa orgánica con HCl 1N (2 x 50 mL) seguido por 1:1 de NaHCO₃ saturado/H₂O (60 mL), 1:1 de Na₂CO₃ saturado/H₂O (60 mL) y agua (50 mL). Se secaron los orgánicos sobre Na₂SO₄ y se concentraron *in vacuo* para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillo pálido (19.6 g, 60.3% potente, 63.9% de rendimiento corregido). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 0.37 (m, 2H), 0.52-0.55 (dm, 2H), 1.13-1.17 (m, 6H), 1.49-1.50 (m, 1H), 1.51-1.56 (m, 1H), 1.60-1.79 (m, 2H),

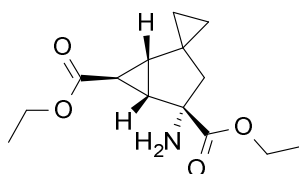
3.97-4.10 (m, 5H), 5.00 (s, 2H), 7.29-7.34 (m, 5H), 8.04 (s, 1H).

Etap **5:**

(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-

aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-

5 dicarboxilato clorhidrato de dietilo



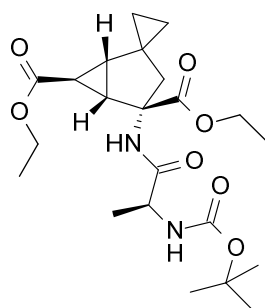
HCl

10 Se cargó etanol absoluto (100 mL, 10 volúmenes),
concentrado. HCl (2.1 mL, 1.0 N) y (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-
benciloxycarbonilaminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (9.7 g, 24.16
mmol) a un reactor de HEL seguido por Pd negro (3.9 g, 40 %
15 en peso). Se purgó el reactor tres veces con nitrógeno
seguido por tres purgas de hidrógeno y presurización a 40 psi
de hidrógeno. Se permitió que la reacción se agitara entre
20-30°C por al menos dos horas hasta la terminación de la
reacción monitoreada por HPLC. Se filtró la suspensión
20 resultante a través de una almohadilla de Hyflo Super Cel® y
se lavó la torta húmeda con etanol absoluto (2 x 30 mL, 3
volúmenes). Se transfirió lo filtrado a un reactor limpio y
desplazó el etanol con acetato de isopropilo por
aproximadamente 5 volúmenes con base en el rendimiento del
25 producto *in situ* de la curva de calibración. Se enfrió la

suspensión resultante a 0-5°C durante al menos 3 horas. Se filtró la suspensión resultante y se lavó la torta húmeda lavada con acetato de isopropilo frío (3 x 5 mL, 0.5 volúmenes). Se secó bajo presión reducida a 30°C por al menos 12 horas para proporcionar el compuesto del título (4.66 g, 15.34 mmol, 63.5%) ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.84 (s, 3H), 4.31-4.15 (m, 2H), 4.03 (q, *J* = 7.0, 2H), 2.42 (dd, *J* = 3.1, 2.6, 1H), 2.24 (dd, *J* = 6.2, 2.6, 1H), 1.94 (d, *J* = 14.1, 1H), 1.68 (d, *J* = 14.1, 1H), 1.63 (dd, *J* = 6.6, 3.1, 1H), 1.25 (t, *J* = 7.0, 3H), 1.17 (t, *J* = 7.0, 3H), 0.77-0.71 (m, 1H), 0.65-0.59 (m, 1H), 0.56-0.51 (m, 1H), 0.50-0.44 (m, 1H).

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

15

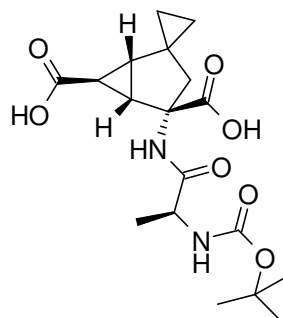


20 Se cargó tetrahidrofurano (45 mL, 10 volúmenes) y ácido *(2S)*-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)propanoico (3.4 g, 1.2 equivalentes) a un reactor seguido por *N*-metilmorfolina (1.96 mL, 1.2 equivalentes) y 2-cloro-4,6-dimethoxi-1,3,5-triazina (3.12 g, 1.2 equivalentes). Se agitó la suspensión delgada resultante entre 20-25°C por al menos 3 horas hasta que la

25

reacción es completa por HPLC. Se cargó clorhidrato de
(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (4.55 g, 14.81
mmol) en una porción entre 20-25°C seguido por *N*-
5 metilmorfolina (1.63 mL, 1.0 equivalentes) durante al menos
10 minutos se mantuvo la temperatura entre 20-25°C. Se agitó
la suspensión resultante entre 20-25°C por al menos 2 horas
hasta que la reacción se completa por HPLC. Se filtraron los
sólidos resultantes y se lavó la torta húmeda con
10 tetrahidrofurano (2 x 10 mL, 2.2 volúmenes) para proporcionar
el compuesto del título asumiendo 100% de rendimiento. Se usó
la solución ámbar pálida de tetrahidrofurano del compuesto
del título sin purificación adicional asumiendo un 100% de
rendimiento. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.46 (s, 1H), 6.72
15 (d, *J* = 7.9, 1H), 4.08-3.92 (m, 5H), 2.42-2.37 (m, 1H), 1.81-
1.64 (m, 3H), 1.47 (dd, *J* = 6.6, 3.1, 1H), 1.34 (s, 9H),
1.18-1.08 (m, 9H), 0.66-0.59 (m, 1H), 0.57-0.52 (m, 1H),
0.46-0.36 (m, 2H).

Etapa 7: ácido (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-[[(2*S*)-2-(*terc*-
20 Butoxicarbonilamino)propanoil]amino]
espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
dicarboxílico

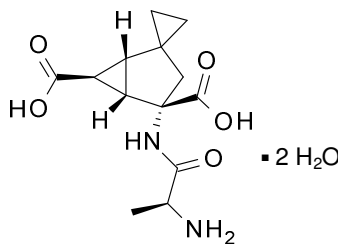


5

Se cargó NaOH 2 N (37 mL, 5.0 equivalentes) y
 (1S,2S,5R,6S)-2-[[(2S)-2-(terc-
 butoxicarbonilamino)propanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexa
 10 no-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dietilo (6.50 g,
 14.81 mmol) a un reactor y se permitió agitar por al menos 12
 horas entre 20-30°C hasta que la reacción se completa por
 HPLC. Se transfirió la reacción a un embudo separador y se
 permitió que sedimentara por al menos 10 minutos. Se
 15 separaron las fases y regresó la capa acuosa inferior al
 reactor. Se agregó acetato de etilo (90 mL, 13.8 volúmenes) a
 la mezcla, y después se agregó NaHSO₄ 1N hasta que el pH
 alcanza 2 a 2.5. Se separaron las capas y se lavó la orgánica
 con agua (45 mL, 6.9 volúmenes). Se removi6 el agua en la
 20 destilación atmosférica de la fase orgánica con acetato de
 etilo para remover el agua residual. Se enfrió la suspensión
 resultante entre 20-30°C durante al menos 2 horas y se dejó
 granular a tal temperatura por al menos 90 minutos. Se
 filtraron los sólidos resultantes y se lavó la torta húmeda
 25 con acetato de etilo (3 x 15 mL, 2.3 volúmenes). Se secó bajo

presión reducida a 45°C para proporcionar el compuesto del
título como un sólido blanco (4.45 g, 11.64 mmol, 78.6%) ¹H
NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 50°C): δ 12.01 (s, 2H), 8.22 (s, 1H),
6.49 (bs, 1H), 4.00 (bs, 1H), 2.43 (dd, J = 6.5, 2.8, 1H),
5 1.83 (d, J = 14.0, 1H), 1.68-1.62 (m, 2H), 1.42 (dd, J = 6.5,
2.8, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.15 (d, J = 7.1, 3H), 0.67-0.61 (m,
1H), 0.56-0.51 (m, 1H), 0.46-0.36 (m, 2H).

Etapa 8: dihidrato de ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-
2-Aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0] hexano-4,1'-
10 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico



15

Se cargó agua (32 mL, 8 volúmenes) y ácido
(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-(*terc*-
butoxycarbonilamino)propanoil]amino]
espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-
20 dicarboxílico (3.99 g, 10.4 mmol) a un reactor seguido por
HCl concentrado (1.80 mL, 2.0 equivalentes) y después se
calentó la reacción a 45-55°C hasta que la reacción se
completa (monitoreada por HPLC). Se enfrió la mezcla de
reacción a 20-30°C y se ajustó el pH a aproximadamente 3.6
25 con NaOH 5N. Se agregó etanol absoluto (15 mL, 3.75

volúmenes) durante al menos 30 minutos entre 20-30°C a la suspensión resultante. Se permitió que la suspensión resultante granulara entre 20-30°C por al menos 12 horas. Se enfrió la mezcla entre -5-5°C y se permitió que granulara por al menos 60 minutos. Se filtraron los sólidos resultantes y se lavó la torta con 30% de etanol absoluto en agua (2 x 9 mL, 2.25 volúmenes). Se secaron los sólidos bajo presión reducida a 35°C por al menos 12 horas, y después se permitió que los sólidos resultantes permanecieran en el balance hasta que no hay cambio de peso adicional por al menos 2 horas para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (2.71 g, 8.51 mmol, 81.6%). ¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ 3.90 (q, J = 7.2, 1H), 2.56 (dd, J = 6.5, 2.9, 1H), 1.74-1.66 (m, 2H), 1.62-1.54 (m, 2H), 1.39 (d, J = 7.1, 3H), 0.61-0.56 (m, 1H), 0.55-0.49 (m, 1H), 0.40-0.30 (m, 2H).

Los patrones de difracción en polvo de rayos-X (XRD) de sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro de polvo de rayos-X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente CuKα ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) y un detector Vantec, que opera a 35 kV y 50 mA. La muestra es barrida entre 4 y 40° en 2θ, con un tamaño de etapa de 0.0087° en 2θ y una velocidad de barrido de 0.5 segundos/etapa, y con divergencia de 0.6 mm, anti-dispersor fijo de 5.28 mm, y ranuras detectoras de 9.5 mm. El polvo seco es envasado en un retenedor de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa usando una laminilla

de vidrio. Los patrones de difracción se ajustaron con base en picos estándares NIST 675 a 8.85 y 26.77 grados 2-theta. Es bien conocido en la técnica de cristalografía que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores, tales como hábito de cristal, y las posiciones pico angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones pico pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o humedad en la cual una muestra es analizada, desplazamiento de muestra. En el presente caso, una variabilidad de posición pico de ± 0.2 en 2θ tomará en consideración estas variaciones potenciales sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma de cristal indicada. La confirmación de una forma de cristal puede hacerse con base en cualquier combinación única de picos distinguibles (en unidades de $^\circ 2\theta$), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción en forma de cristal son recolectados a temperatura ambiente y humedad relativa.

De este modo, una muestra preparada del Ejemplo 10 es caracterizada por un patrón de XRD usando radiación de CuK α ya que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 abajo. Específicamente el patrón contiene un pico a 5.20 en combinación con uno o más de los picos seleccionados a partir del grupo que consiste de 10.45,

11.70, 15.75, 21.06 y 23.59 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0.2 grados.

Tabla 1: Picos de difracción en polvo de rayos-X del Ejemplo 10

5

10

Pico	Ángulo (2-Theta °)	Intensidad (%)
1	5.20	100
2	10.45	43.9
3	11.70	23.8
4	13.09	24.1
5	15.75	45.9
6	16.80	56.4
7	20.49	15.3
8	21.06	79.3
9	23.58	96
10	26.44	20.9

15

20

Los receptores de mGlu son receptores acoplados a la proteína-G que modulan la excitabilidad neuronal. Más particularmente, la neurotransmisión del glutamato alterado ha sido ligada a trastornos neurológicos tales como condiciones de dolor crónico que incluyen dolor persistente, dolor neuropático, dolor inflamatorio crónico, o dolor visceral; trastornos psiquiátricos, tales como esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno de ansiedad generalizada, o trastorno de estrés post-traumático; o trastornos neurodegenerativos.

25

Puesto que los compuestos de la presente invención

son agonistas de mGlu2/3, pueden ser adecuados para tratar las condiciones mencionadas anteriormente.

Ensayo FLIPR Agonista de mGlu2 y mGlu3 humano

5 Líneas de células AV-12, derivadas de fibroblastos de Hámster Sirio y que expresan establemente el receptor mGlu2 o mGlu3 humano y co-transfectadas con el transportador de glutamato de rata EAAT 1 (Transportador de Aminoácido Excitatorio 1) y la subunidad $G\alpha 15$, son usadas para estos
10 estudios. La expresión de $G\alpha 15$ permite a los receptores acoplados a G_i la señal a través de la trayectoria de fosfolipasa C, resultando en la capacidad para medir la activación del receptor por un ensayo fluorométrico de respuesta de calcio. Las líneas celulares son mantenidas por
15 cultivo en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con alta glucosa y clorhidrato de piridoxina suplementado con 5% de suero bovino fetal dializado, 1 mM de piruvato de sodio, 10 mM de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico), 1 mM de L-glutamina, y 5 μ g/mL de
20 blasticidina (todos los medios son adquiridos de Invitrogen). Los cultivos confluentes son pasados cada dos semanas usando una solución de disociación libre de enzima (Chemicon S-004-B). Las células son recolectadas 24 horas previo al ensayo y dispensadas usando una sembradora celular de Matrix Well-Mate
25 a 85,000 (mGlu2) o 115,000 (mGlu3) células por cavidad en

placas recubiertas con poli-D-lisina, de pared negra, de 96 cavidades (BD BioCoat #354640) en medio que contiene solamente 250 (mGlu2) o 125 (mGlu3) μ M de L-glutamina (recientemente agregada). Los niveles de calcio intracelular son monitoreados antes y después de la adición de compuestos usando un Lector de Placa de Formación de Imágenes Fluorométricas (FLIPR, Molecular Devices). El amortiguador de ensayo está comprendido de Solución de Sal Amortiguada de Hank (HBSS; Sigma) suplementado con 20 mM de HEPES. El medio es removido y las células son incubadas con 8 μ M de Fluo-3AM (Molecular Probes, F-1241; 50 μ L por cavidad) en amortiguador de ensayo por 90 minutos (mGlu2) ó 120 minutos (mGlu3) a 25°C. La solución de tinte es removida y colocada con amortiguador de ensayo fresco (50 μ L por cavidad). Se conduce un ensayo FLIPR de adición única que genera una curva de respuesta de concentración de 11 puntos (diluciones 3X partiendo a 10 μ M) para el glutamato agonista (Fisher A125-100) previo a cada experimento para confirmar la respuesta EC₅₀ típica. Los resultados son analizados usando Prism v4.03 (Software GraphPad). Los compuestos de la invención son probados en un ensayo FLIPR de adición única usando un perfil de respuesta de concentración de 10 puntos usando diluciones 3X partiendo a una concentración final de 25 μ M. Los compuestos de la invención son solubilizados como soluciones base de 10 mM en NaOH 0.1N y almacenados a -20C. Son diluidos

a través de una serie de dilución de tres partes en amortiguador de ensayo. Después de tomar una lectura fluorescente de 5-segundos inicial en el instrumento FLIPR, un compuesto de la invención es agregado a la placa celular (50 μ L por cavidad). Los datos son recolectados cada segundo por los primeros 30 segundos y después cada 3 segundos para un total de 90 segundos para detectar actividad agonista. La respuesta máxima es definida como aquella inducida por EC_{max} (100 μ M de glutamato). El efecto del compuesto es medido como alturas de pico máximas menos mínimas en unidades fluorescentes relativas (RFUs) correlacionadas para fluorescencia basal medida en la ausencia de glutamato. Se llevaron a cabo determinaciones usando las placas individuales. Los efectos agonistas son cuantificados como porcentaje de estimulación inducido por el compuesto solo con relación a la respuesta de glutamato máxima. Todos los datos son calculados como valores EC₅₀ relativos usando un programa de ajuste de curva logística de cuatro parámetros (ActivityBase v5.3.1.22).

El Ejemplo 2 es medido en el ensayo FLIPR de hmGlu2 corrido sustancialmente como anteriormente para tener un EC₅₀ de 39.0 nM $\pm$ 5.9 (n = 3, error calculado como SEM). El Ejemplo 2 es también medido en el ensayo FLIPR de hmGlu3 corrido esencialmente como anteriormente para tener un EC₅₀ de 285 nM $\pm$ 52.5 (n = 8, error calculado como SEM). Estos

resultados demostraron que el Ejemplo 2 es un agonista mGlu 2 y mGlu3 potente.

Reversión de Dolor persistente Inducido por Inyección de 5 Formalina

La administración de formalina en la superficie plantar de la pata trasera de la rata en dos fases de comportamiento nocifensivo (tal como lamer, morder, y estremecimiento de la pata inyectada): una fase temprana que
10 dura aproximadamente los 5 minutos después de la administración de formalina y una fase tardía desde aproximadamente el minuto 10 hasta el minuto 60 después de la inyección de formalina. Un periodo quiescente de aproximadamente el minuto 5 al minuto 10 separa las dos
15 fases. El registro de estos comportamientos inducidos por formalina puede ser automatizado usando cámaras de sobresalto (SR-Lab, San Diego Instruments, San Diego, CA) las cuales detectan movimientos de las ratas por medio de un acelerómetro. Un compuesto de prueba (activo) es dosificado
20 (ruta intraperitoneal) en ratas Sprague-Dawley no ayunadas dentro de un rango de 0.3 - 10 mg/kg 1 horas previo a la inyección de formalina intraplantar. Las ratas son individualmente colocadas en cilindros dentro de las cámaras de prueba para aclimatación. Un compuesto de prueba
25 (profármaco) es oralmente dosificado dentro de un rango de

0.45 - 15 mg/kg, en ratas Sprague-Dawley macho no ayunadas dos horas previo a la inyección de formalina intraplantar. Las ratas son entonces colocadas individualmente en cilindros dentro de las cámaras de prueba para aclimatación. En puntos
5 de tiempo especificados, las ratas son removidas de los cilindros y administradas con formalina (50 μ L de una solución al 5% en salina) subcutáneamente en la superficie plantar de la pata trasera derecha e inmediatamente colocada nuevamente en los cilindros. Los cilindros son posicionados
10 en las celdas de carga del sistema de detección dentro de las cámaras de prueba, de este modo permitiendo ser monitoreada la respuesta continuamente por 60 minutos en recipientes de 1 segundo. El número de eventos nocifensivos [el número de recipientes de 1 segundo con >20 unidades de carga] es
15 totalizado en intervalos de 5 minutos. El umbral de unidad de 20-carga es bastante grande para eliminar la inclusión de eventos fisiológicos normales tales como respiración o inhalación, pero de una magnitud significativa para detectar eventos nocifensivos. Los datos son convertidos determinando
20 el número de eventos sobre el umbral (20 unidades de carga) en cada recipiente de tiempo de 1 segundo sobre los 60 minutos de recolección de datos. El registro de la fase temprana es la suma de eventos mayores de 20 unidades de carga del Tiempo 0 a 5 minutos. El registro de fase tardía se
25 obtiene agregando el número total de eventos mayores de 20

unidades de carga desde el Minuto 11 al Minuto 40 del periodo de recolección de datos. Los datos de formalina son evaluados por análisis de una vía de varianza (ANOVA) y los contrastes apropiados analizados por la prueba "t" de Dunnett para comparación de dos lados usando el programa de análisis estadístico JMP (v 6.0.2) (SAS Institute Inc, Cary, NC). Las diferencias son consideradas por ser significantes si el valor-p es menos de 0.05. Los cálculos de ED₅₀ se realizan usando ajuste de curva de regresión no lineal en porcentaje de reversión de datos transformados para cada dosis.

El Ejemplo 2 es medido en este ensayo, corrido sustancialmente como anteriormente, para tener un ED₅₀ de 0.7 mg/kg (i.p.). El Ejemplo 10 es medido en este ensayo, corrido sustancialmente como anteriormente, para tener un ED₅₀ de 4.8 mg/kg (p.o.). Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones útiles para dolor persistente.

Reversión de Ligación del Nervio L5/L6 Inducida por

Alodinia Táctil

La ligación unilateral de nervios que inervan la región de la pierna trasera resultará en un dolor persistente crónico manifestado como alodinia táctil en ratas. Se realiza la ligación del nervio L5/L6 (Kim et al. *Pain* (1992) 50, 355-363). La lesión neuropática es producida ligando

apretadamente los nervios espinales izquierdos L5 y L6 bajo anestesia gaseosa con una mezcla de isoflurano (3% para inducción y 2% para mantenimiento) y oxígeno. Después de un mínimo de 14 días después de la cirugía, la alodinia táctil es evaluada midiendo la sensibilidad táctil de la pata lesionada a filamentos von Frey con fuerzas de flexión incrementales (0.3 a 15 g) (Chaplan *et al. J. of Neuroscience Methods* (1994) 53, 55-63). Las ratas son consideradas por ser hipersensitivas cuando demuestran alodinia táctil (retiro de la pata en respuesta a la aplicación de una fuerza de flexión de menos de 2 gramos). Los valores de línea base son determinados inmediatamente previo a la valoración del compuesto de prueba. Un compuesto de prueba (profármaco) es dosificado oralmente a 15 mg/kg y el umbral táctil para el retiro de la pata se mide a 1, 2 y 4 horas posteriores a la dosificación. Los datos son expresados como umbral de respuesta en gramos (g) y los valores con errores estándares de medias ($\pm$ SE media) para cada punto de tiempo. Los datos son analizados usando un análisis de varianza seguido por análisis post-hoc de Dunnett y representan un cambio absoluto en el umbral de dolor (C_{max} = Respuesta de línea base máxima) y expresado como Media [$\log$ (respuesta máxima) - registro de predosis $\log$)] (g).

El Ejemplo 10 dosificado oralmente a 15 mg/kg (en donde $n=8$; error calculado como SEM) es medido en este

ensayo, corrido sustancialmente como anteriormente, para tener umbral mecánico significativamente incrementado a una, dos y cuatro horas: 9.06 ± 2.26 , 12.31 ± 1.86 y 8.63 ± 1.98 , respectivamente, comparado con los valores correspondientes después del tratamiento con vehículo: 1.50 ± 0.60 , 1.34 ± 0.75 , y 2.35 ± 0.62 a una, dos y cuatro horas respectivamente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones útiles para condiciones de dolor neuropático.

10

Reversión de Hiperalgnesia Mecánica Inducida por CFA

La inducción de inflamación local en la pata trasera de la rata causará una hiperalgnesia mecánica persistente que puede ser medida determinando el umbral al estímulo de presión para dar una respuesta dolorosa. El método para hiperalgnesia mecánica inducida por adyuvante Freund completo (CFA) en ratas es ampliamente descrito Iadarola et al. *Brain Res.* (1988) 455, 205-212. Las ratas son colocadas bajo anestesia de isoflurano mientras la pata derecha es inyectada con 50 μ l de CFA (Sigma C5881, 1 mg/ml de extracto de micobateria en 85% de aceite de parafina, 15% de monoleato de manuro) intraplantar. Los animales son dejados recuperar en jaulas de lecho blando y los cambios de hiperalgnesia mecánica medidos 24 horas post-inyección de CFA.

25 La hiperalgnesia mecánica (Prueba de Randall Sellito) es

determinada restringiendo suavemente a la rata y colocando la pata entre el plinto y empujador (medidor Ugo Basile Analgesy). La fuerza en gramos cuando el animal retira la pata es registrada. Una fuerza máxima de no más de 250 gramos es aplicada y si la rata no retira la pata, se registra un valor de 250 gramos.

Las ratas son probadas por respuesta a línea base previo a la inyección de CFA. La respuesta post-CFA es probada la siguiente mañana (aproximadamente 24 horas post-inyección de CFA). Las ratas son aleatorizadas con base en la respuesta post-CFA con cualquier rata que muestra un registro de >150 gramos excluida de pruebas adicionales. Un compuesto de prueba (profármaco) es oralmente dosificado dentro de un rango de 1.5 a 15 mg/kg y el umbral mecánico para el retiro de pata es medido a 1 y 2 horas post-dosificación. La significancia estadística es definida como un valor $p < 0.05$ en un análisis de covarianza seguido por prueba post-hoc de Dunnett para cada punto de tiempo. La Tabla 2 abajo proporciona los resultados estadísticamente significantes para el Ejemplo 10 corrido sustancialmente como anteriormente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones útiles para condiciones de dolor inflamatorio crónico tales como osteoartritis o artritis reumatoide.

Tabla 2

5		Umbral de Retiro de Pata (gramos, fuerza)			
		Línea base (Pre-CFA)	24 horas (post-CFA)	Una hora (post-dosificación)	Dos horas (post-dosificación)
	Vehículo (1% HEC)	236 ± 7	112 ± 9	98 ± 7	109 ± 14
	1.5 mg/kg po del Ejemplo 10	243 ± 5	113 ± 8	180 ± 14*	186 ± 19*
	4.5 mg/kg po del Ejemplo 10	221 ± 10	114 ± 9	153 ± 20*	221 ± 20*
10	15 mg/kg po del Ejemplo 10	244 ± 4	108 ± 12	250 ± 0*	232 ± 15*

Los valores son la media ± SEM para un N = 8-10 por grupo.

* valor p < 0.05 vs. Vehículo al mismo punto de tiempo (ANOVA y prueba t de Dunnett)

Reversión de Comportamientos de Dolor Inducidos por

Distensión Colorrectal

El dolor visceral en ratas puede ser inducido por distensión de la cavidad colorrectal y dolor monitoreado accedando a la contracción reflejo de los músculos abdominales. La medición de contracciones reflejo del músculo abdominal con dolor causado por distensión colorrectal en la rata es realizada sustancialmente como se describe por Fioramonti et al. *Neurogastroenterology and Motility* (2003)

15, 363-369 y Urban et al. *J. of Pharmacology and Exp. Ther.*
(1999) 290, 207-213. Ratas macho Sprague Dawley son
quirúrgicamente implantadas con electrodos electromiográficos
(EMG) en el músculo abdominal oblicuo y dejadas recuperar por
5 una semana, durante la cual los animales son aclimatados al
manejo y restricción parcial para minimizar los efectos de
estrés. Las mediciones de EMG de línea base son recolectadas
y registradas después de la inserción en el recto (8 cm) de
un balón de látex lubricado unido a un monitor de
10 presión/regulador con el paso de la presión entre 20, 40, y
60 mm de Hg por una duración de 20 segundos con un periodo de
reposo de 3 minutos entre ensayos. Una serie de tres
exposiciones en cada presión es registrada antes de pasar la
presión al siguiente nivel. Los datos son recolectados como
15 el área bajo la curva para lecturas de EMG (μ volts por
segundo) durante las estimulaciones de presión, y promediados
durante los tres ensayos. Un compuesto de prueba (profármaco)
es oralmente dosificado dentro de un rango de 1.5 a 17 mg/kg
90 minutos previo al comienzo de la distensión colorrectal.
20 La significancia estadística es definida como un valor $p <$
0.05 en un análisis de covarianza seguido por una prueba
post-hoc de Dunnett. La Tabla 3 abajo proporciona los
resultados estadísticamente significantes para el Ejemplo 10
corrido sustancialmente como anteriormente. Estos resultados
25 demuestran que los compuestos dentro del alcance de la

presente invención son medicaciones útiles para condiciones de dolor visceral.

Tabla 3

5		AUC de lectura de EMG para músculo abdominal ($\mu\text{V}/\text{seg}$) con 60 mm de Hg de presión colorrectal	
	AUC de lectura de EMG para músculo abdominal ($\mu\text{V}/\text{seg}$) con 60 mm de Hg de presión colorrectal	Línea base (pre-dosificación)	90 minutos (postdosificación)
	Vehículo (1% de HEC)	813 $\pm$ 101	849 $\pm$ 65
	1.5 mg/kg po del Ejemplo 10	853 $\pm$ 142	618 $\pm$ 92
	4.5 mg/kg po del Ejemplo 10	887 $\pm$ 152	531 $\pm$ 99*
10	17 mg/kg po del Ejemplo 10	773 $\pm$ 134	266 $\pm$ 87*

15 Los valores son la media $\pm$ SEM para un N = 8-16 por grupo.

* valor $p < 0.05$ vs. Vehículo al mismo punto de tiempo (ANOVA y prueba t de Dunnett)

Reversión de Actividad Hiperlocomotora Inducida por

20 Fenciclidina (PCP) en Ratas

La administración de agonistas del receptor NMDA, tales como cetamina o fenciclidina (PCP), produce efectos similares psicotomiméticos en humanos que son similares a aquellos síntomas observados en pacientes con esquizofrenia.

25 La capacidad de los agentes para revertir los efectos

estimulantes locomotores de antagonistas de NMDA son a menudo usados como un modelo animal de psicosis, demostrando buena validez predictiva para detectar eficacia clínica de medicaciones para esquizofrenia y trastorno bipolar.

5 La actividad motora es monitoreada colocando ratas macho Sprague-Dawley individuales (Harlan, Indianápolis, IN) en jaulas de cajas de zapato de plástico, transparentes, de las dimensiones 45 x 25 x 20cm, con 1 cm de profundidad de virutas de madera como cama, y una rejilla de metal en la
10 parte superior de la jaula. Los monitores motores (Kinder Scientific) consisten de un bastidor rectangular de 12 fotohaces arreglados en una formación 8 x 4, (o una agrupamiento de alta densidad de 22 en un patrón 15x7) a una altura de 5 cm, con un segundo bastidor (para medir los
15 comportamientos de crianza) a una altura de 15 cm. La jaula de caja de zapatos es colocada dentro de estos bastidores, con los bastidores en la parte superior de la mesa de 91 cms (3 pies) de alto en un cuarto aislado. Un compuesto de la invención (activo) es dosificado (ruta intraperitoneal)
20 dentro de un rango de 0.3 - 10 mg/kg, 30 minutos previo a una dosis de estimulación de 5 mg/kg de feniciclidina (PCP). Un compuesto de la invención (profármaco) es oralmente dosificado dentro de un intervalo de 0.3 - 30 mg/kg, en ratas ayunadas durante la noche, 4 horas previo a una dosis de
25 estimulación de 5 mg/kg de PCP. En el día de la prueba, las

ratas son colocadas en la jaula de prueba y dejadas para aclimatarse por 30 minutos previo a la estimulación de PCP; las ratas son monitoreadas por unos 60 minutos adicionales después de la administración de PCP.

5 Los análisis de datos y cálculos de ED₅₀ se conducen usando GraphPad Prism (San Diego, CA. USA). Los análisis de potencia han determinado que 8-10 ratas por grupo son necesarias para tener una potencia estadística apropiada para detectar diferencias de tratamiento (potencia = 0.8). Un
10 análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una prueba de comparación múltiple de Dunnett post-hoc se conduce en la actividad locomotora de 60 minutos totales. Los cálculos de ED₅₀ se realizan usando ajuste de curva de regresión no lineal en el porcentaje de reversión de datos transformados para
15 cada dosis.

El Ejemplo 2 es medido en este ensayo corrido sustancialmente como anteriormente para tener un ED₅₀ de 1.46 mg/kg (i.p.). Los Ejemplos 5 y 6 son medidos en este ensayo corrido sustancialmente como anteriormente para tener 2.95
20 mg/kg (p.o.) y 4.31 mg/kg (p.o.), respectivamente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones útiles para esquizofrenia y trastorno bipolar.

Atenuación de Hipertermia Inducida por Estrés en Ratas

La hipertermia, una elevación en la temperatura corporal nuclear, es un fenómeno natural que ha sido confiablemente demostrado en muchos mamíferos, incluyendo humanos, en respuesta al estrés. En muchos trastornos de ansiedad, la hipertermia ocurre como parte de la patología y es considerada un síntoma de la enfermedad. Los compuestos los cuales atenúan la hipertermia inducida por estrés en animales se cree son útiles en el tratamiento de trastornos de ansiedad en humanos. El trastorno de ansiedad generalizada y trastorno de estrés post-traumático están entre los trastornos que pueden ser tratados con tales compuestos. El método mínimamente invasivo y convencional para analizar hipotermia inducida por estrés es midiendo la temperatura corporal, e incrementos inducidos por estrés en la temperatura corporal vía termómetro rectal. Ratas macho Fischer F-344 (Harlan, Indianápolis, IN, USA) que pesan entre 275 - 350 g son probadas. Todos los animales son individualmente alojados con alimento y agua automatizados disponibles opcional (*ad libitum*), y mantenidos en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (luces a las 06:00). Los animales son ayunados por aproximadamente 12-18 horas antes del experimento, el cual es conducido durante la fase de luz. Las ratas son dosificadas intraperitonealmente (IP) en un volumen de dosis de 1 mL/kg con los compuestos de la invención en el

rango de 0.3, 1, 3, y 10, mg/kg. El vehículo es salina + NaOH agregado para lograr un pH de 5-7. El antagonista de mGluR5 MTEP (3-[(2-metil-1,3-tiazol-4-il)etinil]piridina), el cual ha demostrado actividad similar ansiolítica robusta en
5 modelos preclínicos, es usado como un comparador (5 mg/kg, ruta IP, disuelto en agua). Inmediatamente después de la dosificación, las ratas son regresadas a su jaula, y el experimento apaga las luces y deja el cuarto. El cuarto de dosificación es oscurecido por el resto del periodo de
10 tratamiento de 1 hora.

Después del periodo de tratamiento, las ratas son tomadas individualmente a una sala adyacente brillantemente iluminada donde las temperaturas corporales de línea base son determinadas por inserción de una sonda rectal lubricada con
15 aceite mineral. La temperatura corporal es valorada usando un Termómetro Microprobe PHYSITEMP BAT-12® con una sonda rectal para rata PHYSITEMP RET-2® (Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, USA). La sonda es insertada aproximadamente 2 cm en el recto, para medir la temperatura corporal nuclear (esta
20 es la temperatura corporal de línea base, T1, en grados Celsius). Diez minutos después se registra una segunda medición de temperatura corporal (T2). La diferencia en temperatura corporal (T2 - T1) es definida como la respuesta hipertérmica inducida por estrés. La dosis en la cual un
25 compuesto de la invención produce una reducción del 35% en

respuesta hipertérmica inducida por estrés, con relación a la respuesta del vehículo, es definida como la dosis T_{35} .

El Ejemplo 2 es medido en este ensayo corrido sustancialmente como anteriormente para tener un T_{35} de 0.57 mg/kg. El Ejemplo 5 es medido en este ensayo corrido sustancialmente como anteriormente para tener un T_{35} de 6.4 mg/kg. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son medicaciones útiles para trastornos de la ansiedad. Más particularmente, los compuestos dentro del alcance de la presente invención pueden ser medicaciones útiles para trastorno de ansiedad generalizada y/o trastorno de estrés post-traumático.

Tamiz de Inhibición de GlySar PepT1 *in vitro* y

Determinación de IC_{50}

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

Células HeLa, derivadas de intestino humano, (American Type Culture Collection) se hicieron crecer en medio Hyclone (Invitrogen, Cat# SH30243) que contiene 10% de suero bovino fetal (FBS), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), y 100 unidades/mL de penicilina con 100 μ g/mL de estreptomicina a 37°C en una atmósfera al 5% humidificada de CO_2 . La línea celular es usada por hasta 40 pasajes y después

desechada. Células congeladas en viales de 1 ml son descongeladas en baño maría por 1-2 minutos y agregadas a 5 mL de medio celular a 37°C. Cada uno de los matraces-T es proporcionado con 8.5 mL del medio fresco y 1.5 mL de la
5 solución base celular. Las células son pasadas dos veces durante una semana. Esto se logra enjuagando los matraces con 10 mL de salina amortiguada con fosfato-ácido etilendiaminatetraacético (PBS-EDTA), agregando 2 mL de tripsina por 2-5 minutos, para separar las células y agregar
10 8 mL de medio fresco para inhibir la actividad adicional de tripsina. Cada nuevo matraz recibe una combinación de 8.5 mL de medio fresco y 1.5 mL de solución base celular, para obtener una dilución celular 1:6. Las células son incubadas a 37°C, hasta la lectura para el estudio de absorción.

15 Las células que son 70-80% confluentes en los matraces-T son plaqueadas 1 día previo al procedimiento de transfección. El matraz con la solución base celular es tratado con PBS-EDTA y tripsina para separar las células, y el medio de transfección es usado a partir de este punto. El
20 medio de transfección consiste de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) + NEAA. A cada cavidad, se agregaron 0.5 mL de mezcla celular (1.3×10^5 es la concentración celular deseada) y las células son incubadas a 37°C durante la noche. Veinticuatro horas antes del ensayo, las células son
25 transfectadas con PEPT1. La mezcla de transfección es

preparada mezclando 600 μ L de medio de transfección libre de suero, 18 μ L de FuGene6 (Roche Diagnostics), y 11 μ g del ADN de PepT1. El complejo de reactivo de transfección-ADN es incubado por 20 minutos y se agregan 24 μ L del complejo de reactivo-ADN a cada cavidad.

La inhibición de la actividad de absorción de [glicil-1-2- ^{14} C]Gliclisarcosina (GlySar) mediada por PEPT1 es medida en las células cultivadas en las placas de 24 cavidades 24 horas post-transfección como se publica previamente (Zhang et al. 2004. J. Pharm. Exper Ther. 310:437-445). Para medir la capacidad de un compuesto de la invención para inhibir la absorción de [^{14} C]Gly-Sar, los profármacos son incubados con 80 a 90% de células HeLa temporalmente transfectadas con PePT1 confluentes a 5 mM en pH 6.0 de medio de absorción en la presencia de 5 μ M de [^{14} C]Gly-Sar (Moravek Biochemicals) y 20 μ M de Gly-Sar frío. El medio de absorción consiste de 140 mM de NaCl, 5.4 mM de KCl, 1.8 mM de CaCl₂, 0.8 mM de MgSO₄, 5 mM de Glucosa, 25 mM de amortiguador tris(hidroximetil)aminometano (TRIS). La solución es entonces llevada a pH 6.0 usando ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico. El volumen de incubación es 500 μ L y es realizado a temperatura ambiente por 3 minutos. Para detener la absorción en la conclusión del tiempo de incubación, el medio de absorción es aspirado de la monocapa celular y 500 μ L de PBS enfriado en hielo se agregan a la

cavidad. Las células son lavadas 3 veces con 500 μ L de PBS a temperatura ambiente sin Ca^{+2} y Mg^{+2} . Las células son entonces lisadas con 300 μ L de 1% de solución de H_2O de Triton X100. Una alícuota de 200 μ L es removida y la radioactividad se
5 determina por conteo de escintilación líquida para medir el $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ presente en cada una de las cavidades de incubación. Un control sin inhibidor es establecido y el porcentaje de inhibición de cada profármaco es calculado con respecto a este control. Un control negativo (Glicina) y dos
10 controles positivos (Cefadroxil y Cefalexina) se realizan en paralelo en cada experimento para demostrar la viabilidad del sistema de ensayo. Los profármacos con inhibición de absorción GlySar igual o mejor que Cefalexina son considerados aceptables. Los valores medios $\pm$ desviación
15 estándar son $10.1 \pm 9.5\%$ ($n=19$) para Glicina, $53.2 \pm 13.2\%$ ($n=19$) para Cefadroxil, y $37.5 \pm 14.7\%$ ($n=18$) para Cefalexina.

Para el ensayo de IC_{50} de PepT, los profármacos son incubados a un rango de concentraciones (0.0625 a 25 mM) en la presencia de 5 μ M de $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ y 20 μ M de Gly-Sar frío.
20 Los procedimientos de muestreo e incubación son exactamente los mismos como para el tamiz PepT1 descrito anteriormente. Los datos de absorción de $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ son evaluados para cada una de las concentraciones de profármacos y los valores IC_{50} son calculados.

25 Los Ejemplos 5, 6, y 7 son medidos en este ensayo

corrido sustancialmente como anteriormente para tener inhibición de absorción de [3H]Gly-Sar de hPepT1 a 5mM de 89%, 87%, y 78%, respectivamente. Los Ejemplos 5 y 6 son medidos en este ensayo corrido sustancialmente como
5 anteriormente para tener IC₅₀ de inhibición de absorción de [3H]Gly-Sar de hPepT1 de 1.98 mM y 0.25 mM, respectivamente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son oralmente absorbidos vía el transportador PepT1.

10

Ensayo de Hidrólisis de Profármaco Intestinal *in vitro*

Homogenados intestinales de duodeno humano congelados (relación de tejido:amortiguador 1:2 usando 100 mM de amortiguador de Fosfato Tris, pH 7.4) se obtienen de
15 Tecnologías Celsius *In Vitro* (Baltimore, MD) que fueron libres tanto de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) como EDTA.

Cada lote de duodeno humano se obtiene de un donador único y el intestino es raspado y las secciones son congeladas separadas. Todas las recolecciones de tejido
20 original son realizadas a 4°C e inmediatamente congeladas a -70°C. Los homogenados intestinales humanos son descongelados y diluidos a una concentración de proteína final de 0.5 mg/mL en 100 mM de amortiguador PBS, pH 7.4 inmediatamente previo a las incubaciones.

25

Las incubaciones son conducidas en placas de 96

cavidades y todos los profármacos son corridos en duplicados en cada día. Las soluciones base de profármacos son preparadas en agua a una concentración de 1 mM. Una alícuota de 200 µL de 0.5 mg/mL de homogenado intestinal y 196 µL de 5 100 mM de amortiguador de PBS son colocadas en una placa de 96 cavidades a baño maría a 37°C. Usando un pipeteador de 96 cavidades, se transfieren 4 µL de 1 mM de solución de profármaco en el homogenado. Inmediatamente después de la adición del profármaco (tiempo cero) y después de 1 hora de 10 incubación, 50 µl de las muestras de la mezcla de incubación son removidas usando un pipeteador de 96 cavidades simultáneo desechable automatizado y agregadas directamente a 200 µL de metanol de solución de apagado que contiene 100 ng/mL de Estándar Interno. Las muestras son entonces centrifugadas a 15 3500 rpm por 5 minutos a 10 °C. El sobrenadante (200 µL) es transferido a una placa final de PCR de 96 cavidades y sellada para análisis por LC/MS/MS.

Las concentraciones de metabolito activo hidrolizado en las mezclas de incubación son determinadas 20 usando detección de LC/MS/MS en un espectrómetro de masas cuádruplo Sciex API 4000 con Analyst versión 1.4.2, TurboIonSpray, ionización positiva, y Monitoreo de Reacción Seleccionada (SRM). Una columna de HPLC Waters Atlantis® T3 (20 x 2.1 mm, 5 µM) se usa a temperatura ambiente con una 25 velocidad de flujo de 1.0 mL/min y un gradiente de fase móvil

desde 0.1% de fase móvil A hasta 99% de fase móvil A. La fase móvil A es 1000:5 agua: ácido heptafluorobutérico y la fase móvil B es 1:1 metanol:ácido glacial acético.

Las concentraciones de metabolito activo
5 hidrolizado en las mezclas de incubación intestinal son determinadas de curvas estándares preparadas por réplicas de dilución de dos partes partiendo a 10 μ M en 100 mM de PBS pH 7.4 y subsecuentemente apagadas con solución estándar interna-metanol idénticas a las muestras. Los promedios y
10 desviaciones estándares son calculados usando Microsoft® Office Excel® 2007. La cantidad de hidrólisis es determinada como un porcentaje molar de metabolito activo formado con relación a la concentración de profármaco agregado. La hidrólisis del control positivo, Profármaco Interno A al
15 Metabolito Activo Interno de Fármaco A, corrida en cada lote promedió 75.3% (n=20). Los valores finales son entonces normalizados con relación a la formación del Metabolito Activo Interno de Fármaco A.

Los Ejemplos 5, 6, y 7 son medidos en este ensayo
20 corrido sustancialmente como anteriormente para tener hidrólisis intestinal humana con relación al Profármaco Intestinal A de 36% (n=3, SD = 2.7), 44% (n=3, SD = 4.1), y 34% (n=1), respectivamente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención
25 son hidrolizados en el intestino humano.

Ensayo de Hidrólisis de Homogenado S-9 de Hígado Humano *in vitro*

Se obtuvieron fracciones S9 de hígado de Xenotech LLC (Lenexa, MO). El lote es de una combinación de dos
5 donadores, uno masculino y uno femenino. La fracción S9 de hígado es preparada y diluida usando un amortiguador de homogenización que consiste de 50mM de Tris, pH 7.4 a 4°C y 150mM de cloruro de potasio sin EDTA. Los profármacos son incubados en el homogenado de hígado por 2 horas a 37°C,
10 después de lo cual la concentración de metabolito activo es determinada por LC/MS/MS. La hidrólisis de Clopidogrel a Ácido Carboxílico de Clopidogrel es utilizada como un control positivo de ensayo.

Las incubaciones se conducen en un formato de 96
15 cavidades y todos los profármacos se corren por duplicado cada día. Las soluciones base de profármaco son preparadas en agua a una concentración de 1 mM. La fracción S9 de hígado humano es diluida a una concentración final de proteína de 0.5mg/ml en 100mM de amortiguador de PBS, pH 7.4.

20 Una alícuota de 200 µL de 0.5mg/mL de homogenado S-9 de hígado humano y 196 µL de 100 mM de amortiguador de PBS son colocadas en una placa de 96 cavidades en baño maría a 37°C. Usando un pipeteador de 96 cavidades, se transfieren 4 µL de la solución de profármaco de 1 mM en el homogenado.
25 Para asegurar que la hidrólisis no es debida a la

inestabilidad química, los profármacos son también incubados con amortiguador de PBS solo sin S-9 de hígado. Inmediatamente después de la adición del profármaco (tiempo cero) y después de 1 hora de incubación, se remueven 50 µL de muestra de la mezcla de incubación usando un pipeteador de 96 cavidades simultáneo desechable automatizado y se agregan directamente a 200 µL de metanol de solución de apagado que contiene 100 ng/mL de Estándar Interno. Las muestras son centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos a 10°C. El sobrenadante (200 uL) es transferido a una placa final de PCR de 96 cavidades y sellado para análisis por LC/MS/MS.

La cuantificación de LC/MS/MS del metabolito activo formado durante la incubación se realiza en un Sciex API 4000, Analyst versión 1.4.2, TurboIonSpray, ionización positiva, y Monitoreo de Reacción Seleccionada (SRM). La columna de HPLC usada es una Waters Atlantis® T3 (20 x 2.1 mm, 5µm) a temperatura ambiente con una velocidad de flujo de fase móvil de 1.0 mL/min. La fase móvil A es 1000:5 agua: ácido heptafluorobutérico y la fase móvil B es 1:1 metanol/ácido glacial acético. Se utiliza un gradiente de fase móvil partiendo a la relación de fase móvil A/B de 99.9/0.1 y terminando a 1/99.

Las concentraciones de metabolito activo hidrolizado en las mezclas de incubación se determinan de curvas estándares preparadas por replicas de dilución de dos

partes partiendo a 10 μ M en 100 mM de PBS pH 7.4 y subsecuentemente apagadas con solución de estándar interno-metanol idéntica a las muestras. Los promedios y desviaciones estándares son calculados usando Microsoft® Office Excel®
5 2007. Los valores finales son presentados como un porcentaje molar de metabolito activo formado con relación a la concentración de profármaco agregado. La hidrólisis de Clopidogrel a Ácido Carboxílico de Clopidogrel se usa como el control positivo y promedia 73.0% (n=27).

10 Los Ejemplos 8 y 9 son medidos en este ensayo corrido sustancialmente como anteriormente para tener hidrólisis de S9 en el hígado humano de 23% y 59.3%, respectivamente. Estos resultados demuestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son
15 hidrolizados en el hígado humano.

Los datos demuestran que los profármacos de aminoácido ejemplificados inhiben la absorción del GlySar del sustrato PepT1 tan buenos o mejores que cefadroxil y cefalexina (Zhang *et al.*, 2004. JPET 310:437-445), sugiriendo
20 potencial para la absorción oral humana vía el transportador PepT1. Además de la absorción del profármaco, después de entrar al cuerpo, la hidrólisis del profármaco para proporcionar el metabolito activo es esencial. Los presentes estudios de hidrólisis *in vitro* sugieren que los profármacos
25 de aminoácido ejemplificados pueden ser hidrolizados por el

intestino humano. La hidrólisis de los profármacos de diéster ejemplificados ocurre en homogenados de hígado humano sugiriendo el potencial para los profármacos de diéster ejemplificados para tener hidrólisis en humanos después de la
5 exposición oral. En conjunto estos datos indican el potencial para los profármacos de aminoácido ejemplificados y profármacos de diéster ejemplificados para ser hidrolizados en humanos para liberar el metabolito activo.

10 Ensayo de Farmacocinética

Ratas macho Sprague-Dawley ayunadas, son administradas intravenosamente con el Ejemplo 2 a 1 mg/kg o Ejemplo 5 por alimentación forzada oral a una dosis de 7.5 mg/kg (igual a 5 mg/kg de equivalentes molares del Ejemplo 2)
15 en un diseño cruzado estándar (N=3 con cada rata que recibe tanto dosis oral como intravenosa). Para administración intravenosa, el Ejemplo 2 es disuelto en agua y para la dosis oral el Ejemplo 5 es preparado en vehículo acuoso de hidroxietilcelulosa (1%), polisorbato 80 (0.25%) y antiespuma
20 1510-US (0.05%). Las cánulas son quirúrgicamente implantadas para facilitar la recolección serial de sangre. La sangre es recolectada en tubos EDTA durante un periodo de 0-24 horas post-dosificación, centrifugada y el plasma es almacenado congelado hasta el tiempo del análisis. Las muestras de
25 plasma son descongeladas, se transfieren alícuotas de 50 µL a

una placa de 96 cavidades, se agregan 50 μ L de solución de estándar interno, y las muestras se mezclan. Trescientos μ L de acetonitrilo se agregan entonces, las muestras son sometidas a vórtices por 3 minutos y centrifugadas. Una
5 alícuota de 300 μ L del sobrenadante es transferida a una placa separada y evaporada bajo nitrógeno a 40°C. El residuo es reconstituido en 100 μ L de 0.5 % de ácido heptafluorobutírico en agua, sometido a vórtices y centrifugado. Una alícuota de 20 μ L es subsecuentemente
10 analizada por LC/MS/MS usando un automuestreador Shimadzu y sistema HPLC de interfaz con un espectrómetro de masas AB Sciex 4000 bajo modo de turbo-rocío de ión positivo. Las transiciones de MS/MS son 283.2→44.2 amu para el profármaco del Ejemplo 5 y 212.1→103.1 amu para el activo del Ejemplo
15 2. Se utiliza una columna de HPLC de 5 micras, Atlantis T3, 50 x 2.1 mm, a una velocidad de flujo de fase móvil de 1.0 mL/minuto y una fase móvil binaria de (A) 0.2% de ácido fórmico en agua y (B) acetonitrilo-agua (1:1, v/v) y un gradiente de 2% B a 98%B durante 0.8 minutos. El tiempo de
20 retención del Ejemplo 2 es aproximadamente 0.53 minutos.

Son calculados parámetros de farmacocinética a partir de los datos de concentración de plasma usando Watson para Windows (Thermo Scientific). La biodisponibilidad oral relativa es determinada comparando el área bajo la curva de
25 tiempo de concentración de plasma (AUC) del activo del

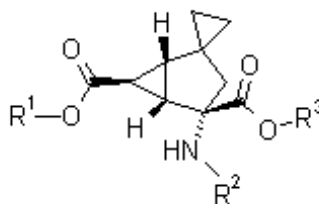
Ejemplo 2 después de la administración intravenosa con el AUC del metabolito activo después de la administración oral del profármaco del Ejemplo 5.

Un profármaco exitoso debe ser tanto bien absorbido
5 después de la administración oral como subsecuentemente
hidrolizado para liberar el metabolito activo en la
circulación sistémica. La biodisponibilidad relativa incluye
ambos parámetros comparando el AUC del metabolito activo
después de la administración oral del profármaco al AUC del
10 activo después de la administración intravenosa del compuesto
activo. En ratas macho, la biodisponibilidad relativa del
metabolito activo después de la administración oral del
profármaco del Ejemplo 5 como se mide en este ensayo corrido
sustancialmente como anteriormente es $60 \pm 14\%$ (media $\pm$
15 desviación estándar) demostrando que el profármaco del
Ejemplo 5 es tanto bien absorbido como extensivamente
hidrolizado para proporcionar el metabolito activo *in vivo*.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

5 1. A compuesto de fórmula I



10 Formula I

caracterizado porque

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

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

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

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

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

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

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

25 2. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque es ácido

(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

3. El compuesto de conformidad con la
5 Reivindicación 1, caracterizado porque es clorhidrato del ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

4. El compuesto de conformidad con la
Reivindicación 1, caracterizado porque es ácido
10 (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

5. El compuesto de conformidad con la
15 Reivindicación 1, caracterizado porque es clorhidrato del ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

6. El compuesto de conformidad con la
20 Reivindicación 1, caracterizado porque es dihidrato del ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

7. El Compuesto de conformidad con la
25 Reivindicación 1, caracterizado porque es ácido

(1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-aminopropanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico; 1,4-dioxano (1:0.5); clorhidrato.

5 8. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque es ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo
10 farmacéuticamente aceptable.

 9. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque es clorhidrato del ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[[(2*S*)-2-amino-4-metilsulfanil-butanoil]amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
15 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

 10. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque es ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[(2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
20 ciclopropano]-2,6-dicarboxílico, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

 11. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque es clorhidrato del ácido (1*S*, 2*S*, 5*R*, 6*S*)-2-[(2-aminoacetil)amino]espiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-
25

ciclopropano]-2,6-dicarboxílico.

12. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque es (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

13. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque es (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato de dibencilo; 1,4-dioxano; clorhidrato.

14. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque es bis[(2-fluorofenil)metil](1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

15. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque es bis[(2-fluorofenil)metil](1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminoespiro[biciclo[3.1.0]hexano-4,1'-ciclopropano]-2,6-dicarboxilato clorhidrato.

16. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el compuesto o sal de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-15 y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

17. El compuesto o sal de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-15, para uso en terapia.

18. El compuesto o sal de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-15, para uso en el
5 tratamiento de un trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste de dolor persistente, dolor neuropático, dolor inflamatorio crónico, y dolor visceral.

19. El compuesto o sal para uso de conformidad con la Reivindicación 18, en donde el trastorno neurológico es
10 dolor persistente.

20. El compuesto o sal para uso de conformidad con la Reivindicación 18, en donde el trastorno neurológico es dolor neuropático.

21. El compuesto o sal para uso de conformidad con
15 la Reivindicación 18, en donde el trastorno neurológico es dolor inflamatorio crónico.

22. El compuesto o sal para uso de conformidad con la Reivindicación 18, en donde el trastorno neurológico es dolor visceral.

20 23. El compuesto o sal de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-15, para uso en el tratamiento de un trastorno psiquiátrico seleccionado del grupo que consiste de esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno de ansiedad generalizada, y trastorno de estrés
25 post-traumático.

24. El compuesto o sal para uso de conformidad con la Reivindicación 23, en donde el trastorno psiquiátrico es esquizofrenia.

25. El compuesto o sal para uso de conformidad con
5 la Reivindicación 23, en donde el trastorno psiquiátrico es trastorno bipolar.

26. El compuesto o sal para uso de conformidad con la Reivindicación 23, en donde el trastorno psiquiátrico es trastorno de ansiedad generalizada.

10 27. El compuesto o sal para uso de conformidad con la Reivindicación 23, en donde el trastorno psiquiátrico es trastorno de estrés post-traumático.

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos agonistas
de mGlu2/3 útiles en el tratamiento de trastornos
5 neurológicos o psiquiátricos.

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

De la

AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

Véase forma PCT/ISA/220

PCT

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA
INTERNACIONAL
(Regla 43bis.1 del PCT)

Fecha de envío

(día/mes/año)

véase forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)

Referencia de archivo del solicitante o mandatario

Véase forma PCT/ISA/220

PARA ACCIÓN ADICIONAL

(véase párrafo 2 abajo)

No. de solicitud internacional:

PCT/US2013/023529

Fecha de presentación internacional

(día/mes/año)

29.01.2013

Fecha de Prioridad

(día/mes/año)

01.02.2012

Clasificación de Patente Internacional (IPC) o Clasificación nacional e IPC

INV. . . C07C271/18 C07C271/24 C07C229/50 C07C237/04 A61K31/16

A61K31/325 A61K31/195 A61K31/215 A61P25/18 A61P29/00 C07C323/25

Solicitante

ELI LILLY AND COMPANY

1. Esta opinión contiene las indicaciones que están relacionadas con los siguientes ítems:

- ☒ Cuadro No. I Base de la opinión
- ☐ Cuadro No. II Prioridad
- ☐ Cuadro No. III Ningún establecimiento del reporte con respecto a la novedad, paso de la invención, o aplicabilidad industrial
- ☐ Cuadro No. IV Carencia de unidad de la invención
- ☒ Cuadro No. V Establecimiento razonado bajo la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, paso de la invención o aplicabilidad industrial; las citas y explicaciones que soportan tal establecimiento o fundamento.
- ☐ Cuadro No. VI Ciertos documentos citados
- ☒ Cuadro No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
- ☒ Cuadro No. VIII Ciertas observaciones en la solicitud internacional.

2. CONTINUACIÓN DE LA TRAMITACIÓN

Si se hace una petición de examen preliminar internacional, esta opinión se considerará como una opinión escrita de la administración encargada del examen preliminar internacional ("IPEA") salvo en aquellos casos en los que el solicitante elija una Administración distinta a ésta y, la IPEA elegida haya notificado a la Oficina Internacional según lo previsto en la Regla 66.1bis(b) que las opiniones escritas de esta Administración encargada de la búsqueda internacional no serán consideradas como tales.

Si esta opinión es, como se indica más arriba, considerada como una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a que presente ante la IPEA una respuesta por escrito junto con modificaciones, en su caso, antes de la expiración del plazo de 3 meses a contar desde la fecha de envío del formulario PCT/ISA/220 o antes de la expiración del plazo de 22 meses a contar desde la fecha de prioridad, aplicándose el plazo que expire más tarde.

Para otras opciones, consultar el formulario PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de envío de la ISA:

Oficina Europea de Patentes
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Países Bajos
Tel. +31 70 340-2040
Fax: +31 70 340-3016

Fecha de terminación de esta
opinión

Véase forma
PCT/ISA/210

Oficial autorizado

Österle, Carmen

Teléfono No. +49 89 2399-8120

Cuadro No. I Bases de esta opinión

PCT/US2013/023529

5. Comentarios adicionales:

- Véase hoja separada**

Cuadro No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional

Se han notado los siguientes defectos en la forma o contenidos de la solicitud internacional:

véase hoja separada

Cuadro VIII Ciertas observaciones en la solicitud internacional

Se hacen las siguientes observaciones en la claridad de las reivindicaciones, descripción y figuras o en la cuestión si las reivindicaciones son completamente soportadas por la descripción:

Véase hoja separada

Respuesta al Punto V

**Declaración razonada con respecto a novedad, etapa inventiva o aplicabilidad industrial;
citas y explicaciones que soportan esta declaración**

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1 M.J. O'NEIL ET AL: "Recent developments in metabotropic glutamate receptors as novel drug targets", DRUGS OF THE FUTURE, vol. 35, no. 4, 1 Enero 2010 (2010-01-01), página 307, XP055059811, ISSN: 0377-8282, DOI: 10.1358/dof.2010.035.04.1487693
- D2 WO 03/104217 A2 (LILLY CO ELI [US]; MOHER ERIC DAVID [US]; MONN JAMES ALLEN [US]; PEDRE) 18 Diciembre 2003 (2003-12-18) citado en la solicitud
- D3 WO 2011/084437 A1 (LILLY CO ELI [US]; MONN JAMES ALLEN [US]; PRIETO LOURDES [ES]; TABOADA) 14 Julio 2011 (2011-07-14)
- D4 WO 97/17952 A1 (LILLY CO ELI [US]; DOMINGUEZ FERNANDEZ CARMEN [ES]; MONN JAMES A [US];) 22 Mayo 1997 (1997-05-22) citado en la solicitud

Reivindicados en la reivindicación 1 están compuestos de fórmula (I), Ninguno de los documentos citados en el Reporte de Búsqueda Internacional describe compuestos de fórmula (I).

D1-D4 describen diferentes agonistas mGlu2/3 que tienen una estructura biciclo[3.1.0]hexano básica. Ninguno de estos compuestos comprende una porción ciclopropilo unida a espiro para el anillo bicíclico.

Los compuestos de la reivindicación 1 por lo tanto pueden ser considerados nuevos sobre los compuestos de la técnica anterior (Artículo 33(2) del PCT).

Datos experimentales descritos en la presente solicitud muestran que los compuestos actualmente reivindicados son agonistas mGlu2/3. El problema técnico por lo tanto puede ser visto en la proporción de agonistas mGlu2/3 adicionales.

El problema es resuelto por los compuestos de fórmula (I) de la presente reivindicación 1.

No existe sugerencia en cualquiera de los documentos citados los cuales pueden sugerir que los derivados de biciclo[3.1.0]hexano que tienen una porción ciclopropilo unida a través de una unión espiro al anillo ciclopentilo del biciclo son agonistas mGlu2/3. La solución al problema técnica entonces no es obvia a partir de la técnica anterior y es considerada inventiva (Artículo 33(3) del PCT).

La materia objeto de las reivindicaciones 2-15 es dependiente de la materia objeto de la reivindicación 1 y por lo tanto puede ser considerada nueva e inventiva también.

La materia objeto de la reivindicación 16 se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) y por lo tanto puede ser considerada nueva e inventiva también.

Las reivindicaciones 17-27 del primero y segundo uso médico comprenden el uso del compuesto nuevo e inventivo de la reivindicación 1 y por lo tanto se consideran nuevos e inventivos.

La materia objeto de las reivindicaciones 1-27 se refieren a compuestos y su uso en el campo médico y se consideran industrialmente aplicables (Artículo 33(4) del PCT).

Respuesta al Punto VII

Ciertos defectos en la solicitud internacional

Contrariamente a los requerimientos de la Regla 5.1(a)(ii) del PCT, la técnica antecedente relevante descrita en D1 no es mencionada en la descripción, tampoco es este documento identificado en la presente.

Respuesta al Punto VIII

Ciertas observaciones en la solicitud internacional

En las páginas 1 y 2 se describe que los profármacos de los compuestos de fórmula (I) también son parte de la invención. La reivindicación 1 en contraste es limitada a compuestos de fórmula (I) y sus sales. Por lo tanto, la descripción sugiere que la materia objeto cae dentro de la invención reivindicada la cual no es cubierta por las reivindicaciones, proporcionando la materia objeto de las reivindicaciones no clara. Las referencias a los fármacos en la descripción deben por lo tanto ser eliminadas.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X19551	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2013/023529	International filing date (<i>day/month/year</i>) 29/01/2013	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 01/02/2012
Applicant ELI LILLY AND COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
- ☒ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

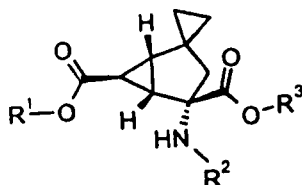
PCT/US2013/023529

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

ABSTRACT

of formula I

The present invention provides novel mGlu2/3 agonists useful in the treatment of
5 neurological or psychiatric disorders.



Formula I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/023529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07C271/18 C07C271/24 C07C229/50 C07C237/04 A61K31/16 A61K31/325 A61K31/195 A61K31/215 A61P25/18 A61P29/00 C07C323/25		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07C		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M.J. O'NEIL ET AL: "Recent developments in metabotropic glutamate receptors as novel drug targets", DRUGS OF THE FUTURE, vol. 35, no. 4, 1 January 2010 (2010-01-01), page 307, XP055059811, ISSN: 0377-8282, DOI: 10.1358/dof.2010.035.04.1487693 page 314 - page 316	1-27
A	----- WO 03/104217 A2 (LILLY CO ELI [US]; MOHER ERIC DAVID [US]; MONN JAMES ALLEN [US]; PEDRE) 18 December 2003 (2003-12-18) cited in the application the whole document ----- -/--	1-27
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 April 2013		Date of mailing of the international search report 02/05/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Österle, Carmen

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/023529

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/084437 A1 (LILLY CO ELI [US]; MONN JAMES ALLEN [US]; PRIETO LOURDES [ES]; TABOADA) 14 July 2011 (2011-07-14) the whole document	1-27
A	----- WO 97/17952 A1 (LILLY CO ELI [US]; DOMINGUEZ FERNANDEZ CARMEN [ES]; MONN JAMES A [US];) 22 May 1997 (1997-05-22) cited in the application the whole document -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/023529

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03104217	A2	18-12-2003	AR 040257 A1 23-03-2005
		AT 421526 T 15-02-2009	
		AU 2003232146 A1 22-12-2003	
		BR 0311558 A 27-04-2007	
		CA 2488167 A1 18-12-2003	
		CO 5631438 A2 28-04-2006	
		CR 7616 A 13-01-2005	
		DK 1517915 T3 16-03-2009	
		EA 200801711 A1 30-12-2008	
		EC SP085481 A 30-05-2008	
		EP 1517915 A2 30-03-2005	
		EP 1897550 A2 12-03-2008	
		ES 2319116 T3 04-05-2009	
		HK 1075259 A1 12-02-2010	
		HR P20041179 A2 30-06-2005	
		HR P20090058 A2 30-04-2009	
		JP 4342437 B2 14-10-2009	
		JP 2006503807 A 02-02-2006	
		JP 2008201779 A 04-09-2008	
		KR 20080058509 A 25-06-2008	
		MX PA04012518 A 17-02-2005	
		MY 146238 A 31-07-2012	
		NO 331780 B1 26-03-2012	
		NZ 536459 A 28-03-2008	
		NZ 556437 A 28-11-2008	
		NZ 564692 A 31-05-2009	
		PE 05552004 A1 30-08-2004	
		PT 1517915 E 09-04-2009	
		SI 1517915 T1 30-06-2009	
		US 2005222231 A1 06-10-2005	
		US 2008182889 A1 31-07-2008	
		US 2010113579 A1 06-05-2010	
		US 2011207672 A1 25-08-2011	
		US 2012172422 A1 05-07-2012	
		WO 03104217 A2 18-12-2003	
WO 2011084437	A1	14-07-2011	AR 079343 A1 18-01-2012
		AU 2010340039 A1 09-08-2012	
		CA 2784667 A1 14-07-2011	
		CN 102695701 A 26-09-2012	
		CR 20120322 A 10-07-2012	
		DO P2012000173 A 30-11-2012	
		EA 201290558 A1 28-12-2012	
		EP 2516406 A1 31-10-2012	
		KR 20120094056 A 23-08-2012	
		MA 33824 B1 03-12-2012	
		PE 16882012 A1 05-12-2012	
		SG 181836 A1 30-08-2012	
		TW 201144290 A 16-12-2011	
		US 2011152334 A1 23-06-2011	
		WO 2011084437 A1 14-07-2011	
WO 9717952	A1	22-05-1997	AU 703094 B2 18-03-1999
		BR 9611509 A 02-03-1999	
		CA 2237404 A1 22-05-1997	
		CN 1207678 A 10-02-1999	
		EP 0774454 A1 21-05-1997	
		JP 2000500754 A 25-01-2000	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/023529

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		W0 9717952 A1	22-05-1997

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Solicitud Internacional

PCT/US2013/023529

A. CLASIFICACION DEL ASUNTO RELACIONADOINV. C07C271/18 C07C271/24 C07C229/50 C07C237/04 A61K31/16 A61K31/325 A61K31/195 A61K31/215
A61P25/18 A61P29/00 C07C323/25

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o tanto la clasificación nacional como la IPC.

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación)

C07C

Documentación buscada diferente de la documentación mínima, al grado que estos documentos se incluyen en los campos buscados.

Base de datos, electrónica, consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, donde se puede practicar, términos de búsqueda usados)

EPO-Interno, Datos WPI, Datos CHEM ABS,

C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES

Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasos pertinentes	Pertinente para la reivindicación No.
A	M.J. O'NEIL ET AL: "Recent developments in metabotropic glutamate receptors as novel drug targets", DRUGS OF THE FUTURE, vol. 35, no. 4, 1 Enero 2010 (2010-01-01), página 307, XP055059811, ISSN: 0377-8282, DOI: 10.1358/dof.2010.035.04.1487693 página 314 - página 316	1-27
A	WO 03/104217 A2 (LILLY CO ELI [US]; MOHER ERIC DAVID [US]; MONN JAMES ALLEN [US]; PEDRE) 18 Diciembre 2003 (2003-12-18) citado en la solicitud el documento completo	1-27

☒ Documentos adicionales se listan en la continuación del cuadro C.☒ Los miembros de la familia de patentes se listan en el anexo

* Categoría especial de los documentos citados:

"A"	Documento que define el estado general de la técnica, que no se considera que es de pertinencia particular	"T"	Documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o la fecha de prioridad, y que no provoca conflicto con la solicitud, pero se cita para entender el principio o teoría que trata la invención
"E"	Documento anterior, pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional	"X"	Documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar nueva o no se puede considerar que comprende un etapa inventiva cuando el documento se toma solo
"L"	Documento que puede crear dudas de la reivindicación(es) de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra situación u otra razón especial (como se especifique)	"Y"	Documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar que comprende una etapa inventiva cuando el documento se combina con uno o más de estos documentos, estas combinaciones son obvias para una persona experta en la técnica
"O"	Documento que se refiere a una descripción oral, uso, exhibición u otro medio	"&"	Documento miembro de la familia de patentes
"P"	Documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero después de la fecha de prioridad reivindicada		

Fecha de la actual terminación de la búsqueda internacional

18 Abril 2013

Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional

02/05/2013

Nombre y dirección postal de la ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Österle, Carmen

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONALNo. Solicitud Internacional
PCT/US2013/023529**DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES (continuación)**

Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasajes pertinentes	Reivindicaciones Relevantes No.
A	WO 2011/084437 A1 (LILLY CO ELI [US]; MONN JAMES ALLEN [US]; PRIETO LOURDES [ES]; TABOADA) 14 Julio 2011 (2011-07-14) el documento completo	1-27
A	WO 97/17952 A1 (LILLY CO ELI [US]; DOMINGUEZ FERNANDEZ CARMEN [ES]; MONN JAMES A [US];) 22 Mayo 1997 (1997-05-22) citado en la solicitud el documento completo	1-27

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre los miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.:

PCT/US2013/023529

Documento de la patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembros de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 03104217 A2	18-12-2003	AR 040257 A1	23-03-2005
		AT 421526 T	15-02-2009
		AU 2003232146 A1	22-12-2003
		BR 0311558 A	27-04-2007
		CA 2488167 A1	18-12-2003
		CO 5631438 A2	28-04-2006
		CR 7616 A	13-01-2005
		DK 1517915 T3	16-03-2009
		EA 200801711 A1	30-12-2008
		EC SP085481 A	30-05-2008
		EP 1517915 A2	30-03-2005
		EP 1897550 A2	12-03-2008
		ES 2319116 T3	04-05-2009
		HK 1075259 A1	12-02-2010
		HR P20041179 A2	30-06-2005
		HR P20090058 A2	30-04-2009
		JP 4342437 B2	14-10-2009
		JP 2006503807 A	02-02-2006
		JP 2008201779 A	04-09-2008
		KR 20080058509 A	25-06-2008
		MX PA04012518 A	17-02-2005
		MY 146238 A	31-07-2012
		NO 331780 B1	26-03-2012
		NZ 536459 A	28-03-2008
		NZ 556437 A	28-11-2008
		NZ 564692 A	31-05-2009
		PE 05552004 A1	30-08-2004
		PT 1517915 E	09-04-2009
		SI 1517915 T1	30-06-2009
		US 2005222231 A1	06-10-2005
		US 2008182889 A1	31-07-2008
		US 2010113579 A1	06-05-2010
		US 2011207672 A1	25-08-2011
		US 2012172422 A1	05-07-2012
		WO 03104217 A2	18-12-2003
WO 2011084437 A1	14-07-2011	AR 079343 A1	18-01-2012
		AU 2010340039 A1	09-08-2012
		CA 2784667 A1	14-07-2011
		CN 102695701 A	26-09-2012
		CR 20120322 A	10-07-2012
		DO P2012000173 A	30-11-2012
		EA 201290558 A1	28-12-2012
		EP 2516406 A1	31-10-2012
		KR 20120094056 A	23-08-2012
		MA 33824 B1	03-12-2012
		PE 16882012 A1	05-12-2012
		SG 181836 A1	30-08-2012
		TW 201144290 A	16-12-2011
		US 2011152334 A1	23-06-2011
		WO 2011084437 A1	14-07-2011
WO 9717952 A1	22-05-1997	AU 703094 B2	18-03-1999
		BR 9611509 A	02-03-1999
		CA 2237404 A1	22-05-1997
		CN 1207678 A	10-02-1999
		EP 0774454 A1	21-05-1997
		JP 2000500754 A	25-01-2000

Información sobre los miembros de familia de patentes

PCT/US2013/023529

Forma PCT/ISA/210 (anexo de familia de patentes) (Abril 2005) página 2 de 2