

MODULADORES DEL RECEPTOR ESPIRO-LACTAMA N-METIL-D-ASPARTATO Y

USOS DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la
Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No.
62/338,767, presentada el 19 de mayo de 2016; los contenidos
de la cual se incorporan aquí como referencia en este
documento en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Un receptor de N-metil-d-aspartato ("NMDA") es un receptor
ionotrópico postsináptico que responde, entre otros, a los
aminoácidos excitadores glutamato y glicina y al compuesto
sintético NMDA. El receptor NMDA controla el flujo de iones
15 monovalentes y divalentes en la célula neural postsináptica a
través de un canal asociado al receptor (Foster et al, Nature
1987, 329: 395-396; Mayer et al, Trends in Pharmacol. Sci.
1990, 11:254-260). El receptor NMDA se ha implicado durante
el desarrollo en la especificación de la arquitectura
20 neuronal y la conectividad sináptica, y puede estar
involucrado en modificaciones sinápticas dependientes de la
experiencia. Además, se piensa que los receptores de NMDA
también están involucrados en la potenciación a largo plazo y
trastornos del sistema nervioso central.

El receptor NMDA desempeña un papel importante en la plasticidad sináptica que subyace en muchas funciones cognitivas superiores, como la adquisición de memoria, retención y aprendizaje, así como en ciertas vías cognitivas y en la percepción del dolor (Collingridge et al, The NMDA Receptor, Oxford University Press, 1994). Además, ciertas propiedades de los receptores NMDA sugieren que pueden estar involucrados en el procesamiento de la información en el cerebro que subyace a la conciencia misma.

El receptor NMDA ha atraído un interés particular, ya que parece estar involucrado en un amplio espectro de trastornos del CNS (sistema nervioso central, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, durante la isquemia cerebral causada por una apoplejía o una lesión traumática, las neuronas dañadas o privadas de oxígeno liberan cantidades excesivas del aminoácido glutamato excitante. Este exceso de glutamato se une a los receptores NMDA que abren sus canales iónicos activados por ligando; a su vez, la entrada de calcio produce un alto nivel de calcio intracelular que activa una cascada bioquímica que resulta en la degradación de proteínas y la muerte celular. Este fenómeno, conocido como excitotoxicidad, también se cree que es responsable del daño neurológico asociado con otros trastornos que van desde la hipoglucemia y el paro cardíaco hasta la epilepsia. Además, hay informes

preliminares que indican una participación similar en la neurodegeneración crónica de las afecciones Huntington, Parkinson y relacionadas con Parkinson, como la discinesia y la discinesia inducida por L-dopa y la enfermedad de Alzheimer. Se ha demostrado que la activación del receptor de NMDA es responsable de convulsiones posteriores a apoplejía, y, en ciertos modelos de epilepsia, la activación del receptor NMDA ha demostrado ser necesaria para la generación de convulsiones. La afectación neuropsiquiátrica del receptor de NMDA también se ha reconocido ya que el bloqueo del canal de Ca^{++} del receptor de NMDA por el animal anestesiado con PCP (fenciclidina) produce un estado psicótico en humanos similar a la esquizofrenia (revisado en Johnson, K. y Jones, S., 1990). Además, los receptores de NMDA también se han implicado en ciertos tipos de aprendizaje espacial.

Se cree que el receptor NMDA consiste en varias cadenas de proteínas incrustadas en la membrana postsináptica. Los primeros dos tipos de subunidades descubiertas hasta ahora forman una gran región extracelular, que probablemente contiene la mayoría de los sitios de enlace alostéricos, varias regiones transmembrana en bucle y plegadas para formar un poro o canal, que es permeable a Ca^{++} , y una región terminal carboxilo. La apertura y cierre del canal está regulado por la unión de varios ligandos a dominios (sitios

alostéricos) de la proteína que reside en la superficie extracelular. Se cree que la unión de los ligandos afecta un cambio conformacional en la estructura general de la proteína que finalmente se refleja en la apertura del canal, la
5 apertura parcial, el cierre parcial, o el cierre.

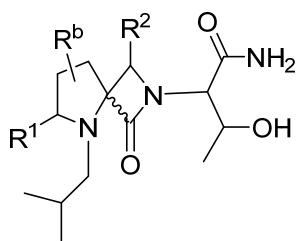
Los compuestos del receptor de NMDA pueden ejercer un efecto doble (agonista/antagonista) sobre el receptor de NMDA a través de los sitios alostéricos. Estos compuestos se denominan típicamente "agonistas parciales funcionales". En
10 presencia del ligando del sitio principal, un agonista parcial desplazará parte del ligando y por lo tanto disminuirá el flujo de Ca^{++} a través del receptor. En ausencia o disminución del nivel del ligando del sitio principal, el agonista parcial actúa para aumentar el flujo de Ca^{++} a través
15 del canal receptor.

Sigue existiendo la necesidad en la técnica de compuestos nuevos y más específicos/potentes que sean capaces de unirse al sitio de unión a glicina de los receptores de NMDA, y que proporcionen beneficios farmacéuticos. Además,
20 sigue existiendo una necesidad en las artes médicas de formas oralmente suministrables de dichos compuestos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La descripción actual proporciona compuestos que pueden ser moduladores de NMDA, por ejemplo, agonistas parciales de

NMDA. Más específicamente, la descripción actual proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



(I),

o un estereoisómero, un N-óxido, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R^b se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, hidroxilo, ciano, y alquilo C₁-C₆; R¹ se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, y alquilo C₁-C₆; y R² se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, y alquilo C₁-C₆.

También se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto descrito; y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal composición puede ser apropiada para administración oral o intravenosa a un paciente.

En algunas modalidades, los compuestos descritos en la presente se unen a subtipos del receptor NMDA. En algunas modalidades, los compuestos descritos en la presente se unen a un subtipo y no el otro.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste de autismo,

ansiedad, depresión, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención, trastornos con hiperactividad por déficit de atención (ADHD), esquizofrenia, un trastorno sicótico, un síntoma sicótico, aislamiento social, trastorno obsesivo-compulsivo, fobia, síndrome de estrés postraumático, trastorno del comportamiento, trastorno del control de los impulsos, trastorno por abuso de sustancias, trastorno del sueño, trastorno de la memoria, trastorno del aprendizaje, incontinencia urinaria, atrofia multisistémica, parálisis supra-nuclear progresiva, ataxia de Friedrich, síndrome de Down, síndrome X frágil, esclerosis tuberosa, atrofia olivopontocerebelosa, parálisis cerebral, neuritis óptica inducida por fármacos, retinopatía isquémica, retinopatía diabética, glaucoma, demencia, demencia por SIDA, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, espasticidad, mioclono, espasmo muscular, síndrome de Tourette, epilepsia, isquemia cerebral, apoplejía, tumor cerebral, lesión cerebral traumática, paro cardíaco, mielopatía, lesión de la médula espinal, neuropatía periférica, fibromialgia, dolor neuropático agudo y dolor neuropático crónico, en un paciente que necesita del mismo. Tales métodos pueden incluir administrar a un paciente una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto descrito, o una sal farmacéuticamente aceptable, un estereoisómero, un N-óxido,

y/o un hidrato del mismo.

En algunas modalidades, un método incluye tratar la depresión. Por ejemplo, la depresión puede incluir uno o más de trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, depresión
5 psicótica, depresión posparto, trastorno afectivo estacional, trastorno bipolar, trastorno del estado de ánimo, o depresión causada por una afección médica crónica. En ciertas modalidades, un método puede tratar la esquizofrenia. Dicha esquizofrenia puede ser una esquizofrenia de tipo paranoico,
10 una esquizofrenia de tipo desorganizado, esquizofrenia de tipo catatónico, esquizofrenia de tipo no diferenciado, esquizofrenia de tipo residual, depresión post-esquizofrénica o esquizofrenia simple.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La FIGURA 1 representa la media de datos de USV a 50 kHz para el compuesto A en un modelo de aprendizaje emocional positivo (PEL).

La FIGURA 2 representa la potenciación de la unión de [³H]MK-801 para los subtipos NMDAR2 de tipo silvestre para el
20 compuesto A.

La FIGURA 3 representa el perfil medio concentración-tiempo en plasma del compuesto A después de una dosis única intravenosa (2 mg/kg) y oral (10 mg/kg) en ratas Sprague Dawley macho.

La FIGURA 4 muestra el perfil medio concentración-tiempo en plasma, cerebro y CSF del compuesto A después de una única dosis oral (10 mg/kg) de administración en ratas Sprague Dawley macho.

5 La FIGURA 5 representa los datos medios de USV a 50 kHz para el compuesto B en un modelo PEL

La FIGURA 6 representa la potenciación de la unión de [3H]MK-801 para los subtipos NMDAR2 de tipo silvestre para el compuesto B.

10 La FIGURA 7 representa el perfil medio concentración-tiempo en plasma del compuesto B después de una administración intravenosa única (2 mg/kg) y oral (10 mg/kg) en ratas Sprague Dawley macho.

La FIGURA 8 representa los perfiles medios
15 concentración-tiempo en plasma, cerebro y CSF del compuesto B después de una única dosis oral (10 mg/kg) de administración en ratas Sprague Dawley macho.

La FIGURA 9 representa los resultados de los ensayos in vitro MN, Ames y hERG para el compuesto A.

20 La FIGURA 10 representa los resultados de los ensayos in vitro MN, Ames y hERG para el compuesto B.

La FIGURA 11 representa los déficits cognitivos inducidos por explosión invertida según lo medido por PEL para el Compuesto A.

La FIGURA 12 muestra los déficits cognitivos inducidos por explosión invertida según lo medido por PEL para el Compuesto B.

La FIGURA 13 muestra los resultados de la prueba de hipofagia (NIH) inducida por novedad en ratas para el Compuesto A.

La FIGURA 14 muestra los resultados de la prueba de hipofagia (NIH) inducida por novedad en ratas para el Compuesto B.

La FIGURA 15 representa los efectos analgésicos del Compuesto A.

La FIGURA 16 representa los efectos analgésicos del Compuesto B.

La FIGURA 17 muestra los resultados de la prueba de natación forzada de Porsolt para el Compuesto A.

La FIGURA 18 muestra los resultados de la prueba de natación forzada de Porsolt para el Compuesto B.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta descripción está dirigida generalmente a compuestos que son capaces de modular NMDA, por ejemplo, antagonistas de NMDA o agonistas parciales, y composiciones y/o métodos de uso de los compuestos descritos. Debe apreciarse que los compuestos descritos pueden modular otros objetivos proteicos y/o subtipos de receptores NMDA.

El término "alquilo," como se usa en la presente, se refiere a un hidrocarburo de cadena recta o ramificado saturado, tal como un grupo de cadena recta o ramificado de 1-6, 1-4, o 1-3 átomos de carbono, referidos en la presente
5 como alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₄, y alquilo C₁-C₃, respectivamente. Por ejemplo, "alquilo C₁-C₆" se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena recta o ramificado que contiene 1-6 átomos de carbono. Ejemplo de un grupo alquilo C₁-C₆ incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo,
10 butilo, pentilo, hexilo, isopropilo, isobutilo, **sec**-butilo, **tert**-butilo, isopentilo, y neopentilo. Los grupos alquilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 3-metil-2-butilo, 2,2-
15 dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, y hexilo.

20 El término "ciano," como se usa en la presente, se refiere al radical -CN.

Los términos "halo" o "halógeno," como se usan en la presente, se refieren a fluoro (F), cloro (Cl), bromo (Br), y/o yodo (I).

Los términos "hidroxi" e "hidroxilo," como se usan en la presente, se refieren al radical -OH.

El término "compuesto", como se usa en la presente, se refiere al propio compuesto y sus sales, hidratos, ésteres y N-óxidos farmacéuticamente aceptables, incluidos sus diversos estereoisómeros y sus formas etiquetadas isotópicamente, a menos que se entienda lo contrario en el contexto de la descripción o se limite expresamente a una forma particular del compuesto, es decir, el compuesto en sí, un específico estereoisómero y/o compuesto etiquetado isotópicamente, o una sal farmacéuticamente aceptable, un hidrato, un éster o un N-óxido de los mismos. Debe entenderse que un compuesto puede referirse a una sal farmacéuticamente aceptable, o un hidrato, un éster o un N-óxido de un estereoisómero del compuesto y/o un compuesto etiquetado isotópicamente.

El término "porción", como se usa en la presente, se refiere a una porción de un compuesto o molécula.

Los compuestos de la descripción pueden contener uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y, por lo tanto, pueden existir como estereoisómeros, tales como isómeros geométricos, y enantiómeros o diastereómeros. El término "estereoisómeros", cuando se usa en la presente, consiste en todos los isómeros geométricos, enantiómeros y/o diastereómeros del compuesto. Por ejemplo, cuando se muestra

un compuesto con uno/unos centro(s) quiral (es) específico(s), el compuesto representado sin dicha quiralidad en ese y otros centros quirales del compuesto está dentro del alcance de la descripción actual, es decir, el compuesto representado en dos dimensiones con los enlaces "planos" o "rectos" en lugar de en tres dimensiones, por ejemplo, con enlaces de cuña sólidos o discontinuados. Los compuestos estereoespecíficos se pueden designar con los símbolos "R" o "S", según la configuración de los sustituyentes alrededor del átomo de carbono estereogénico. La descripción actual abarca todos los diversos estereoisómeros de estos compuestos y mezclas de los mismos. Las mezclas de enantiómeros o diastereómeros pueden designarse como "(±)" en la nomenclatura, pero un experto en la materia reconocerá que una estructura puede denotar un centro quiral implícitamente. Se entiende que las representaciones gráficas de estructuras químicas, por ejemplo, estructuras químicas genéricas, abarcan todas las formas estereoisoméricas de los compuestos especificados, a menos que se indique lo contrario.

Como se discute en la presente, los compuestos de la presente descripción pueden tener una pluralidad de centros quirales. Cada centro quiral puede ser independientemente R, S o cualquier mezcla de R y S. Por ejemplo, en algunas modalidades, un centro quiral puede tener una relación R:S de

entre alrededor de 100:0 y alrededor de 50:50 ("racemato"),
entre alrededor de 100:0 y alrededor de 75:25, entre
alrededor de 100:0 y alrededor de 85:15, entre alrededor de
100:0 y alrededor de 90:10, entre alrededor de 100:0 y
5 alrededor de 95:5, entre alrededor de 100:0 y alrededor de
98: 2, entre alrededor de 100:0 y alrededor de 99:1, entre
alrededor de 0:100 y 50:50, entre alrededor de 0:100 y
alrededor de 25: 75, entre alrededor de 0: 100 y alrededor de
15: 85, entre alrededor de 0:100 y alrededor de 10:90, entre
10 alrededor de 0:100 y alrededor de 5: 95, entre alrededor de
0:100 y alrededor de 2:98, entre alrededor de 0:100 y
alrededor de 1:99, entre alrededor de 75:25 y 25:75, o
alrededor de 50:50. Las formulaciones de los compuestos
descritos que comprenden una proporción mayor de uno o más
15 isómeros (es decir, R y/o S) pueden poseer características
terapéuticas mejoradas en relación con las formulaciones
racémicas de un compuesto o mezcla de compuestos descritos.

Los enantiómeros y diastereómeros individuales de los
compuestos de la presente descripción se pueden preparar
20 sintéticamente a partir de materiales de partida disponibles
comercialmente que contienen centros asimétricos o
estereogénicos, o mediante la preparación de mezclas
racémicas seguidas por métodos de resolución bien conocidos
por los expertos en la técnica. Estos métodos de resolución

se ejemplifican mediante (1) unión de una mezcla de enantiómeros a un auxiliar quiral, separación de la mezcla resultante de diastereómeros por recristalización o cromatografía y liberación del producto ópticamente puro del auxiliar, (2) formación de sal empleando un agente de resolución ópticamente activo, (3) separación directa de la mezcla de enantiómeros ópticos en columnas cromatográficas líquidas quirales, o (4) resolución cinética utilizando reactivos químicos o enzimáticos estereoselectivos. Las mezclas racémicas también pueden resolverse en sus enantiómeros componentes mediante métodos bien conocidos, como la cromatografía de gases en fase quiral o la cristalización del compuesto en un solvente quiral. Las síntesis estereoselectivas, una reacción química o enzimática en la que un solo reactivo forma una mezcla desigual de estereoisómeros durante la creación de un nuevo estereocentro o durante la transformación de uno preexistente, son bien conocidas en la técnica. Las síntesis estereoselectivas abarcan tanto las transformaciones enantio como las diastereoselectivas. Ver, por ejemplo, Carreira y Kvaerno, *Classics in Stereoselective Synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2009.

Los isómeros geométricos, resultantes de la disposición de sustituyentes alrededor de un doble enlace carbono-carbono

o disposición de sustituyentes alrededor de un anillo cicloalquilo o heterocíclico, también pueden existir en los compuestos de la descripción actual. El símbolo --- denota un enlace que puede ser un enlace simple, doble o triple como se describe en la presente. Los sustituyentes alrededor de un doble enlace carbono-carbono se designan como que están en la configuración "Z" o "E", donde los términos "Z" y "E" se usan de acuerdo con los estándares de la IUPAC. A menos que se especifique lo contrario, las estructuras que representan

5

dobles enlaces abarcan los isómeros "E" y "Z".

10

Los sustituyentes alrededor de un doble enlace carbono-carbono pueden ser referidos como "cis" o "trans", donde "cis" representa sustituyentes en el mismo lado del doble enlace y "trans" representa sustituyentes en los lados opuestos del doble enlace. La disposición de los sustituyentes alrededor de un anillo carbocíclico también se puede designar como "cis" o "trans". El término "cis" representa sustituyentes en el mismo lado del plano del anillo y el término "trans" representa los sustituyentes en los lados opuestos del plano del anillo. Las mezclas de compuestos en los que los sustituyentes se disponen tanto en los lados iguales como en los lados opuestos del plano del anillo se designan "cis/trans".

15

20

La descripción también abarca compuestos etiquetados con

isótopos que son idénticos a los compuestos citados en la presente, excepto que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o el número de masas que se encuentra normalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos descritos en la presente incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como ^2H ("D"), ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , y ^{36}Cl , respectivamente. Por ejemplo, un compuesto descrito en la presente puede tener uno o más átomos de H reemplazados con deuterio.

Ciertos compuestos etiquetados con isótopos (por ejemplo, los etiquetados con ^3H y ^{14}C) pueden ser útiles en ensayos de distribución de tejidos de compuestos y/o sustratos. Los isótopos tritiados (es decir, ^3H) y carbono-14 (*es decir*, ^{14}C) pueden ser particularmente preferidos por su facilidad de preparación y capacidad de detección. Además, la sustitución con isótopos más pesados como el deuterio (es decir, ^2H) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica (por ejemplo, vida media incrementada in vivo o requisitos de dosificación reducida) y, por lo tanto, puede preferirse en algunas circunstancias. Los compuestos etiquetados con

isótopos generalmente se pueden preparar siguiendo los procedimientos análogos a los descritos en la presente, por ejemplo, en la sección de Ejemplos, sustituyendo un reactivo etiquetado con isótopos por un reactivo no etiquetado con isótopos.

Las frases "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable", como se usan en la presente, se refieren a compuestos, entidades moleculares, composiciones, materiales y/o formas de dosificación que no producen una reacción adversa, alérgica o de otro tipo cuando se administran a un animal, o un humano, según corresponda. Para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza que exigen los estándares de la Oficina de Biología de la FDA.

Las frases "portador farmacéuticamente aceptable" y "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usan en la presente, se refieren a todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, que sean compatibles con los productos farmacéuticos. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir solución salina amortiguada con fosfato, agua, emulsiones (por ejemplo, como emulsiones de aceite/agua o agua/aceite), y varios tipos de

agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservadores.

La frase "composición farmacéutica", como se usa en la presente, se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto como se describe en la presente formulado junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otros compuestos activos que proporcionan funciones terapéuticas suplementarias, adicionales o mejoradas.

Los términos "individuo", "paciente" y "sujeto", como se usan en la presente, se utilizan indistintamente e incluye cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, caballos o primates, y más preferiblemente, humanos. Los términos "individuo", "paciente" y "sujeto", como se usan en la presente, se utilizan indistintamente e incluye cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, caballos o primates, y más preferiblemente, humanos. Los compuestos descritos en la descripción pueden administrarse a un mamífero, como un ser humano, pero también pueden administrarse a otros mamíferos, como un animal que necesita tratamiento veterinario, por ejemplo, animales domésticos

(por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, conejillos de indias y similares). El mamífero tratado en los
5 métodos descritos en la descripción es preferiblemente un mamífero en el que se desea un tratamiento, por ejemplo, de dolor o depresión.

El término "tratar", como se usa en la presente, incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminuir, reducir, modular,
10 mejorar o eliminar, que resulte en la mejora de la condición, la enfermedad, el trastorno y similares, incluido uno o más síntomas de la misma. El tratamiento puede ser curar, mejorar o, al menos parcialmente, mejorar el trastorno.

El término "trastorno" se refiere y se usa de manera
15 intercambiable con los términos "enfermedad", "afección" o "padecimiento", a menos que se indique lo contrario.

El término "modulación", como se usa en la presente, se refiere e incluye antagonismo (por ejemplo, inhibición), agonismo, antagonismo parcial y/o agonismo parcial.

20 Las frases "cantidad farmacéuticamente efectiva" y "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usa en la presente, se refieren a la cantidad de un compuesto (por ejemplo, un compuesto descrito) que provocará la respuesta médica o biológica de un tejido, sistema, animal o humano que

está siendo buscado por el investigador, veterinario, médico u otro clínico. Los compuestos descritos en la descripción se pueden administrar en cantidades terapéuticamente eficaces para tratar una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto puede ser la cantidad requerida para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, tal como una cantidad que da como resultado la disminución de un síntoma de una enfermedad o trastorno como la depresión.

La frase "sal o sales farmacéuticamente aceptables", como se usa en la presente, se refiere a sal(es) de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en los compuestos de la descripción y/o usarse en las composiciones de la descripción. Una sal farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, ácido o base) de un compuesto de la presente descripción, tras la administración a un paciente, es capaz de proporcionar un compuesto de esta invención o un metabolito activo o residuo del mismo.

Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que son de naturaleza básica son capaces de formar una amplia variedad de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que se pueden usar para preparar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de tales compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones

farmacológicamente aceptables, incluidos, entre otros, malato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, silicato, gluconato, glucaronato, sacarato, forraje, ácido benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, sales 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que son de naturaleza ácida son capaces de formar sales de bases con diversos cationes farmacológicamente aceptables. Los ejemplos de tales sales incluyen sales de metales alcalinos o alcalinotérreos y, particularmente, sales de calcio, magnesio, sodio, litio, zinc, potasio y hierro. Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que incluyen una porción básico o ácido también pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con varios aminoácidos. Los compuestos de la descripción pueden contener grupos tanto ácidos como básicos; por ejemplo, un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. En tal caso, el compuesto puede existir como una sal de adición de ácido, un zwitterión o una sal de base.

Los compuestos descritos en la presente pueden existir

en una forma solvatada así como en una forma no solvatada con solventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares, y se pretende que la descripción abarque tanto formas solvatadas como no solvatadas. En algunas
5 modalidades, el compuesto es amorfo. En ciertas modalidades, el compuesto es un polimorfo sencillo. En varias modalidades, el compuesto es una mezcla de polimorfos. En modalidades particulares, el compuesto es una forma cristalina.

El término "profármaco", como se usa en la presente, se
10 refiere a compuestos que se transforman in vivo para producir un compuesto descrito o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto. La transformación puede ocurrir por varios mecanismos (como la esterasa, amidasa, fosfatasa, metabolismo oxidativo y/o reductor) en
15 varios lugares (como en el lumen intestinal o al transitar hacia el intestino, la sangre o el hígado). Los profármacos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Rautio, Kumpulainen, *et al.*, Nature Reviews Drug Discovery 2008, 7, 255). Por ejemplo, si un compuesto descrito en la presente o
20 una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto contiene un grupo funcional ácido carboxílico, un profármaco puede ser un éster formado por la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo ácido carboxílico con un grupo tal como alquilo(C₁-C₈), alcanoiloximetilo(C₂-C₁₂), 1-

(alcanoiloxi)etilo que tiene de 4 a 9 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcanoiloxi)-etilo que tiene de 5 a 10 átomos de carbono, alcoxycarboniloximetilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, 1-(alcoxycarboniloxi)etilo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcoxycarboniloxi)etilo que tiene de 5 a 8 átomos de carbono, N-(alcoxycarbonil)aminometilo que tiene de 3 a 9 átomos de carbono, 1-(N-(alcoxycarbonil)amino)etilo que tiene de 4 a 10 átomos de carbono, 3-ftalidilo, 4-crotonolactonilo, gamma-butirolacton-4-ilo, di-N,N-alquilamino(C₁-C₂)alquilo(C₂-C₃) (tal como β-dimetilaminoetil), carbamoil-alquilo(C₁-C₂), N,N-dialquilcarbamoil(C₁-C₂)-alquilo(C₁-C₂), piperidino-alquilo(C₂-C₃), pirrolidino-alquilo(C₂-C₃), o morfolino-alquilo(C₂-C₃).

Similarmente, si un compuesto descrito aquí contiene un grupo funcional alcohol, se puede formar un profármaco reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo alcohol con un grupo tal como alcanoiloximetilo(C₁-C₆), 1-(alcanoiloxi(C₁-C₆))etilo, 1-metil-1-(alcanoiloxi(C₁-C₆))etilo alcoxycarboniloximetilo(C₁-C₆), N-alcoxycarbonilaminometilo(C₁-C₆), succinoilo, alcanoilo(C₁-C₆), α-aminoalcanoilo(C₁-C₄), arilacilo y α-aminoacilo, o α-aminoacil-α-aminoacilo, donde cada grupo α-aminoacilo es independientemente seleccionado de los L-aminoácidos naturales, P(O)(OH)₂, -P(O)(Oalquilo(C₁-C₆))₂ o glicosilo (el

radical resultante de la eliminación de un grupo hidroxilo de la forma hemiacetal de un carbohidrato).

Si un compuesto descrito en la presente incorpora un grupo funcional amina, se puede formar un profármaco, por ejemplo, mediante la creación de una amida o carbamato, un derivado de N-aciloxialquilo, un derivado de (oxodioxolenil) metilo, una base de N-Mannich, imina o enamina. Además, una amina secundaria puede ser escindida metabólicamente para generar una amina primaria bioactiva, o una amina terciaria puede escindirse metabólicamente para generar una amina primaria o secundaria bioactiva. Ver, por ejemplo, Simplício, *et al.*, *Molecules* 2008, **13**, 519 y sus referencias.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que se refiere esta descripción.

A lo largo de la descripción, cuando las composiciones y los kits se describen como si tuvieran, incluyeran o comprendieran componentes específicos, o cuando los procesos y métodos se describieran como si incluyeran, tuvieran o comprendieran etapas específicas, se contempla que, además, existen composiciones y kits de la presente descripción que consisten esencialmente de, o consisten de, los componentes citados, y que hay procesos y métodos de acuerdo con la

presente descripción que consisten esencialmente en, o consisten de, las etapas de procesamiento citadas.

En la solicitud, cuando se dice que un elemento o componente se incluye y/o se selecciona de una lista de elementos o componentes enumerados, debe entenderse que el
5 elemento o componente puede ser cualquiera de los elementos o componentes enumerados, o el elemento o componente puede seleccionarse de un grupo que consiste en dos o más de los elementos o componentes enumerados.

Además, debe entenderse que los elementos y/o características de una composición o un método descrito en la presente se pueden combinar de varias maneras sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente descripción, ya sea explícita o implícita en la presente. Por ejemplo, cuando se
15 hace referencia a un compuesto particular, ese compuesto se puede usar en varias modalidades de composiciones de la presente descripción y/o en métodos de la presente descripción, a menos que se entienda lo contrario en el contexto. En otras palabras, dentro de esta solicitud, las modalidades se han descrito y representado de una manera que
20 permite escribir y dibujar una aplicación clara y concisa, pero se pretende y se apreciará que las modalidades pueden combinarse o separarse de diversas maneras sin separarse de las presentes enseñanzas y revelaciones. Por ejemplo, se

apreciará que todas las características descritas y representadas en la presente puedan ser aplicables a todos los aspectos de las descripciones descritas y representadas en la presente.

5 Los artículos "un" y "uno/una" se usan en esta descripción para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo, a menos que el contexto sea inapropiado. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

10 El término "y/o" se usa en esta descripción para significar "y" u "o" a menos que se indique lo contrario.

 Debe entenderse que la expresión "al menos uno de" incluye individualmente cada uno de los objetos recitados después de la expresión y las diversas combinaciones de dos o
15 más de los objetos recitados a menos que se entienda lo contrario desde el contexto y el uso. Debe entenderse que la expresión "y/o" en relación con tres o más objetos recitados tienen el mismo significado, a menos que se entienda lo contrario en el contexto.

20 El uso del término "incluir", "incluye", "incluyendo", "tener", "tiene", "teniendo", "contener", "contiene" o "conteniendo", incluidos sus equivalentes gramaticales, debe entenderse por lo general, como abierto y no limitativo, por ejemplo, sin excluir elementos o etapas no reconocidos

adicionales, a menos que se especifique lo contrario o se entienda específicamente en el contexto.

Cuando el uso del término "alrededor de" está antes del valor cuantitativo, la descripción actual también incluye el
5 propio valor cuantitativo específico, a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se usa en la presente, el término "alrededor de" se refiere a una variación de $\pm 10\%$ del valor nominal a menos que se indique o infiera lo contrario.

10 Cuando se proporciona un porcentaje con respecto a una cantidad de un componente o material en una composición, el porcentaje debe entenderse como un porcentaje basado en el peso, a menos que se indique o se entienda lo contrario en el contexto.

15 Cuando se proporciona un peso molecular y no un valor absoluto, por ejemplo, de un polímero, debe entenderse que el peso molecular es un peso molecular promedio, a menos que se indique o se entienda lo contrario en el contexto.

Debe entenderse que el orden de las etapas o el orden
20 para realizar ciertas acciones es irrelevante siempre que la presente descripción permanezca operativa. Además, dos o más etapas o acciones pueden llevarse a cabo simultáneamente.

En varios lugares de la presente especificación, los sustituyentes se describen en grupos o en intervalos. Se

pretende específicamente que la descripción incluya cada subcombinación individual de los miembros de dichos grupos e intervalos. Por ejemplo, el término "alquilo C₁₋₆" está destinado específicamente a describir individualmente alquilo

5 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₁-C₆, C₁-C₅, C₁-C₄, C₁-C₃, C₁-C₂, C₂-C₆, C₂-C₅, C₂-C₄, C₂-C₃, C₃-C₆, C₃-C₅, C₃-C₄, C₄-C₆, C₄-C₅, y C₅-C₆. A modo de otros ejemplos, un número entero en el intervalo de 0 a 40 está destinado específicamente a describir individualmente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

10 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, y 40, y un entero en el intervalo de 1 a 20 está destinado específicamente a describir individualmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, y 20. Los ejemplos

15 adicionales incluyen que la frase "opcionalmente sustituido con 1-5 sustituyentes" está destinada específicamente a describir individualmente un grupo químico que puede incluir 0, 1, 2, 3, 4, 5, 0-5, 0-4, 0-3, 0-2, 0-1, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-5, 2-4, 2-3, 3-5, 3-4, y 4-5 sustituyentes.

20 El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o el lenguaje ejemplar en la presente, por ejemplo, "tal como" o "incluyendo", pretende simplemente ilustrar mejor la presente descripción y no plantea una limitación en el alcance de la descripción a menos que se indique lo contrario. Ningún

lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la presente descripción.

Además, si una variable no está acompañada por una
5 definición, entonces la variable se define como se encuentra en otra parte de la descripción, a menos que se entienda que es diferente del contexto. Además, la definición de cada variable y/o sustituyente, alquilo C_1-C_6 , R^2 , R^b , w y similares, cuando ocurre más de una vez en cualquier
10 estructura o compuesto, puede estar independientemente de su definición en otro lugar en la misma estructura o compuesto.

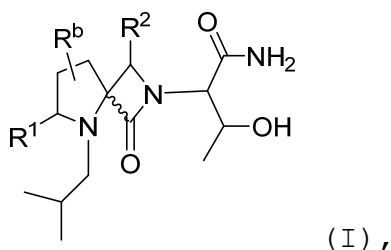
Las definiciones de las variables y/o sustituyentes en las fórmulas y/o compuestos de la presente abarcan múltiples grupos químicos. La presente descripción incluye modalidades
15 en las que, por ejemplo, i) la definición de una variable y/o sustituyente es un solo grupo químico seleccionado de entre los grupos químicos expuestos en la presente, ii) la definición es una colección de dos o más de los grupos químicos seleccionados de entre los establecidos en la
20 presente, y iii) el compuesto se define por una combinación de variables y/o sustituyentes en los que las variables y/o sustituyentes se definen por (i) o (ii).

Varios aspectos de la descripción se exponen en la presente bajo encabezados y/o en secciones para mayor

claridad; sin embargo, se entiende que todos los aspectos, modalidades o características de la descripción descrita en una sección particular no deben limitarse a esa sección en particular, sino que pueden aplicarse a cualquier aspecto, modalidad o característica de la descripción actual.

Compuestos

Los compuestos descritos incluyen un compuesto que tiene la fórmula:



o un estereoisómero, un N-óxido, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R^b se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, hidroxilo, ciano, y alquilo C_1-C_6 ; R^1 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, y alquilo C_1-C_6 ; y R^2 se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, y alquilo C_1-C .

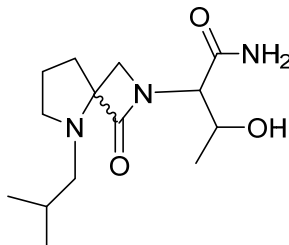
En algunas modalidades, R^1 es hidrógeno. En ciertas modalidades, R^1 es alquilo C_1-C_6 , por ejemplo, metilo (CH_3).

En algunas modalidades, R^2 es hidrógeno. En ciertas modalidades, R^2 es alquilo C_1-C_6 , por ejemplo, metilo (CH_3).

En algunas modalidades (incluyendo cualquiera de las

modalidades descritas en la presente), R^b es hidrógeno. En algunas modalidades, R^b es alquilo C_1 - C_6 , por ejemplo, metilo (CH_3).

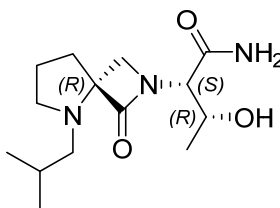
En varias modalidades, un compuesto descrito tiene la
5 fórmula:



o un estereoisómero, un N-óxido, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

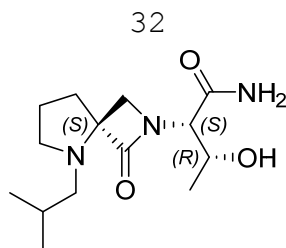
En algunas modalidades, el compuesto se selecciona de
10 los compuestos delineados en los Ejemplos.

En ciertas modalidades, un compuesto descrito tiene la fórmula:



o un N-óxido y/o una sal farmacéuticamente aceptable del
15 mismo.

En ciertas modalidades, un compuesto descrito tiene la fórmula:



o un N-óxido y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos descritos pueden proporcionar una
 5 apertura de canal de cationes eficiente en el receptor de NMDA, por ejemplo pueden enlazarse o asociarse con el sitio de glutamato del receptor NMDA para ayudar a abrir el canal catiónico. Los compuestos descritos pueden usarse para regular (activar o desactivar) el receptor de NMDA a través
 10 de la acción como un agonista.

Los compuestos descritos en la presente, en algunas modalidades, se unen a subtipos de receptores de NMDA específicos. Por ejemplo, un compuesto descrito puede unirse a un subtipo de NMDA y no a otro. En ciertas modalidades, un
 15 compuesto descrito puede unirse a uno, o más de un subtipo de NMDA, y/o por ejemplo puede tener una actividad de enlace sustancialmente menor (o no sustancial) a ciertos otros subtipos de NMDA. Por ejemplo, en algunas modalidades, un compuesto descrito (por ejemplo, el compuesto A) se une a
 20 NR2A sin sustancialmente enlace a NR2D. En algunas modalidades, un compuesto descrito (por ejemplo, compuesto B) se enlaza a NR2B y NR2D con un enlace sustancialmente menor a

NR2A y NR2C.

Los compuestos como se describen en la presente pueden ser agonistas parciales del receptor NMDA del sitio de la glicina. Un agonista parcial como se usa en este contexto se
5 entenderá que significa que a una concentración baja, el análogo actúa como un agonista y en una concentración alta, el análogo actúa como un antagonista. El enlace a la glicina no es inhibido por el glutamato o por los inhibidores competitivos del glutamato, y tampoco enlaza en el mismo
10 sitio que el glutamato en el receptor de NMDA. Existe un segundo sitio de enlace separado para la glicina en el receptor NMDA. El canal iónico activado por ligando del receptor NMDA está, por lo tanto, bajo el control de al menos estos dos sitios alostéricos distintos. Los compuestos
15 descritos pueden ser capaces de unirse o asociarse con el sitio de enlace a glicina del receptor de NMDA. En algunas modalidades, los compuestos descritos pueden poseer una potencia que es 10 veces mayor que la actividad de los agonistas parciales de los receptores de NMDA existentes.

20 Los compuestos descritos pueden exhibir un alto índice terapéutico. El índice terapéutico, como se usa en la presente, se refiere a la proporción de la dosis que produce una toxicidad en el 50% de la población (es decir, TD_{50}) a la dosis mínima efectiva para el 50% de la población (es decir,

ED₅₀). Así, el índice terapéutico = (TD₅₀):(ED₅₀). En algunas modalidades, un compuesto descrito puede tener un índice terapéutico de al menos alrededor de 10:1, al menos alrededor de 50:1, al menos alrededor de 100:1, al menos alrededor de 200:1, al menos alrededor de 500:1, o al menos al menos unos 1000:1.

Composiciones

En otros aspectos, se proporcionan formulaciones y composiciones que comprenden un compuesto descrito y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, una formulación incluye una mezcla racémica de uno o más de los compuestos descritos.

Las formulaciones se pueden preparar en cualquiera de una variedad de formas para su uso. A modo de ejemplo, y no de limitación, los compuestos pueden prepararse en una formulación adecuada para administración oral, inyección subcutánea u otros métodos para administrar un agente activo a un paciente, que puede necesitarlo, tal como se conoce en la industria farmacéutica. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden ser adecuadas para la entrega al ojo. Los métodos relacionados pueden incluir administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto descrito o una composición farmacéutica que incluya un compuesto descrito a un paciente que lo necesite, por

ejemplo, a un ojo del paciente, donde la administración puede ser tópica, subconjuntiva, subtenonial, intravítrea, retrobulbarmente, peribulbarmente, intracomeralmente, y/o sistémicamente.

5 Las cantidades de un compuesto descrito como se describe en la presente en una formulación pueden variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta
10 terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular
15 composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos
20 mamíferos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

La especificación para las formas unitarias de

dosificación depende de (a) las características únicas del compuesto seleccionado y el efecto terapéutico particular que se debe alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de composición de dicho compuesto activo para el
5 tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada
10 adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede
15 mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes
20 tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los compuestos pueden administrarse en una formulación de liberación prolongada, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto

5 contra la liberación rápida, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como etilenvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno,

10 poliortoésteres, ácido poliláctico y polilácticos, copolímeros poliglicólicos (PLG). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto en la

15 cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un portador estéril que contiene un medio

20 de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más

cualquier ingrediente deseado adicional de una solución del mismo filtrada previamente estéril.

De acuerdo con un aspecto alternativo, un compuesto puede formularse con uno o más compuestos adicionales que
5 mejoran la solubilidad del compuesto.

Métodos

Se proporcionan métodos para tratar una afección en un paciente que lo necesita mediante la administración de una cantidad o dosis terapéuticamente efectiva de un compuesto
10 descrito en la presente. En algunas modalidades, la condición puede ser una condición mental. Por ejemplo, una enfermedad mental puede ser tratada. En otro aspecto, una afección del sistema nervioso puede ser tratada. Por ejemplo, se puede tratar una afección que afecta el sistema nervioso
15 central, el sistema nervioso periférico y/o el ojo. En algunas modalidades, las enfermedades neurodegenerativas pueden tratarse.

En algunas modalidades, los métodos incluyen administrar un compuesto para tratar a pacientes que padecen autismo,
20 ansiedad, depresión, trastorno bipolar, trastorno por déficit de atención, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), esquizofrenia, un trastorno psicótico, un síntoma psicótico, síndrome de abstinencia social, trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), fobia, síndrome de

estrés postraumático, un trastorno de conducta, un trastorno de control de impulsos, un trastorno de abuso de sustancias (por ejemplo, un síntoma de abstinencia, adicción a los opiáceos, adicción a la nicotina y adición de etanol), un

5 trastorno del sueño, un trastorno de la memoria (por ejemplo, un déficit, pérdida o capacidad reducida para crear nuevos recuerdos), un trastorno del aprendizaje, incontinencia urinaria, atrofia de sistemas múltiples, parálisis supranuclear progresiva, ataxia de Friedrich, síndrome de Down,

10 síndrome de X frágil, esclerosis tuberosa, atrofia olivopontocerebelosa, parálisis cerebral, neuritis óptica inducida por fármacos, retinopatía isquémica, retinopatía diabética, glaucoma, demencia, demencia por SIDA, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, espasticidad, mioclonos,

15 espasmo muscular, espasmo infantil, síndrome de Tourette, epilepsia, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular, tumor cerebral, lesión cerebral traumática, paro cardíaco, mielopatía, lesión de la médula espinal, neuropatía periférica, dolor neuropático agudo y dolor neuropático

20 crónico.

En algunas modalidades, se proporcionan los métodos para tratar un trastorno de la memoria asociado con el envejecimiento, la esquizofrenia, los trastornos especiales de aprendizaje, convulsiones, convulsiones posteriores a

apoplejía, isquemia cerebral, hipoglucemia, paro cardíaco, epilepsia, demencia con cuerpos de Lewy, migraña, demencia por SIDA, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, etapa temprana de enfermedad de Alzheimer y enfermedad de
5 Alzheimer.

En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para tratar la esquizofrenia. Por ejemplo, la esquizofrenia de tipo paranoide, la esquizofrenia de tipo desorganizado (es decir, la esquizofrenia hebrefrénica), la esquizofrenia de
10 tipo catatónico, la esquizofrenia de tipo indiferenciado, la esquizofrenia de tipo residual, la depresión post-esquizofrénica y la esquizofrenia simple pueden tratarse utilizando los métodos y las descripciones descritas anteriormente. Los trastornos psicóticos tales como
15 trastornos esquizoafectivos, trastornos delirantes, trastornos psicóticos breves, trastornos psicóticos compartidos y trastornos psicóticos con delirios o alucinaciones también pueden tratarse utilizando las composiciones descritas en la presente.

20 La esquizofrenia paranoide puede caracterizarse cuando hay delirios o alucinaciones auditivas, pero no en el trastorno del pensamiento, el comportamiento desorganizado o el aplanamiento afectivo. Los delirios pueden ser persecutorios y/o grandiosos, pero además de estos, también

pueden estar presentes otros temas como los celos, la religiosidad o la somatización. La esquizofrenia de tipo desorganizado puede caracterizarse cuando el trastorno del pensamiento y el afecto plano están presentes juntos. La esquizofrenia de tipo catatónico se puede caracterizar donde el paciente puede estar casi inmóvil o exhibir un movimiento agitado y sin sentido. Los síntomas pueden incluir estupor catatónico y flexibilidad cerosa. La esquizofrenia de tipo indiferenciado se puede caracterizar cuando hay síntomas psicóticos, pero no se han cumplido los criterios para los tipos paranoico, desorganizado o catatónico. La esquizofrenia de tipo residual se puede caracterizar cuando los síntomas positivos están presentes solo en una intensidad baja. La depresión post-esquizofrénica se puede caracterizar cuando surge un episodio depresivo como consecuencia de una enfermedad esquizofrénica en la que aún pueden presentarse algunos síntomas esquizofrénicos de bajo nivel. La esquizofrenia simple puede caracterizarse por un desarrollo insidioso y progresivo de síntomas negativos prominentes sin antecedentes de episodios psicóticos.

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para tratar los síntomas psicóticos que pueden estar presentes en otros trastornos mentales, que incluyen, entre otros, el trastorno bipolar, el trastorno límite de la personalidad, la

intoxicación por fármacos y la psicosis inducida por fármacos. En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para tratar los delirios (por ejemplo, "no extraños") que pueden estar presentes, por ejemplo, en el trastorno
5 delirante.

En diversas modalidades, se proporcionan métodos para tratar la abstinencia social en condiciones que incluyen, entre otras, el trastorno de ansiedad social, el trastorno de personalidad por evitación y el trastorno de personalidad
10 esquizotípica.

En algunas modalidades, la descripción proporciona métodos para tratar un trastorno del desarrollo neurológico relacionado con la disfunción sináptica en un paciente que lo necesita, donde los métodos generalmente incluyen administrar
15 al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito, o una composición farmacéutica que incluye un compuesto descrito. el trastorno del desarrollo neurológico relacionado con la disfunción sináptica puede ser el síndrome de Rett, también conocido como hiperamonemia
20 cerebroatrófica, síndrome de duplicación de MECP2 (por ejemplo, un trastorno MECP2), síndrome de CDKL5, síndrome de X frágil (por ejemplo, un trastorno de FMR1), esclerosis tuberosa (por ejemplo, , un trastorno de TSC1 y/o un trastorno de TSC2), neurofibromatosis (por ejemplo, un

trastorno de NF1), síndrome de Angelman (por ejemplo, un trastorno de UBE3A), el síndrome de tumor de hamartoma PTEN, síndrome de Phelan-McDermid (por ejemplo, un trastorno de SHANK3) o espasmos infantiles. En modalidades particulares, el trastorno del desarrollo neurológico puede ser causado por mutaciones en la neuroligina (por ejemplo, un trastorno NLGN3 y/o un trastorno NLGN2) y/o la neurexina (por ejemplo, un trastorno NRXN1).

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para tratar el dolor neuropático. El dolor neuropático puede ser agudo o crónico. En algunos casos, el dolor neuropático puede asociarse con una afección como herpes, VIH, lesión nerviosa traumática, accidente cerebrovascular, postisquemia, dolor de espalda crónico, neuralgia posherpética, fibromialgia, distrofia simpática refleja, síndrome de dolor regional complejo, espina lesión del cordón umbilical, ciática, dolor del miembro fantasma, neuropatía diabética como la neuropatía periférica diabética (DPN, por sus siglas en inglés) y dolor neuropático inducido por quimioterapia para el cáncer. También se proporcionan métodos para mejorar el alivio del dolor y para proporcionar analgesia a un paciente.

En varias modalidades, los métodos de la descripción incluyen un método para tratar el autismo y/o un trastorno del espectro autista en una necesidad del paciente, que

comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto descrito al paciente. En algunas modalidades, se proporciona un método para reducir los síntomas de autismo en un paciente que lo necesita, en el que el método incluye administrar una
5 cantidad efectiva de un compuesto descrito al paciente. Por ejemplo, tras la administración, el compuesto puede disminuir la incidencia de uno o más síntomas de autismo, como la evitación de contacto con los ojos, falta de socialización, déficit de atención, mal humor, hiperactividad, sensibilidad
10 anormal al sonido, habla inapropiada, sueño interrumpido, y perseverancia. Dicha incidencia disminuida puede medirse en relación con la incidencia en el individuo no tratado o en un individuo no tratado.

También se proporciona en la presente un método para
15 modular una expresión del gen diana del autismo en una célula que comprende poner en contacto una célula con una cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente. La expresión del gen autista puede seleccionarse, por ejemplo, entre ABAT, APOE, CHRNA4, GABRA5, GFAP, GRIN2A, PDYN y PENK.
20 En ciertas modalidades, se proporciona un método para modular la plasticidad sináptica en un paciente que padece un trastorno relacionado con la plasticidad sináptica, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un compuesto.

En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar la enfermedad de Alzheimer, o por ejemplo, el tratamiento de la pérdida de memoria que, por ejemplo, acompaña a la enfermedad de Alzheimer en una etapa temprana, en un paciente que lo necesite, que comprende administrar un compuesto. En la presente también se proporciona un método para modular una proteína amiloide de Alzheimer (por ejemplo, péptido beta amiloide, por ejemplo, la isoforma $A\beta_{1-42}$), in-vitro o in-vivo (por ejemplo, en una célula) que comprende poner en contacto la proteína con una cantidad efectiva de un compuesto. Por ejemplo, en algunas modalidades, un compuesto puede bloquear la capacidad de dicha proteína amiloide para inhibir la potenciación a largo plazo en cortes de hipocampo, así como la muerte de células neuronales apoptóticas. En algunas modalidades, un compuesto descrito puede proporcionar propiedades neuroprotectoras a un paciente con Alzheimer que lo necesite, por ejemplo, un efecto terapéutico en la etapa posterior de la muerte de células neuronales asociada con el Alzheimer.

En ciertas modalidades, los métodos descritos incluyen el tratamiento de una psicosis o un pseudobulbar ("PBA") inducida por otra afección, como una apoplejía, esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig), esclerosis múltiple, lesión cerebral traumática, enfermedad

de Alzheimer, demencia y/o enfermedad de Parkinson. Tales métodos, como con otros métodos de la descripción, incluyen la administración de una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto descrito a un paciente en necesidad del mismo.

En varias modalidades, se proporciona un método para tratar la depresión que comprende administrar un compuesto descrito en la presente. En algunas modalidades, el tratamiento puede aliviar la depresión o un síntoma de depresión sin afectar el comportamiento o la coordinación motora y sin inducir o promover la actividad convulsiva. Las condiciones de depresión ejemplares que se espera que se traten de acuerdo con este aspecto incluyen, entre otras, trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, depresión psicótica, depresión posparto, síndrome premenstrual, trastorno disfórico premenstrual, trastorno afectivo estacional (SAD, por sus siglas en inglés), trastorno bipolar (o trastorno depresivo maníaco), trastorno del estado de ánimo y depresiones causadas por afecciones médicas crónicas como cáncer o dolor crónico, quimioterapia, estrés crónico y trastornos por estrés postraumático. Además, los pacientes que padecen cualquier tipo de depresión a menudo experimentan ansiedad. Varios síntomas asociados con la ansiedad incluyen miedo, pánico, palpitaciones del corazón, dificultad para

respirar, fatiga, náuseas y dolores de cabeza, entre otros. La ansiedad o cualquiera de los síntomas de la misma se pueden tratar administrando un compuesto como se describe en la presente.

5 También se proporcionan en la presente métodos para tratar una afección en pacientes resistentes al tratamiento, por ejemplo, pacientes que padecen una afección del sistema nervioso central o mental que no responde y/o no ha respondido a cursos adecuados de al menos uno, o al menos
10 dos, de otros compuestos o terapéuticos. Por ejemplo, aquí se proporciona un método para tratar la depresión en un paciente resistente al tratamiento, que comprende a) identificar opcionalmente al paciente como resistente al tratamiento y b) administrar una dosis efectiva de un compuesto a dicho
15 paciente.

En algunas modalidades, un compuesto descrito en la presente puede usarse para el cuidado agudo de un paciente. Por ejemplo, se puede administrar un compuesto a un paciente para tratar un episodio particular (por ejemplo, un episodio
20 grave) de una afección descrita en la presente.

En la presente también se incluyen terapias de combinación que comprenden un compuesto descrito en combinación con uno o más agentes activos. Por ejemplo, un compuesto descrito puede combinarse con uno o más

antidepresivos, tales como antidepresivos tricíclicos, MAO-Is, SSRIs, e inhibidores de ingesta dobles y triples y/o fármacos ansiolíticos. Los fármacos ejemplares que se pueden usar en combinación con un compuesto incluyen Anafranil, Adapin, Aventyl, Elavil, Norpramin, Pamelor, Pertofrane, Sinequan, Surmontil, Tofranil, Vivactil, Parnate, Nardil, Marplan, Lexapro, Luvox, Paxil, Prozac, Zoloft, Wellbutrin, Effexor, Remeron, Cymbalta, Desyrel (trazodona) y Ludiomill. En otros ejemplos, un compuesto puede combinarse con un medicamento antipsicótico. Entre los ejemplos no limitantes de antipsicóticos se incluyen butirofenonas, fenotiazinas, tioxantenos, clozapina, olanzapina, risperidona, quetiapina, ziprasidona, amisulprida, asenapina, paliperidona, iloperidona, zotepina, sertindol, lurasidipina y aripipona. Debe entenderse que las combinaciones de un compuesto y una o más de las terapias anteriores se pueden usar para el tratamiento de cualquier afección adecuada y no se limitan a usar como antidepresivos o antipsicóticos.

EJEMPLOS

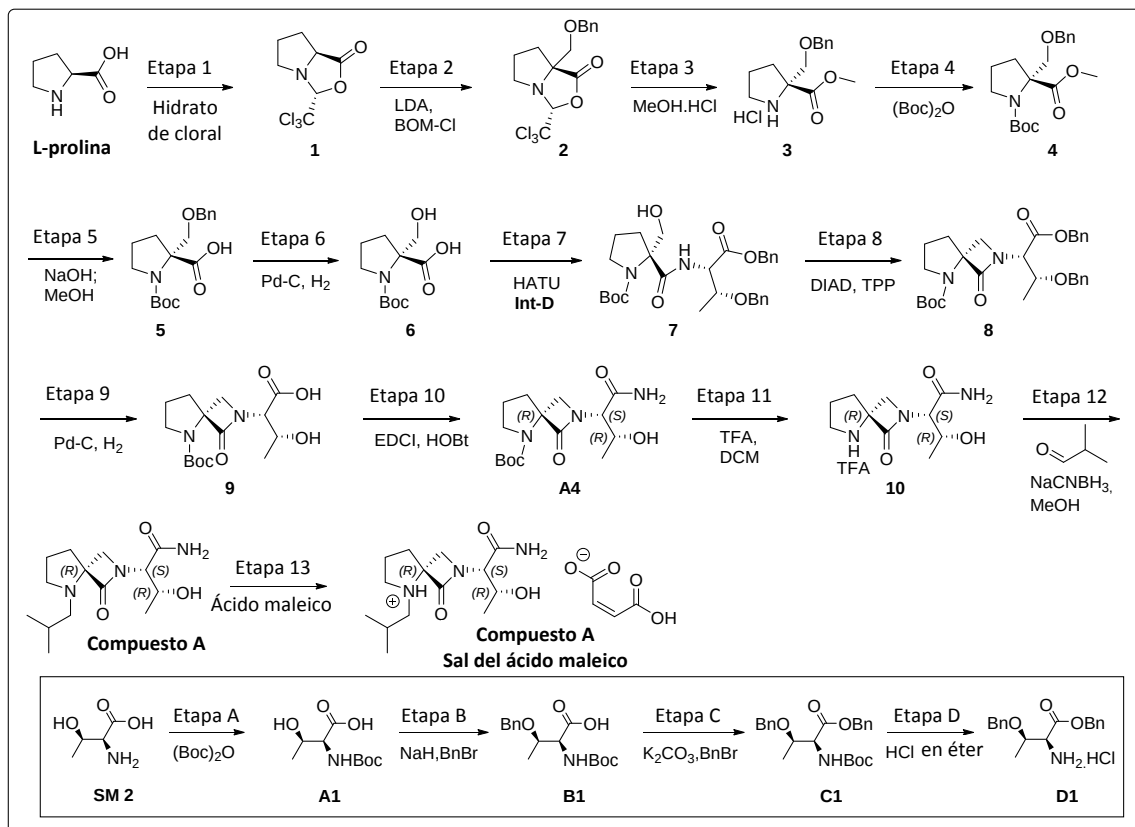
Los siguientes ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la descripción.

Las siguientes abreviaturas se pueden usar en la presente y tienen las definiciones indicadas: Ac es acetilo

(-C(O)CH₃), el SIDA es un síndrome de inmunodeficiencia adquirida, Boc y BOC son *tert*-butoxicarbonilo, Boc₂O es di-*tert*-butilo dicarbonato, Bn es bencilo, BOM-Cl es cloruro de benciloximetilo, CAN es nitrato de amonio cérico, Cbz es carboxibencilo, DCM es diclorometano, DIAD es diisopropil azodicarboxilato, DIPEA es *N,N*-diisopropiletilamina, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, EDC y EDCI son clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, ESI es ionización por electrorrocío, EtOAc es acetato de etilo, Gly es glicina, h es hora, HATU es 2-(7-aza-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato, VIH es el virus de inmunodeficiencia humana, HOBT es hidroxibenzotriazol, HPLC es una cromatografía líquida de alto rendimiento, LCMS es una cromatografía líquida/espectrometría de masas, LDA es litio diisopropilamida, LiHMDS es hexametildisilazano de litio, MTBE es éter metilo *tert*-butilo, NMDAR es receptor de N-metil-d-aspartato, NMP es N-metil-2-pirrolidona, RMN es resonancia magnética nuclear, Pd/C es paladio sobre carbono, PMB es *para*-metoxibencilo, TA es temperatura ambiente (por ejemplo, de alrededor de 20°C a alrededor de 25°C), TBS y TBDMS son *tert*-butildimetilsililo, TEA es trietilamina, CCD es cromatografía de capa delgada, TFA es ácido trifluoroacético, THF es tetrahidrofurano, TMS es

trimetilsililo, TMSCN es cianuro de trimetilsililo, y TPP es trifenilfosfina.

Ejemplo 1 - Síntesis del Compuesto A y Sal del Ácido Maleico del Compuesto A



5

Síntesis de (3R,7aS)-3-(triclorometil)tetrahydro-1H,3H-pirrolo[1,2-c]oxazol-1-ona (1):

A una suspensión de L-prolina (2.0 kg, 0.017mol) en cloroformo (50 L) se agregó hidrato de cloral (5.7 kg, 0.034 mol) a TA. La mezcla de reacción se calentó hasta 60°C bajo un aparato Dean-Stark invertido y se recolectó el agua obtenida. Después de 16 h, se evaporaron los volátiles bajo presión reducida. Se lavó el crudo sólido con etanol frío, se

filtra y se seca para proporcionar el compuesto 1 (2.2 kg, 57 %)
como un sólido blanco. ^1H -RMN: (500 MHz, DMSO- d_6): δ 5.82 (s, 1H), 4.11-4.08 (m, 1H), 3.33-3.27 (m, 2H), 3.19-3.14 (m, 1H), 2.15-2.10 (m, 1H), 1.96-1.91 (m, 1H), 1.80-1.74 (m, 1H),
5 1.65-1.58 (m, 1H).

Síntesis de (3R,7aR)-7a-((benciloxi)metil)-3-(triclorometil)tetrahidro-1H,3H-pirrólo[1,2-c]oxazol-1-ona (2):

A una solución de diisopropilamina (221.2 mL, 1.533 mol)
10 en THF (870 mL) se agregó n-BuLi (1.6 M en hexano) (958.5 mL, 1.533 mol) gota a gota a -78°C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de completar la adición, la temperatura de la mezcla de reacción se elevó hasta -20°C y se agita durante 1 h. De nuevo enfriando hasta -78°C , el compuesto 1 (250 g, 1.022
15 mol) en THF (1 L) se agregó y se agita durante 30 min. Entonces se agregó éter bencilclorometilo (208 mL, 1.329 mol) gota a gota y la agitación continúa durante 1 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se apagó con agua enfriada en hielo (100 mL) y se
20 extrae con Et_2O (2 x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentra bajo presión reducida para obtener el compuesto crudo que se purificó por cromatografía de columna al eluir con EtOAc al 10%/n-hexano para obtener el compuesto

2 (220 g, crudo) como un jarabe espeso café. ^1H -RMN: (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.42–7.26 (m, 5H), 5.60 (s, 1H), 4.59–4.53 (d, 2H), 3.67–3.61 (m, 2H), 3.37–3.33 (m, 1H), 3.31–3.10 (m, 1H), 2.12–1.99 (m, 2H), 1.87–1.75 (m, 2H); LCMS (ESI): m/z 363.9 $[\text{M}^++1]$.

Síntesis de clorhidrato de metil (R)-2-((benciloxi)metil)pirrolidin-2-carboxilato (3):

A una solución del compuesto 2 (400 g, 1.096 mol) en metanol (1 L) se agregó HCl 2N en MeOH (1.64 L, 3.29 mol) a TA y se agita a 80°C durante 16 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), los volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El crudo obtenido se lavó con hexanos (3x750 mL) y se seca bajo presión reducida para proporcionar el compuesto 3 (358 g, crudo) como un jarabe espeso rojizo.

^1H -RMN: (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.40 (br s, 1H), 7.40–7.21 (m, 5H), 4.64–4.50 (d, 2H), 4.49–4.3 (d, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.33–3.22 (m, 2H), 2.22–2.15 (s, 1H), 2.02–1.9 (m, 2H), 1.95–1.83 (m, 1H).

Síntesis de (R)-2-((benciloxi)metil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(tert-butil) 2-metilo (4):

A una suspensión agitada del compuesto 3 (313 g, crudo 1.096 mol) en DCM (2.19 L) se agregó Et_3N (458.4 mL, 3.288 mol) gota a gota a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno y se agita durante 10 min. Entonces se agregó anhídrido Boc (358.4 g,

1.644 mol) gota a gota a 0°C. La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 16 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la reacción se diluyó con agua (2x1 L) y se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 500 mL). La capa orgánica
 5 combinada se lavó con ácido cítrico al 10% (pH~7) y solución de salmuera (1 L). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentra bajo presión reducida para proporcionar el compuesto crudo que se purificó por cromatografía de columna al eluir con EtOAc al 20%/n-hexano para obtener el compuesto
 10 4 (215 g, 56%) como un jarabe espeso incoloro. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.37-7.26 (m, 5H), 4.56-4.48 (m, 2H), 4.03-3.87 (dd, 1H), 3.69-3.67 (d, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.53-3.47 (m, 1H), 3.33-3.30 (m, 1H), 2.27-2.20 (m, 1H), 2.03-1.89 (m, 2H), 1.88-1.79 (m, 1H), 1.46-1.24 (2s, 9H); LCMS (ESI): *m/z* 250.1
 15 [(M⁺+1)-Boc].

Síntesis de ácido (R)-2-((benciloxi)metil)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-2-carboxílico (5):

A una solución del compuesto 4 (215 g, 0.616 mol) en MeOH:THF:H₂O (3 L, 5:5:3) se agregó NaOH (73.9 g, 1.848 mol)
 20 y se agita a TA durante 10 min. La mezcla de reacción se calentó hasta 80°C y se agita durante 16 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se llevó hasta TA, los volátiles se evaporaron. El material crudo se diluyó con agua (1 L) y se extrae con Et₂O

(2 x 500 mL). La capa acuosa separada se hizo ácida usando soluciones de HCl 2 N (pH~3) y se extrae con DCM (2 x 750 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentran para proporcionar el compuesto 5 (170 g, 82.4%) como un sólido blanco opaco. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.66 (br s, 1H), 7.36-7.26 (m, 5H), 4.54-4.47 (m, 2H), 4.05-3.90 (dd, 1H), 3.88-3.63 (d, 1H), 3.63-3.44 (m, 1H), 3.34-3.27 (m, 1H), 2.27-2.01 (m, 1H), 2.02-1.8 (m, 2H), 1.79-1.76 (m, 1H), 1.17-1.14 (2s, 9H); LCMS (ESI): *m/z* 235.1 [(M⁺+1)-Boc].

Síntesis de ácido (R)-1-(tert-butoxicarbonil)-2-(hidroximetil)pirrolidin-2-carboxílico (6):

A una solución agitada del compuesto 5 (170 g, 0.507 mol) en CH₃OH (1 L) se agregó 50% de Pd-C al 10% húmedo (68 g) a TA y se agita durante 16 h bajo atmósfera de H₂. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y la almohadilla se lavó con CH₃OH (1 L). El filtrado obtenido se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto 6 (110 g, 88 %) como un sólido blanco. ¹H-RMN: (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.66 (br s, 1H), 3.96-3.83 (dd, 1H), 3.63-3.60 (m, 1H), 3.49-3.46 (m, 1H), 3.34-3.25 (m, 2H), 2.30-2.15 (m, 1H), 1.95-1.72 (m, 3H), 1.38-1.33 (2s, 9H); LCMS (ESI): *m/z* 244 [M⁺-1]; HPLC Quiral: 95.88%.

Síntesis de (R)-2-(((2S,3R)-1,3-bis(benciloxi)-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-carboxilato de tert-butilo (7):

A una solución agitada del compuesto 6 (110 g, 0.448 mol) en DCM (20 mL) enfriada hasta 0°C bajo atmósfera de N₂ se agregaron diisopropiletilamina (206 mL, 1.12 mol), el Intermediario D1 (150 g, 0.448 mol) y HATU (204 g, 0.537 mol). La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 4 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se diluyó con DCM (1 L) y se lava con agua (2x500 mL), solución de ácido cítrico al 10% (500 mL) y solución de salmuera (500 mL). La capa orgánica se secó sobre anhidro Na₂SO₄ y se concentra bajo presión reducida para proporcionar el compuesto crudo que se purificó por cromatografía de columna al eluir con 30% EtOAc/*n*-hexano para obtener el compuesto 7 (143 g, 60%) como un jarabe espeso incoloro. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.20-8.12 (d, 1H), 7.29-7.18 (m, 10H), 5.83-5.59 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.50-4.44 (m, 2H), 4.30-4.26 (m, 1H), 4.08-4.00 (m, 2H), 3.42-3.40 (m, 2H), 3.39-3.29 (m, 1H), 2.19-2.08 (m, 1H), 1.96-1.87 (m, 1H), 1.68-1.63 (m, 2H), 1.23-1.15 (2s, 9H), 1.14-1.13 (d, 3H); LCMS (m/z): 525.2 [M⁺-1]; HPLC: 76.2 %; HPLC Quiral: 69.47 %.

Síntesis de (R)-2-((2S,3R)-1,3-bis(benciloxi)-1-oxobutan-2-

il)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-carboxilato de tert-butilo (8):

A una solución de trifenilfosfina (161.4 g, 0.612 mol) en THF (430 mL) se agregó DIAD (123.8 g, 0.612 mol) gota a gota a TA bajo atmósfera de nitrógeno y se agita durante 15 minutos. A esto, el compuesto 7 (215 g, 0.408 mol) en solución de THF (860 mL) se agregó gota a gota y se permite reposar a TA durante 4 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), los volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El material crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice eluyendo con EtOAc al 20%/hexano para proporcionar el compuesto 8 (180 g, mezcla con subproducto DIAD) como jarabe amarillo. ^1H -RMN: (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.31-7.18 (m, 10H), 5.18-5.10 (m, 2H), 4.61-4.54 (m, 2H), 4.27-4.18 (m, 2H), 3.78-3.77 (d, 1H), 3.45-3.43 (d, 1H), 3.35-3.31 (d, 1H), 3.27-3.23 (m, 1H), 2.03-1.98 (m, 2H), 1.78-1.76 (m, 2H), 1.39-1.31 (2s, 9H), 1.23-1.22 (d, 3H) (no se capturaron picos del subproducto DIAD); LCMS (ESI): m/z 509.4 [M^++1].

Síntesis de ácido (2S,3R)-2-((R)-5-(tert-butoxicarbonil)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)-3-hidroxibutanoico (9):

Una solución del compuesto 8 (85 g, 0.167 mol) en metanol (850 mL) se desgasificó bajo atmósfera de N_2 . Entonces se agrega 50% de Pd-C al 10% húmedo (40 g) a TA y se

agita durante 24 h bajo atmósfera de H₂. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El crudo obtenido sólido se diluyó con Et₂O (1 L) y se agita vigorosamente a TA durante 1 h. El material sólido resultante se filtró completamente y se seca para proporcionar el compuesto 9 (75 g, 68%) como un sólido blanco. ¹H-RMN: (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.86 (br s, 1H), 5.24 (br s 1H), 4.06-4.00 (m, 2H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.51-3.50 (m, 1H), 3.43-3.34 (m, 1H), 3.31-3.23 (m, 1H), 2.15-2.09 (m, 2H), 1.82-1.78 (m, 2H), 1.39-1.31 (2s, 9H), 1.10-1.08 (d, 3H); LCMS (m/z): 329.1 [M⁺+1]; HPLC: 93.97%.

Síntesis de (R)-2-((2S,3R)-1-amino-3-hidroxi-1-oxobutan-2-il)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-carboxilato de tert-butilo (A4):

A una solución agitada del compuesto 9 (150g, 0.457 mol) en CH₂Cl₂ (2 L) a 0°C se agregaron diisopropiletilamina (176.85g, 1.37 mol), NH₄Cl (48.8 g, 0.914 mol) y HATU (208.3 g 0.548 mol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 12 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se diluyó con agua (2x750 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 1 L). La capa orgánica combinada se lavó con solución de HCl 2N y solución de cloruro de sodio saturada (750 mL). La

capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentra bajo presión reducida. El compuesto crudo se purificó por cromatografía de columna el compuesto puro se eluyó con MeOH al 3%/CH₂Cl₂. El material obtenido se diluyó con DCM (2 L) y se lava con ácido cítrico saturado (5 x 500 mL), lavado con bicarbonato saturado seguido por lavado con salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 . El material se trituroó con el éter (2 x 500 mL) para proporcionar el compuesto A4 (80 g, 53%) como un sólido blanco. ¹H-RMN: (400 MHz, D₂O): δ 4.36-4.21 (m, 2H), 4.03-3.98 (m, 1H), 3.76-3.67 (m, 1H), 3.56-3.37 (m, 2H), 2.32-2.23 (m, 2H), 1.97-1.93 (m, 2H), 1.49-1.47 (2s, 9H), 1.33-1.32 (d, 3H); LCMS (ESI): *m/z* 328.3 [M⁺+1]; HPLC: 99.30%; HPLC Quiral: 98.97 %; SOR (c=1, CH₃OH): -11.08.

Síntesis de (2S,3R)-3-hidroxi-2-((R)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (10):

A una solución agitada del compuesto A4 (10 g, 0.030 mol) en CH₂Cl₂ (50 mL) se agregó TFA (24 mL, 0.3058 mol) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 4 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), los volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El material de jarabe espeso obtenido se lavó con éter (2 x 100 mL) y hexano (1 x 100 mL) se seca bajo vacío para proporcionar el compuesto 10 (3.5 g, sal de TFA) como un jarabe espeso, que se tomó para la siguiente

etapa. El RM crudo fue antecedido como tal sin purificación.

LCMS (ESI): m/z 228.1 $[M^++1]$.

Síntesis de (2S,3R)-3-hidroxi-2-((R)-5-isobutil-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (Compuesto A):

5 A una solución agitada del compuesto 10 (10 g, sal de
TFA 0.028 mol) en metanol (50 mL) se agregaron
isobutiraldehído (10 mL, 0.115 mmol) seguido por AcOH (12 mL)
a TA bajo atmósfera de nitrógeno y se agita durante 10
minutos. Luego, se agregó NaCNBH_3 (7.2 g, 11.5 mmol) en
10 porciones y la agitación continúa durante 16 h. Después del
consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de
reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (10 mL) y se concentra bajo
presión reducida. Se llevó a cabo una reacción similar con
baño de 5 g. Se combinan ambos lotes y el material crudo
15 obtenido se purificó por cromatografía de columna en gel de
sílice eluyendo con MeOH al 4%/DCM para proporcionar mezcla
de (2S,3R)-3-hidroxi-2-((R)-5-isobutil-1-oxo-2,5-
diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida. La mezcla obtenida se
sometió además a cromatografía de columna, el compuesto puro
20 se eluyó en acetato de etilo al 100 % para proporcionar
(2S,3R)-3-hidroxi-2-((R)-5-isobutil-1-oxo-2,5-
diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (8 g) como un jarabe
espeso. ^1H -RMN: (500 MHz, CD_3OD): δ 4.16-4.12 (m, 1H), 4.09
(d, J = 7.0 Hz, 1H), 3.60 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.54 (d, J =

60
6.0 Hz, 1H), 2.97-2.93 (m, 1H), 2.75 (q, $J = 8.0$ Hz, 1H),
2.47-2.45 (m, 2H), 2.22-2.18 (m, 1H), 2.16- 2.10 (m, 1H),
1.92-1.83 (m, 2H), 1.76-1.73 (m, 1H), 1.24 (d, $J = 6.0$ Hz,
3H), 0.92-0.89 (m, 6H); LCMS (ESI): m/z 284.1 [$M^+ + 1$]; HPLC:
5 97.65%; HPLC Quiral: 98.25%; SOR ($c=1$, CH_3OH): 1.6.

Síntesis de (Z)-3-carboxiacrilato de (4R)-2-((2S,3R)-1-amino-3-hidroxi-1-oxobutan-2-il)-5-isobutil-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-io (Compuesto A sal del ácido maleico):

10 A una solución de (2S,3R)-3-hidroxi-2-((R)-5-isobutil-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (400 mg, 1.41 mmol) en H_2O (4 mL) se agregó ácido maleico (148 mg, 1.27 mmol) a temperatura ambiente y se agita durante 16 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), se removió el
15 agua bajo presión reducida. El material crudo obtenido se trituró con pentano y hexano, se seca bajo vacío para proporcionar (Z)-3-carboxiacrilato de (4R)-2-((2S,3R)-1-amino-3-hidroxi-1-oxobutan-2-il)-5-isobutil-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-io (530 mg, 94%) como un sólido
20 blanco. ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) δ 6.29 (s, 2H), 4.21 - 4.12 (m, 2H), 3.91-3.85 (m, 1H), 3.83-3.79 (m, 1H), 3.61-3.51 (m, 1H), 3.29-3.19 (m, 1H), 3.04 (dd, $J = 9.0, 12.5$ Hz, 1H), 2.90 (dd, $J = 5.8, 12.2$ Hz, 1H), 2.52-2.43 (m, 1H), 2.40-2.31 (m, 1H), 2.25-1.97 (m, 3H), 1.28 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H), 1.04 (dd, J

61

= 6.4, 9.9 Hz, 6H); LCMS (ESI): m/z 284.3 [$M^+ + 1$ -ácido maleico]; HPLC: 96.83%; Punto de fusión: 113.4°C-117.5°C.

Preparación del Int-D:

Síntesis de (tert-butoxicarbonil)-L-treonina (A1):

5 A una solución de SM-2 (50 g, 0.420 mol) en 1,4-dioxano:agua (500 mL, 1:1) se agregó NaHCO₃ (133 g, 1.255 mol) en porciones a TA y se agita durante 15 min. Entonces se agregó anhídrido Boc (144 mL, 0.629 mol) gota a gota a la mezcla de reacción y continuó la agitación a TA durante 16 h.

10 Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se diluyó con agua (200 mL) y se hizo ácido usando HCl 1N (pH~2). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 300 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (1

15 x 200 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra bajo presión reducida para proporcionar A1 (80 g, 87%) como un jarabe incoloro. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-d₆): δ 12.5 (br s, 1H), 6.30 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.50 (br s, 1H), 4.05-4.02 (m, 1H), 3.88-3.86 (m, 1H), 1.39 (s, 9H), 1.08 (d,

20 J = 6.0 Hz, 3H);

LCMS (m/z): 218.1 [$M^+ - 1$]

Síntesis de O-bencil-N-(tert-butoxicarbonil)-L-treonina (B1):

A una solución agitada del compuesto A1 (80 g, 0.365 mol) en DMF (800 mL) se agregó NaH al 60% (22 g, 0.913 mol)

en porciones a -20°C bajo atmósfera de N_2 y se agita durante 2 h. A esto se agregó bromuro de bencilo (52 mL, 0.438 mol) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 4 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la
 5 mezcla de reacción se apagó con agua enfriada en hielo y se extrae con éter de dietilo (2 x 500 mL). La capa acuosa se hizo ácida usando HCl 1N ($\text{pH} \sim 2$). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 1 L). La capa orgánica separada se lava con solución de salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se
 10 concentra bajo presión reducida para proporcionar el compuesto B1 (84 g, crudo) como un jarabe espeso. ^1H -RMN: (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.64 (br s, 1H), 7.34–7.25 (m, 5H), 6.46 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.39 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.00–3.98 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.15 (d, J
 15 $= 6.0$ Hz, 3H).

Síntesis de O-bencil-N-(tert-butoxicarbonil)-L-treoninato de bencilo (C1):

A una solución agitada del compuesto B1 (78 g, 0.252 mol) en DMF (780 mL) se agregó K_2CO_3 (87 g, 0.631 mol) a TA
 20 bajo atmósfera de N_2 y se agita durante 30 min. A esto se agregó bromuro de bencilo (45 mL, 0.378 mol) gota a gota a TA y se agita durante 16 h. La mezcla de reacción se apagó con agua (2 L) y se extrae con éter de dietilo (2 x 1 L). La capa orgánica separada se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4

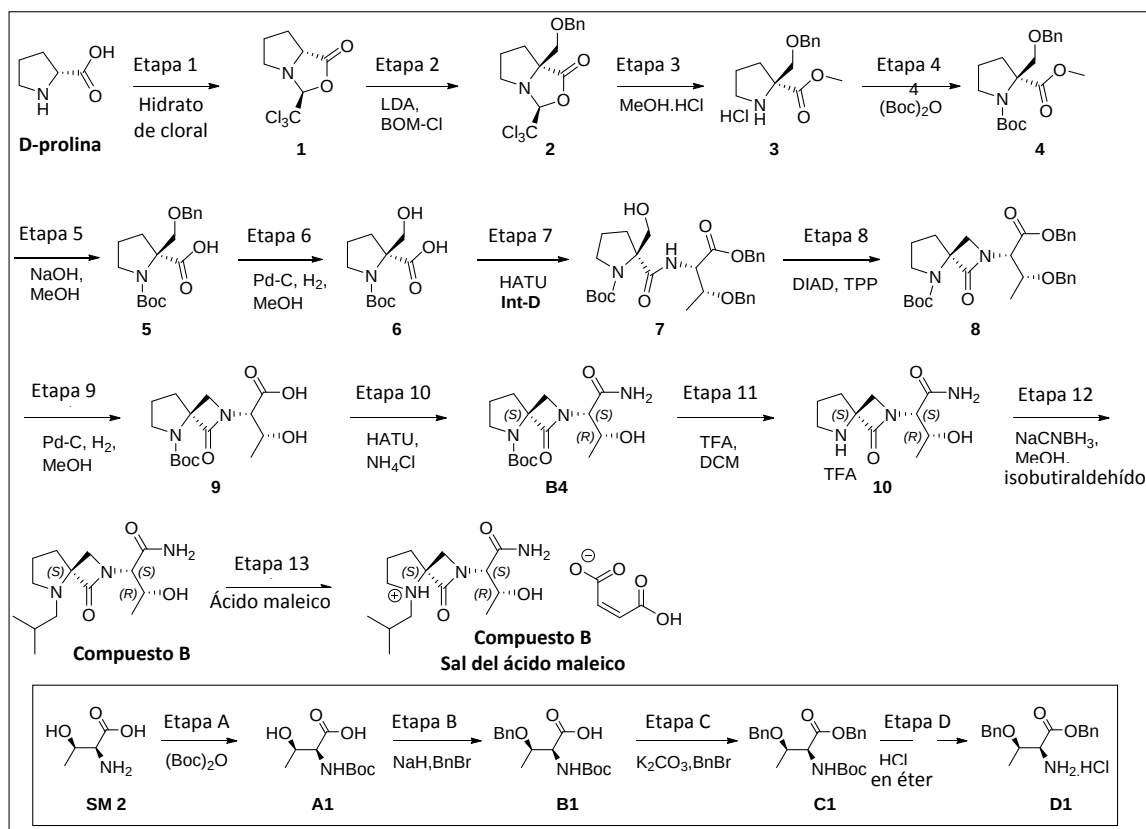
anhidro y se concentra bajo presión reducida. El material
 crudo se purificó por cromatografía de columna en gel de
 sílice eluyendo con EtOAc al 10%/n-hexano para proporcionar
 el compuesto C1 (68 g, 68%) como jarabe amarillo. ^1H -RMN:
 5 (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7.37-7.18 (m, 10H), 6.81 (d, J = 9.0
 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.49 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.32 (d, J
 = 12.0 Hz, 1H), 4.25-4.22 (m, 1H), 4.01-3.98 (m, 1H), 1.38
 (s, 9H), 1.15 (d, J = 6.0 Hz, 3H); Masa (ESI): m/z 399.4
 [M $^+$].

10 **Síntesis de clorhidrato de O-bencil-L-treoninato de bencilo (D1):**

A una solución del compuesto C1 (68 g, 0.170 mol) en
 éter de dietilo (500 mL) se agregó HCl 4N en 1,4-dioxano (130
 mL, 0.511 mol) y se agita a TA durante 16 h. Después del
 15 consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de
 reacción se concentró bajo presión reducida. El material
 crudo se disolvió en dietiléter (1 L) y se agita
 vigorosamente a TA durante 1h. El sólido obtenido se filtró
 completamente y se seca bajo presión reducida para
 20 proporcionar el compuesto D1 (50 g, 87%) como un sólido
 blanco (sal de HCl). ^1H -RMN: (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.59 (s,
 2H), 7.50-7.25 (m, 10H), 5.23 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 5.16 (d,
 J = 12.5 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.36 (d, J =
 12.0 Hz, 1H), 4.12-4.09 (m, 1H), 4.09-3.99 (m, 1H), 1.29 (d,

$J = 6.5 \text{ Hz, } 3\text{H}$; Masa (ESI): m/z 336.4 $[M^++1]$.

Ejemplo 2- Síntesis del Compuesto B y sal del ácido maleico del Compuesto B



5 Síntesis de (3S,7aR)-3-(triclorometil)tetrahydro-1H,3H-pirrolo[1,2-c]oxazol-1-ona (1):

A una suspensión de D-prolina (3 kg, 26.057 mol) en cloroformo (60 L) se agregó hidrato de cloral (8.62 kg, 52.115 mol) a TA. La mezcla de reacción se calentó hasta 80°C bajo un aparato Dean-Stark invertido y se recolectó el agua obtenida. Después de agitar durante 24 h, mezcla de reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente y se agrega solución de salmuera (25 L). La mezcla de reacción se agitó durante 30

minutos y se permite asentar durante 30 minutos. La capa orgánica separada se secó sobre Na₂SO₄ y se concentra bajo presión reducida para proporcionar volátiles que se evaporaron bajo presión reducida. El sólido crudo obtenido se hizo mezcla espesa con etanol frío (5 L), se filtra y se seca para proporcionar el compuesto 1 (4.7 kg, 74 %) como un sólido blanco opaco. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-d₆): δ 5.82 (s, 1H), 4.11-4.09 (m, 1H), 3.33-3.28 (m, 1H), 3.19-3.14 (m, 1H), 2.17-2.10 (m, 1H), 1.97-1.91 (m, 1H), 1.80-1.74 (m, 1H), 1.65-1.58 (m, 1H).

Síntesis de (3S,7aS)-7a-((benciloxi)metil)-3-(triclorometil)tetrahidro-1H,3H-pirrolo[1,2-c]oxazol-1-ona (2):

A una solución de diisopropilamina (442 mL, 3.067 mol) en THF (1 L) se agregó n-BuLi (1.6M en hexano) (1.91 L, 3.067 mol) gota a gota a -78°C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de completar la adición, la temperatura de la mezcla de reacción se elevó hasta -20°C y se agita durante 45 minutos. De nuevo enfriando hasta -78°C, el compuesto 1 (500 g, 2.044 mol) en THF (2 L) se agregó gota a gota y se agita durante 45 minutos. Entonces se agregó éter bencilclorometilo (425 mL, 3.067 mol) gota a gota y la agitación continúa durante 2 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se apagó con agua enfriada en hielo (2 L)

y se extrae con Et₂O (2 x 1 L). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3 L), se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentran bajo presión reducida para proporcionar el compuesto crudo que se purificó por cromatografía de columna al eluir con EtOAc al 10%/n-hexano para obtener el compuesto 2 (425 g, 57%) como un líquido amarillo. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.35-7.26 (m, 5H), 5.60 (s, 1H), 4.59-4.53 (d, 2H), 3.67-3.62 (m, 2H), 3.71-3.31 (m, 1H), 3.16-3.11 (m, 1H), 2.12-1.99 (m, 2H), 1.86-1.72 (m, 2H); LCMS (ESI): *m/z* 363.8 [M⁺-1].

Síntesis de clorhidrato de metil (S)-2-((benciloxi)metil)pirrolidin-2-carboxilato (3):

A una solución del compuesto 2 (1 kg, 2.742 mol) en metanol (2 L) se agregó HCl 2N en metanol (4.1 L, 8.227 mol) a TA y se agita durante 30 min. La mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 16 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), los volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El jarabe crudo obtenido se diluyó con agua DM (3 L) y se lava con EtOAc (2x1 L). La capa acuosa pH (8-9) se ajustó con solución de NaHCO₃. La capa acuosa se extrajo con MeOH al 5%/ DCM (2x2 L). La capa orgánica combinada se lava con solución de salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentra bajo presión reducida para proporcionar el compuesto 3 (600 g, 88%) como un jarabe café. Se repitió otro

lote de 1kg y se obtienen 600 g del compuesto 3. ^1H -RMN: (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.54 (br s, 1H), 9.44 (br s, 1H), 7.40-7.30 (m, 5H), 4.68-4.62 (d, 1H), 4.51-4.46 (d, 1H), 4.00-3.90 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.33-3.16 (m, 2H), 2.20-2.14 (s, 1H),
 5 2.01-1.85 (m, 3H).

Síntesis de (S)-2-((benciloxi)metil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(tert-butil) 2-metilo (4):

A una suspensión agitada del compuesto 3 (1.2 kg, 4.819 mol) en DCM (6 L) se agregó Et_3N (1.35 L, 9.638 mol) gota a
 10 gota a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno y se agita durante 20 min. Entonces se agrega anhídrido Boc (1.65 L, 7.228 mol) gota a gota a 0°C . La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 8 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la reacción se diluyó con agua DM (3 L) y
 15 se extrae con DCM (2 L). La capa orgánica combinada se lavó con solución de ácido cítrico al 10% (2 L) y solución de salmuera (2 L). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentra bajo presión reducida para proporcionar el compuesto 4 (2 kg, crudo) como un jarabe café. ^1H -RMN: (500
 20 MHz, DMSO- d_6): δ 7.37-7.28 (m, 5H), 4.57-4.50 (m, 2H), 4.03-3.88 (dd, 1H), 3.71-3.69 (d, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.52-3.47 (m, 1H), 3.36-3.31 (m, 1H), 2.32-2.23 (m, 1H), 2.05-1.88 (m, 2H), 1.82-1.77 (m, 1H), 1.38-1.26 (s, 9H); LCMS (ESI): m/z 350.2 $[(M^++1)]$.

Síntesis de ácido (S)-2-((benciloxi)metil)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-2-carboxílico (5):

A una solución del compuesto 4 (1 kg, 2.865 mol) en MeOH:THF (3 L, 1:1) se agregó NaOH (343.84 g, 8.595 mol) en H₂O (1.5 L) a TA agitando a 70°C durante 6 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se llevó hasta TA, los volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El material crudo se diluyó con agua (5 L) y se extrae con EtOAc (2 x 2 L). La capa acuosa separada se hizo ácida usando solución de HCl 6N (pH~2) y se extrae con DCM (3 x 2 L). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentran para proporcionar el compuesto 5 (550 g, 58%) como un jarabe café. Se repitió otro lote de 1kg y se obtienen 550 g del compuesto 5. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.68 (br s, 1H), 7.36-7.28 (m, 5H), 4.56-4.49 (m, 2H), 4.07-3.90 (dd, 1H), 3.66-3.64 (d, 1H), 3.50-3.44 (m, 1H), 2.29-2.20 (m, 1H), 2.03-1.75 (m, 3H), 1.39-1.28 (2s, 9H). LCMS (ESI): *m/z* 236.0 [M⁺+1-Boc]; HPLC: 76.79%; HPLC Quiral: 96.26%

Síntesis de ácido (S)-1-(tert-butoxicarbonil)-2-(hidroximetil)pirrolidin-2-carboxílico (6):

A una solución agitada del compuesto 5 (1.1 kg, 32.835 mol) en metanol (10 L) se agregó 50% de Pd-C al 10% húmedo (500 g) a TA y se agita durante 8 h bajo H₂ atmósfera (3 kg).

Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y la almohadilla se lavó con metanol (50 mL). El filtrado obtenido se concentró bajo presión reducida para obtener crudo el cual se trituró con Et₂O para proporcionar el compuesto 6 (650 g, 81%) como un sólido blanco opaco. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.92-3.80 (dd, 1H), 3.64-3.61 (m, 1H), 3.49-3.34 (m, 1H), 3.32-3.26 (m, 1H), 2.29-2.16 (m, 1H), 1.95-1.71 (m, 3H), 1.38-1.33 (s, 9H); LCMS (ESI): *m/z* 243.8 [M⁺-1].

Síntesis de (S)-2-(((2S,3R)-1,3-bis(benciloxi)-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-carboxilato de tert-butilo (7):

A una solución del compuesto 6 (450 g, 0.836 mol) en DCM (4.5 L) se agregó N,N-diisopropiletilamina (846 mL, 4.591 mol) 0-5°C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de agitación durante 10 minutos, el Intermediario D1 (615 g, 1.836 mol) se agregó. Después de agitación durante 10 minutos, HATU (701 g, 2.204 mol) se agregó. La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 6 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se diluyó con DCM (1 L) y se lava con agua (2x2 L), solución de ácido cítrico al 10% (2 L) y solución de salmuera (2L). La capa orgánica se secó sobre anhidro Na₂SO₄ y se concentra bajo presión reducida

para proporcionar el compuesto crudo que se purificó por cromatografía de columna al eluir con EtOAc al 40%/n-hexano para obtener el compuesto 7, el cual se disolvió en Et₂O (1.5 L) y se agita durante 1h. El precipitado obtenido se filtró y se seca bajo vacío para proporcionar el compuesto 7 (630 g, 65%) como un sólido blanco. ¹H-RMN: (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.91-7.89 (d, 0.5H), 7.53-7.51 (d, 0.5H), 7.32-7.19 (m, 10H), 5.64 (br s, 1H), 5.16-5.04 (m, 2H), 4.62-4.49 (m, 2H), 4.31-4.28 (m, 1H), 4.09-4.02 (m, 1.5H), 3.87 (br s, 1H), 3.57-3.56 (m, 0.5H), 3.43-3.37 (m, 1H), 3.29-3.25 (m, 1H), 2.32-2.14 (m, 1H), 1.98-1.90 (m, 1H), 1.75-1.69 (m, 2H), 1.33-1.26 (2s, 9H), 1.14-1.12 (d, 3H); LCMS (m/z): 527.6 [M⁺+1]; HPLC: 96.60%.

Síntesis de (S)-2-((2S,3R)-1,3-bis(benciloxi)-1-oxobutan-2-il)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-carboxilato de tert-butilo (8):

A una solución de trifenilfosfina (295 g, 1.125 mol) en THF (846 mL) se agregó DIAD (227 g, 1.125 mol) gota a gota a TA bajo atmósfera de nitrógeno y se agita durante 30 minutos. La mezcla de reacción fue enfriada hasta 15°C, el compuesto 7 (423 g, 0.804 mol) en solución de THF (1.2 L) se agregó gota a gota y se permite reposar a TA durante 4 h. El material crudo obtenido se lavó con hexano seguido por agitación con Et₂O al 50%/hexano durante 30 minutos. El precipitado formado

se filtró completamente y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice eluyendo con EtOAc al 40%/hexano para proporcionar el compuesto 8 (425 g, crudo) como un jarabe café. ^1H -RMN: (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.38-7.21 (m, 10H), 5.17-5.10 (m, 2H), 4.56-4.50 (m, 2H), 4.31-4.28 (d, 1H), 4.06-3.99 (m, 2H), 3.89-3.88 (d, 0.5H), 3.48-3.47 (d, 0.5H), 3.36-3.34 (m, 1H), 3.25-3.19 (m, 1H), 2.10-2.02 (m, 2H), 1.79-1.77 (m, 2H), 1.40-1.25 (s, 9H), 1.15-1.12 (d, 3H). LCMS (ESI): m/z 509.4 [$\text{M}^+ + 1$]; HPLC: 92.31%; HPLC Quiral: 86.47%.

Síntesis de ácido (2S,3R)-2-((S)-5-(tert-butoxicarbonil)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)-3-hidroxibutanoico (9):

Una solución del compuesto 8 (283 g, 0.557 mol) en metanol (1.2 L) se desgasificó bajo atmósfera de N_2 . Entonces se agrega 50% de Pd-C al 10% húmedo (140 g) a TA y se agita durante 24 h bajo H_2 atmósfera. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El crudo obtenido sólido se diluyó con Et_2O (500 mL) y se agita vigorosamente a 0°C durante 1 h. El material sólido resultante se filtró completamente y se seca para proporcionar el compuesto 9 (140 g, 76%) como un sólido blanco. ^1H -RMN: (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ

12.86 (br s, 1H), 5.24 (br s 1H), 4.06-4.00 (m, 2H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.51-3.50 (m, 1H), 3.43-3.34 (m, 1H), 3.31-3.23 (m, 1H), 2.15-2.09 (m, 2H), 1.82-1.78 (m, 2H), 1.39-1.31 (2s, 9H), 1.10-1.08 (d, 3H); LCMS (m/z): 327.1 [M⁺-1]; HPLC: 5 95.44%; HPLC Quiral: 100.00%.

Síntesis de (S)-2-((2S,3R)-1-amino-3-hidroxi-1-oxobutan-2-il)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-carboxilato de tert-butilo (B4):

A una solución agitada del compuesto 9 (420 g, 1.28 mol) en CH₂Cl₂ (4.2 L) se agregaron HATU (584 g, 1.536 mol), NH₄Cl (137 g, 2.56 mol) y diisopropiletilamina (708 mL, 3.841 mol) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 8 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se 15 dividió entre agua (2 L) y CH₂Cl₂ (2 L) y se agita durante 15 minutos. La capa orgánica se separó, se lava con solución de HCl 2N (2x1L) y solución de NaHCO₃ saturada (2 L) y solución de salmuera (2 L). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentra bajo presión reducida. El crudo 20 obtenido se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice eluyendo con MeOH al 5%/CH₂Cl₂ para proporcionar el compuesto B4 (320 g, mezcla) como un sólido blanco opaco. El compuesto mezcla B4 (87 g) se disolvió en DCM y vuelve a precipitar con Et₂O bajo agitación vigorosa a TA durante 1h.

el producto se filtró y se seca bajo vacío para obtener el compuesto B4 (82 g) como un sólido blanco. ^1H -RMN: (400 MHz, D_2O): δ 4.53-4.10 (m, 2H), 4.08-3.96 (m, 1H), 3.80-3.72 (m, 1H), 3.60-3.39 (m, 2H), 2.53-2.31 (m, 2H), 2.02-1.93 (m, 2H), 1.51-1.45 (s, 9H), 1.31-1.29 (d, 3H); LCMS (ESI): m/z 326.1 $[\text{M}^+-1]$; HPLC: 99.66%; HPLC Quiral: 99.76%; SOR (c=1, MeOH): -49.61.

Síntesis de (2S,3R)-3-hidroxi-2-((S)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (10):

A una solución agitada del compuesto B4 (10 g, 0.031 mol) en CH_2Cl_2 (40 mL) se agregó TFA (23 mL, 0.305 mol) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 3 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), los volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El material de jarabe espeso obtenido se lavó con éter (2 x 50 mL) y se seca bajo vacío para proporcionar el compuesto 10 (10 g, sal de TFA, crudo) como un jarabe espeso, que se tomó para la siguiente etapa. ^1H -RMN: (400 MHz, D_2O): δ 4.38-4.10 (m, 2H), 4.11-3.94 (m, 2H), 3.56-3.44 (m, 2H), 2.52-2.38 (m, 2H), 2.24-2.16 (m, 2H), 1.39-1.27 (d, 3H); LCMS (ESI): m/z 228.2 $[\text{M}^++1]$.

Síntesis de (2S,3R)-3-hidroxi-2-((S)-5-isobutil-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (Compuesto B):

A una solución agitada del compuesto crudo 10 (10 g, sal

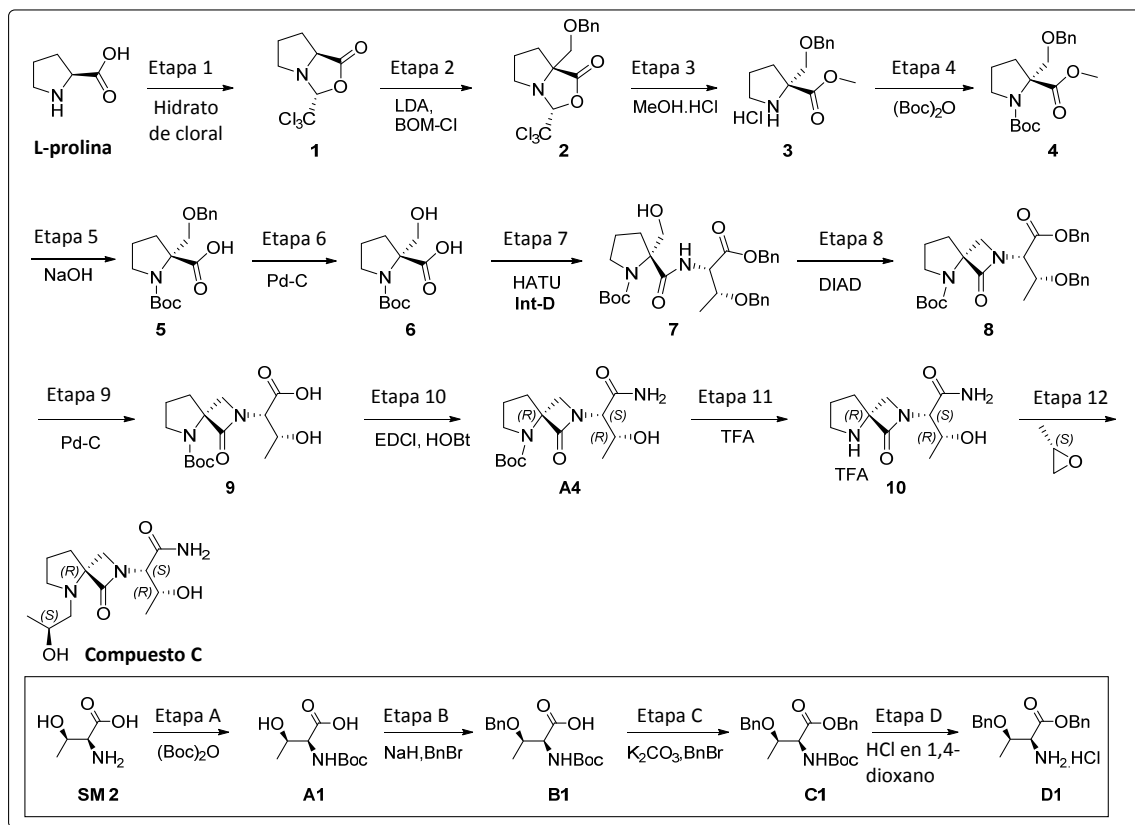
de TFA, 0.029 mol) en metanol (50 mL) se agregaron isobutiraldehído (6.5 mL, 0.073 mol) seguido por AcOH (2.5 mL) a TA bajo atmósfera de nitrógeno y se agita durante 10 minutos. Luego, se agregó NaCNBH₃ (5.4 g, 0.087 mol) en 5 porciones y la agitación continúa durante 16 h. No se completa el consumo del material de partida (por CCD). De nuevo, se agregaron isobutiraldehído (3.2 mL, 0.036 mol) y AcOH (1 mL) y la agitación continúa durante 2 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), mezcla de reacción 10 se diluyó con CH₂Cl₂ (20 mL) y se concentra bajo presión reducida. El material crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice eluyendo con MeOH al 4%/DCM para proporcionar (2S,3R)-3-hidroxi-2-((S)-5-isobutil-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (6 g) 15 como un jarabe espeso. ¹H-RMN: (500 MHz, CD₃OD): δ 4.10-4.07 (m, 2H), 3.63 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 2.97-2.93 (m, 1H), 2.74 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.41-2.34 (m, 2H), 2.26-2.20 (m, 1H), 2.17- 2.11 (m, 1H), 1.94-1.81 (m, 2H), 1.73-1.69 (m, 1H), 1.21 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.91-0.89 20 (m, 6H); LCMS (ESI): *m/z* 284.1 [M⁺+1]; HPLC: 99.53%; HPLC Quiral: 100.00%; SOR (c= 0.5, MeOH): -60.25.

Síntesis de (Z)-3-carboxiacrilato de (4S)-2-((2S,3R)-1-amino-3-hidroxi-1-oxobutan-2-il)-5-isobutil-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-io (Compuesto B sal del ácido

maleico):

A una solución de (2S,3R)-3-hidroxi-2-((S)-5-isobutil-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (180 mg, 0.636 mmol) en H₂O (2 mL) se agregó ácido maleico (59 mg, 0.508 mmol) a temperatura ambiente y se agita durante 16 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), el agua se removi6 bajo presi6n reducida. El material crudo obtenido se trituro con pentano y hexano, se seca bajo vacio para proporcionar (Z)-3-carboxiacrilato de (4S)-2-((2S,3R)-1-amino-3-hidroxi-1-oxobutan-2-il)-5-isobutil-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-io (210 mg, 86%) como un s6lido amarillo p6lido. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 6.28 (s, 2H), 4.21-4.11 (m, 2H), 3.90 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.71 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.47-3.36 (m, 1H), 3.20-3.09 (m, 1H), 2.92-2.82 (m, 1H), 2.81-2.71 (m, 1H), 2.48-2.38 (m, 1H), 2.36-2.26 (m, 1H), 2.20-1.88 (m, 3H), 1.24 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.00 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H); LCMS (ESI): *m/z* 284.2 [M⁺+1-6cido maleico]; HPLC: 97.98%; Punto de fusi6n: 114.8 6C-118.36C.

Ejemplo 3 - Síntesis del Compuesto C



Síntesis de (3R,7aS)-3-(trichlorometil)tetrahydro-1H,3H-pirrolo[1,2-c]oxazol-1-ona (1):

5 A una suspensión de L-prolina (2.0 kg, 0.017mol) en cloroformo (50 L) se agregó hidrato de cloral (5.7 kg, 0.034 mol) a TA. La mezcla de reacción se calentó hasta 60°C bajo un aparato Dean-Stark invertido y se recolectó el agua obtenida. Después de 16 h, los volátiles se concentraron bajo

10 presión reducida. Se lavó el crudo sólido con etanol frío, se filtra y se seca para proporcionar el compuesto 1 (2.2 kg, 57 %) como un sólido blanco. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-d₆): δ 5.82 (s, 1H), 4.11-4.08 (m, 1H), 3.33-3.27 (m, 2H), 3.19-3.14 (m,

1H), 2.15-2.10 (m, 1H), 1.96-1.91 (m, 1H), 1.80-1.74 (m, 1H),
1.65-1.58 (m, 1H).

Síntesis de (3R,7aR)-7a-((benciloxi)metil)-3-(triclorometil)tetrahidro-1H,3H-pirrólo[1,2-c]oxazol-1-ona

5 **(2):**

A una solución de diisopropilamina (221.2 mL, 1.533 mol) en THF (870 mL) se agregó n-BuLi (1.6 M en hexano) (958.5 mL, 1.533 mol) gota a gota a -78°C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de completar la adición, la temperatura de la mezcla
10 de reacción se elevó hasta -20°C y se agita durante 1 h. De nuevo enfriando hasta -78°C, el compuesto 1 (250 g, 1.022 mol) en THF (1 L) se agregó y se agita durante 30 min. Entonces se agregó éter de bencilclorometilo (208 mL, 1.329 mol) gota a gota y la agitación continúa durante 1 h. Después
15 del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se apagó con agua enfriada en hielo (100 mL) y se extrae con Et₂O (2 x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 mL), se secaron sobre anhidro Na₂SO₄ y se concentran bajo presión reducida que se purificó
20 por cromatografía de columna al eluir con EtOAc al 10%/n-hexano para obtener el compuesto 2 (220 g, crudo) como un jarabe espeso café. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.42-7.26 (m, 5H), 5.60 (s, 1H), 4.59-4.53 (d, 2H), 3.67-3.61 (m, 2H), 3.37-3.33 (m, 1H), 3.31-3.10 (m, 1H), 2.12-1.99 (m, 2H),

1.87-1.75 (m, 2H); LCMS (ESI): m/z 363.9[M⁺+1].

Síntesis de clorhidrato de metil (R)-2-((benciloxi)metil)pirrolidin-2-carboxilato (3):

A una solución del compuesto 2 (400 g, 1.096 mol) en metanol (1 L) se agregó HCl 2N en MeOH (1.64 L, 3.29 mol) a TA y se agita a 80°C durante 16 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), los volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El crudo obtenido se lavó con hexanos (3x750 mL) y se seca bajo presión reducida para proporcionar el compuesto 3 (358 g, crudo) como un jarabe espeso rojizo. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.40 (br s, 1H), 7.40-7.21 (m, 5H), 4.64-4.50 (d, 2H), 4.49-4.3 (d, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.33-3.22 (m, 2H), 2.22-2.15 (s, 1H), 2.02-1.9 (m, 2H), 1.95-1.83 (m, 1H).

Síntesis de (R)-2-((benciloxi)metil)pirrolidin-1,2-dicarboxilato de 1-(tert-butil) 2-metilo (4):

A una suspensión agitada del compuesto 3 (313 g, crudo 1.096 mol) en DCM (2.19 L) se agregó Et₃N (458.4 mL, 3.288 mol) gota a gota a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno y se agita durante 10 min. Entonces se agregó anhídrido Boc (358.4 g, 1.644 mol) gota a gota a 0°C. La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 16 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la reacción se diluyó con agua (2x1 L) y se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 500 mL). La capa orgánica

combinada se lavó con ácido cítrico al 10% (pH~7) y solución de salmuera (1 L). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentra bajo presión reducida para proporcionar el compuesto crudo que se purificó por cromatografía de columna al eluir con EtOAc al 20%/n-hexano para obtener el compuesto 4 (215 g, 56%) como un jarabe espeso incoloro. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.37-7.26 (m, 5H), 4.56-4.48 (m, 2H), 4.03-3.87 (dd, 1H), 3.69-3.67 (d, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.53-3.47 (m, 1H), 3.33-3.30 (m, 1H), 2.27-2.20 (m, 1H), 2.03-1.89 (m, 2H), 1.88-1.79 (m, 1H), 1.46-1.24 (2s, 9H); LCMS (ESI): *m/z* 250.1 [(M⁺+1)-Boc].

Síntesis de ácido (R)-2-((benciloxi)metil)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidin-2-carboxílico (5):

A una solución del compuesto 4 (215 g, 0.616 mol) en MeOH:THF:H₂O (3 L, 5:5:3) se agregó NaOH (73.9 g, 1.848 mol) y se agita a TA durante 10 min. La mezcla de reacción se calentó hasta 80°C y se agita durante 16 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se llevó hasta TA, los volátiles se evaporaron. El material crudo se diluyó con agua (1 L) y se extrae con Et₂O (2 x 500 mL). La capa acuosa separada se hizo ácida usando solución de HCl 2 N (pH~3) y se extrae con DCM (2 x 750 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentran para

proporcionar el compuesto 5 (170 g, 82.4%) como un sólido blanco opaco. ^1H -RMN: (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.66 (br s, 1H), 7.36-7.26 (m, 5H), 4.54-4.47 (m, 2H), 4.05-3.90 (dd, 1H), 3.88-3.63 (d, 1H), 3.63-3.44 (m, 1H), 3.34-3.27 (m, 1H), 2.27-2.01 (m, 1H), 2.02-1.8 (m, 2H), 1.79-1.76 (m, 1H), 1.17-1.14 (2s, 9H); LCMS (ESI): m/z 235.1 [$\text{M}^+ + 1$]-Boc].

Síntesis de ácido (R)-1-(tert-butoxicarbonil)-2-(hidroximetil)pirrolidin-2-carboxílico (6):

A una solución agitada del compuesto 5 (170 g, 0.507 mol) en CH_3OH (1 L) se agregó 50% de Pd-C al 10% húmedo (68 g) a TA y se agita durante 16 h bajo H_2 atmósfera. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y la almohadilla se lavó con CH_3OH (1 L). El filtrado obtenido se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto 6 (110 g, 88 %) como un sólido blanco. ^1H -RMN: (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.66 (br s, 1H), 3.96-3.83 (dd, 1H), 3.63-3.60 (m, 1H), 3.49-3.46 (m, 1H), 3.34-3.25 (m, 2H), 2.30-2.15 (m, 1H), 1.95-1.72 (m, 3H), 1.38-1.33 (2s, 9H); LCMS (ESI): m/z 244 [$\text{M}^+ - 1$]; HPLC Quiral: 95.88%.

Síntesis de (R)-2-(((2S,3R)-1,3-bis(benciloxi)-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-carboxilato de tert-butilo (7):

A una solución agitada del compuesto 6 (110 g, 0.448

mol) en DCM (20 mL), mezcla de reacción enfriada hasta 0°C bajo atmósfera de N₂ diisopropiletilamina (206 mL, 1.12 mol), se agregaron intermediario D1 (150 g, 0.448 mol), HATU (204 g, 0.537 mol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 4 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se diluyó con DCM (1 L) y se lava con agua (2x500 mL), solución de ácido cítrico al 10% (500 mL) y solución de salmuera (500 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentra bajo presión reducida para proporcionar el compuesto crudo que se purificó por cromatografía de columna al eluir con EtOAc al 30%/n-hexano para obtener el compuesto 7 (143 g, 60%) como un jarabe espeso incoloro. ¹H-RMN: (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.20-8.12 (d, 1H), 7.29-7.18 (m, 10H), 5.83-5.59 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.50-4.44 (m, 2H), 4.30-4.26 (m, 1H), 4.08-4.00 (m, 2H), 3.42-3.40 (m, 2H), 3.39-3.29 (m, 1H), 2.19-2.08 (m, 1H), 1.96-1.87 (m, 1H), 1.68-1.63 (m, 2H), 1.23-1.15 (2s, 9H), 1.14-1.13 (d, 3H); LCMS (m/z): 525.2 [M⁺-1]; HPLC: 76.2 %; HPLC Quiral: 69.47 %.

Síntesis de (R)-2-((2S,3R)-1,3-bis(benciloxi)-1-oxobutan-2-il)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-carboxilato de tert-butilo (8):

A una solución de trifenilfosfina (161.4 g, 0.612 mol)

en THF (430 mL) se agregó DIAD (123.8 g, 0.612 mol) gota a gota a TA bajo atmósfera de nitrógeno y se agita durante 15 minutos. A esto, el compuesto 7 (215 g, 0.408 mol) en solución de THF (860 mL) se agregó gota a gota y se permite
5 reposar a TA durante 4 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), los volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El material crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice eluyendo con EtOAc al 20%/hexano para proporcionar el compuesto 8 (180 g, mezcla
10 con subproducto DIAD) como jarabe amarillo. ^1H -RMN: (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.31-7.18 (m, 10H), 5.18-5.10 (m, 2H), 4.61-4.54 (m, 2H), 4.27-4.18 (m, 2H), 3.78-3.77 (d, 1H), 3.45-3.43 (d, 1H), 3.35-3.31 (d, 1H), 3.27-3.23 (m, 1H), 2.03-1.98 (m, 2H), 1.78-1.76 (m, 2H), 1.39-1.31 (2s, 9H), 1.23-1.22 (d, 3H) (no
15 se capturaron picos del subproducto DIAD); LCMS (ESI): m/z 509.4 [$M^+ + 1$].

Síntesis de ácido (2S,3R)-2-((R)-5-(tert-butoxicarbonil)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)-3-hidroxibutanoico (9):

Una solución del compuesto 8 (85 g, 0.167 mol) en
20 metanol (850 mL) se desgasificó bajo atmósfera de N_2 . Entonces se agrega 50% de Pd-C al 10% húmedo (40 g) a TA y se agita durante 24 h bajo atmósfera de H_2 . Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y el filtrado se

concentró bajo presión reducida. El crudo obtenido sólido se diluyó con Et₂O (1 L) y se agita vigorosamente a TA durante 1 h. El material sólido resultante se filtró completamente y se seca para proporcionar el compuesto 9 (75 g, 68%) como un sólido blanco. ¹H-RMN: (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.86 (br s, 1H), 5.24 (br s 1H), 4.06-4.00 (m, 2H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.51-3.50 (m, 1H), 3.43-3.34 (m, 1H), 3.31-3.23 (m, 1H), 2.15-2.09 (m, 2H), 1.82-1.78 (m, 2H), 1.39-1.31 (2s, 9H), 1.10-1.08 (d, 3H); LCMS (m/z): 329.1 [M⁺+1]; HPLC: 93.97%.

10 **Síntesis de (R)-2-((2S,3R)-1-amino-3-hidroxi-1-oxobutan-2-il)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-carboxilato de tert-butilo (A4):**

A una solución agitada del compuesto 9 (150 g, 0.457 mol) en CH₂Cl₂ (2 L) la mezcla de reacción enfriada hasta 0°C se agregaron diisopropiletilamina (176.85g, 1.37 mol), NH₄Cl (48.8 g, 0.914 mol) y HATU (208.3 g 0.548 mols) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 12 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se diluyó con agua (2x750 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 1 L). La capa orgánica combinada se lavó con solución de HCl 2N y solución de cloruro de sodio saturada (750 mL). La capa orgánica se secó sobre anhidro Na₂SO₄ y se concentra bajo presión reducida. El compuesto crudo se purificó por cromatografía de

columna el compuesto puro se eluyó con MeOH al 3%/CH₂Cl₂. El material obtenido se diluyó con DCM (2 L) y se lava con ácido cítrico saturado (5 x 500 mL), lavado con bicarbonato saturado seguido por lavado con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. El material se trituroó con el éter (2 x 500 mL) para proporcionar el compuesto A4 (80 g, 53%) como un sólido blanco. ¹H-RMN: (400 MHz, D₂O): δ 4.36-4.21 (m, 2H), 4.03-3.98 (m, 1H), 3.76-3.67 (m, 1H), 3.56-3.37 (m, 2H), 2.32-2.23 (m, 2H), 1.97-1.93 (m, 2H), 1.49-1.47 (2s, 9H), 1.33-1.32 (d, 3H); LCMS (ESI): *m/z* 328.3 [M⁺+1]; HPLC: 99.30%; HPLC Quiral: 98.97 %; SOR (c=1, CH₃OH): -11.08.

Síntesis de (2S,3R)-3-hidroxi-2-((R)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (10):

A una solución agitada del compuesto A4 (2 g, 6.16 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) se agregó TFA (1.0 mL, 12.2 mmol) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se llevó hasta TA y se agita durante 2 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), los volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El material de jarabe espeso obtenido se lavó con éter (2 x 50 mL) y se seca bajo vacío para proporcionar el compuesto crudo 10 (2.5 g, sal de TFA) como un jarabe espeso, que se tomó para la siguiente etapa. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 4.24-4.17 (m, 2H), 3.99-3.89 (m, 2H), 3.52-3.39 (m, 2H), 2.46-2.32 (m, 2H), 2.26-2.10 (m, 2H), 1.28

(d, $J = 6.1$ Hz, 3H); LCMS (ESI): m/z 228.1 [$M^+ + 1$].

Síntesis de (2S,3R)-3-hidroxi-2-((R)-5-((S)-2-hidroxipropil)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (Compuesto C):

A una solución agitada del compuesto 10 (sal de TFA, 2 g, 5.86 mmol) en metanol (10 mL) se agregó NaOMe (630 mg, 11.7 mmol) seguido por (S)-2-metiloxirano (510 mg, 8.79 mmol) a TA bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 24 h. Después del consumo del material de partida (por CCD), la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (10 mL) y se concentra bajo presión reducida. El material crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice eluyendo con MeOH al 5%/DCM para proporcionar (2S,3R)-3-hidroxi-2-((R)-5-((S)-2-hidroxipropil)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (185 mg, 12%) como un jarabe espeso. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 4.18-4.07 (m, 2H), 3.90-3.81 (m, 1H), 3.63 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.58 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.11 (dt, $J = 4.2, 8.2$ Hz, 1H), 2.83-2.67 (m, 2H), 2.62-2.54 (m, 1H), 2.26-2.12 (m, 2H), 1.98-1.83 (m, 2H), 1.24 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 1.14 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H); LCMS (ESI): m/z 285.9 [$M^+ + 1$]; HPLC: 97.20%.

EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra la prueba de aprendizaje emocional positivo (PEL). Los experimentos se realizaron como se describe en Burgdorf et al., "The effect of selective

breeding for differential rates of 50-kHz ultrasonic vocalizations on emotional behavior in rats," *Devel. Psychobiol.*, 51:34-46 (2009). La vocalización ultrasónica de rata a 50 kHz (USVs hedónicos) es un modelo validado para el estudio del estado afectivo positivo y se obtiene mejor mediante juego de pelea. Las vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz se han demostrado previamente que se correlacionan positivamente con la recompensa y el comportamiento social apetitivo en ratas, y que reflejan un estado afectivo positivo.

El ensayo PEL mide la adquisición de vocalizaciones (USVs) ultrasónicas positivas (hedónicas) de 50 kHz a un estímulo social, estimulación heterospecífica de juego de pelea. La mano derecha del experimentador administró la estimulación heterospecífica de juego de pelea. Los animales recibieron 3 minutos de juego de pelea heteroespecífico que consistió en bloques alternos de 15 segundos de juego heteroespecífico y 15 segundos de no estimulación. Las vocalizaciones ultrasónicas de alta frecuencia (USV) se registraron y analizaron por sonograma con Avasoft SASlab Pro (Alemania) como lo describió Burgdorf et al. "Positive emotional learning is regulated in the medial prefrontal cortex by GluN2B-containing NMDA receptors," *Neuroscience*, 192:515-523 (2011). Los USV de 50 kHz modulados en frecuencia

que ocurrieron durante cada uno de los periodos de no estimulación se cuantificaron para medir el PEL. Los animales no estaban acostumbrados a la estimulación por juego antes de la prueba. El aprendizaje emocional positivo se midió durante los ensayos de estímulo condicionado (CS) que precedieron a los ensayos de estímulo no condicionado de cosquilleo (SCP). Los animales recibieron ensayos de 15 segundos que consistían en 6 ensayos CS y 6 ensayos UCS cada uno (3 min en total). También se midió la velocidad de carrera de los animales para autoadministrarse el cosquilleo al final de la sesión de 3 minutos.

La FIGURA 1 muestra los resultados de la prueba PEL de rata. Los resultados demuestran que el Compuesto A, cuando se administra una hora antes de la prueba PEL, aumenta el aprendizaje emocional positivo medido por las USVs de ratas, lo que indica un efecto antidepresivo.

EJEMPLO 5

Se investigó la estabilidad microsomal y plasmática del Compuesto A. La siguiente tabla indica el porcentaje de Compuesto A restante después de 60 minutos.

	Humano	Rata
Microsomal	86%	65%
Plasma	100%	92%

También se investigó la concentración de fármacos no

unidos en el cerebro y se realizaron ensayos de unión a proteínas plasmáticas. La siguiente tabla (% unión) indica los resultados para el Compuesto A.

Humano	Rata
25.9%	29.95%

5 La biodisponibilidad del Compuesto A se investigó después de la administración PO. Las muestras de CSF, cerebro y plasma se analizaron después de la dosificación con el Compuesto A (10 mg/kg). La siguiente tabla indica la biodisponibilidad y las relaciones CSF/plasma y
10 cerebro/plasma.

Biodisponibilidad (%F)	42
Relación CSF/Plasma	0.65
Relación Cerebro/Plasma	0.19

EJEMPLO 6

Los ensayos se realizaron según lo descrito por Moskal et al., "GLYX-13: a monoclonal antibody-derived peptide that
15 acts as an N-metil-D-aspartate receptor modulator," Neuropharmacology, 49, 1077-87, 2005. La potenciación de la unión de [³H]MK-801 (5 nM; 22.5 Ci/mmol) a membranas corticales de rata bien lavadas (200 µg) se midió en condiciones de no equilibrio (15 min a 25 °C) en presencia de
20 concentraciones crecientes del compuesto A.

La FIGURA 2 representa la potenciación de unión de

[³H]MK-801 para los subtipos NMDAR2 de tipo natural para A. Como se muestra en la FIGURA 2, el Compuesto A es altamente preferible de NR2A sin unión a NR2D.

EJEMPLO 7

5 A las ratas Sprague Dawley se les administró por vía intravenosa 2 mg/kg del Compuesto A. Un segundo grupo de ratas Sprague Dawley se administró por vía oral con 10 mg/kg del Compuesto A. Las muestras de plasma se tomaron durante un período de 24 h y se analizaron para el Compuesto A.

10 La FIGURA 3 presenta el perfil de concentración-tiempo de plasma promedio del Compuesto A después de la única administración de dosis intravenosa (2 mg/kg) y oral (10 mg/kg) en ratas Sprague Dawley macho durante el período de 24 horas.

15 En otro experimento, a las ratas Sprague Dawley se les administró por vía oral 10 mg/kg de Compuesto A. Las muestras de plasma, cerebro y CSF se analizaron en varios puntos de tiempo durante un período de 24 horas.

20 La FIGURA 4 muestra el perfil de concentración-tiempo en plasma, cerebro y CSF promedio del Compuesto A después de una administración única de una dosis oral (10 mg/kg) en ratas Sprague Dawley macho durante el período de 24 horas.

EJEMPLO 8

Este ejemplo se relaciona con el experimento PEL, como se

indicó anteriormente en el Ejemplo 3. Prueba de vocalizaciones ultrasónicas (USVs) de ratas.

El aprendizaje emocional positivo se midió durante los ensayos de estímulo condicionado (CS) que precedieron a los
 5 ensayos de estímulo no condicionado de cosquilleo (SCP). Los animales recibieron 15 segundos ensayos que consistían en 6 ensayos CS y 6 ensayos UCS cada uno (3 min en total).

La FIGURA 5 muestra los resultados de la prueba de USVs de rata. Los resultados demuestran que el Compuesto B aumenta
 10 el aprendizaje emocional positivo en la prueba de USVs de ratas, lo que indica un efecto antidepresivo.

EJEMPLO 9

Se investigó la estabilidad microsomal y plasmática del Compuesto B. La siguiente tabla indica el porcentaje de
 15 Compuesto B restante después de 60 minutos.

	Humano	Rata
Microsomal	87%	81%
Plasma	100%	89%

También se investigó la concentración de fármacos no unidos en el cerebro, y se realizaron ensayos de unión a proteínas plasmáticas. La siguiente tabla (% límite) indica
 20 los resultados para el Compuesto B.

Humano	Rata
28.8%	19.8%

Se investigó la biodisponibilidad del Compuesto B. Las muestras de CSF, cerebro y plasma se analizaron después de la dosificación con el Compuesto B. La siguiente tabla indica la biodisponibilidad y las relaciones CSF/plasma y cerebro/plasma.

Biodisponibilidad (%F)	38
Relación CSF/Plasma	0.70
Relación Cerebro/Plasma	0.18

El Compuesto A y el Compuesto B tienen una biodisponibilidad oral más baja, pero una mayor proporción puede llegar al CSF y al cerebro.

10 **EJEMPLO 10**

Los ensayos se realizaron como se describe anteriormente en el Ejemplo 5, por Moskal *et al.* (2005). La potenciación de la unión de [³H]MK-801 (5 nM; 22.5 Ci/mmol) a membranas corticales de rata bien lavadas (200 µg) se midió en condiciones de no equilibrio (15 min a 25 °C) en presencia de concentraciones crecientes del Compuesto B. La FIGURA 6 muestra la potenciación de unión de [³H]MK-801 para los subtipos NMDAR2 de tipo salvaje para el Compuesto B. El compuesto B es altamente preferible de NR2B y NR2D con una potencia más baja en NR2A y NR2C.

EJEMPLO 11

Las ratas Sprague Dawley recibieron una dosis intravenosa de

2 mg/kg del Compuesto B. Un segundo grupo de ratas Sprague Dawley recibió una dosis por vía oral con 10 mg/kg del Compuesto B. Las muestras de plasma se tomaron durante un período de 24 h y se analizaron para el Compuesto B.

5 La FIGURA 7 representa el perfil de concentración-tiempo de plasma promedio del Compuesto B después de una administración de dosis única intravenosa (2 mg/kg) y oral (10 mg/kg) en ratas Sprague Dawley macho durante un período de 24 horas.

10 En otro experimento, a las ratas Sprague Dawley se les administró por vía oral 10 mg/kg de Compuesto B. Las muestras de plasma, cerebro y CSF se analizaron en varios puntos de tiempo durante el período de 24 horas.

15 La FIGURA 8 representa los perfiles de concentración-tiempo de plasma, cerebro y CSF promedio del Compuesto B después de una administración de dosis única oral (10 mg/kg) en ratas Sprague Dawley macho durante el período de 24 horas.

EJEMPLO 12

20 El ensayo de MN (micronúcleo) *in vitro* se realizó para el Compuesto A. El ensayo también se realizó para el Compuesto B. La citotoxicidad se presenta como el % del crecimiento de control. Se marca un valor de citotoxicidad inferior al 60%, y el compuesto se considera tóxico a la concentración respectiva. Los resultados del ensayo de MN *in vitro* para el

Compuesto A se muestran en la FIGURA 9. Los resultados del ensayo de MN *in vitro* para el Compuesto B se muestran en la FIGURA 10.

El ensayo de Ames se realizó para cada uno del Compuesto A y el Compuesto B. Para los resultados del ensayo de Ames, los guiones (-) indican resultados negativos. Los positivos débiles, si $p < 0.05$, se denotan como "+". Los positivos fuertes, si $p < 0.01$, se denotan como "++". Los positivos muy fuertes, si $p < 0.001$, se denotan como "+++". Los resultados del ensayo de Ames para el Compuesto A se muestran en la FIGURA 9. Los resultados del ensayo de Ames para el Compuesto B se muestran en la FIGURA 10.

Se realizó un ensayo de hERG utilizando el Compuesto A para identificar posibles interacciones del canal hERG. Además, se realizó un ensayo de hERG utilizando el Compuesto B. Para hERG, se considera que los resultados que muestran una inhibición o estimulación superior al 50% representan efectos significativos sobre el compuesto de prueba. Los resultados del ensayo de hERG para el Compuesto A se muestran en la FIGURA 9 y los resultados del ensayo hERG para el Compuesto B se muestran en la FIGURA 10.

EJEMPLO 13

Los déficits cognitivos/de lesión cerebral traumática inducida por blastos individuales se indujeron, modificados

para su uso en ratas según el protocolo de Goldstein et al.,
"Chronic traumatic encephalopathy in blast-exposed military
veterans y a blast neurotrauma mouse model," Science
Translational Medicine, Vol. 4, Issue 134, pp. 134ra60, 2012.

5 Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho de 2-3 meses de
edad. Las ratas se alojaron en jaulas de Lucite con lecho de
astillas de álamo, se mantuvieron en un ciclo de
luz:oscuridad de 12:12 (luces encendidas a las 5 AM) y se les
dio acceso ad libitum a Purina Lab Chow (E.U.A) y agua del
10 grifo durante todo el estudio. Las ratas se anestesiaron
primero usando 3.5-4% de isoflurano, luego las orejas se
protegieron con tapones de espuma de 1.5 x 1.5 mm (Pura-Fit®,
Moldex-Metric Inc., Culver City, California) y la rata se
colocó en una contención torácica para roedores de acceso a
15 la cabeza (Stoelting, E.U.A) para proteger el cuerpo y
permitir que la cabeza se mueva libremente. Un tubo de choque
de aluminio (183 x 61 cm; L-3 Applied Technologies, E.U.A) Se
colocó a 10 cm de la cabeza de la rata. Las ratas recibieron
una única explosión de helio de ~42 PSI generada al perforar
20 0.035 cm (0.014 pulgadas) de película de poliéster. Los
controles falsos se colocaron fuera del radio de explosión. A
los animales se les administró el Compuesto A (10 mg/kg PO),
el Compuesto B (10 mg/kg PO) o el 0.5% de Na-CMC en un
vehículo salino estéril al 0.9% (1 ml/kg PO) 1 h después de

la explosión.

El PEL (aprendizaje emocional positivo) se realizó 48 horas después de la explosión. El juego de pelea heteroespecífico se realizó según lo descrito previamente por Burgdorf et al., "The long-lasting antidepressant effects of rapastinel (GLYX-13) are associated with a metaplasticity process in the medial prefrontal cortex y hippocampus," Neuroscience 308:202-211, 2015. La mano derecha del experimentador administró la estimulación heteroespecífica de juego de pelea. Los animales recibieron 3 minutos de juego de pelea heteroespecífico que consistió en bloques alternos de 15 segundos de juego heteroespecífico y 15 segundos de no estimulación. Las vocalizaciones ultrasónicas de alta frecuencia (USVs) se registraron y analizaron por sonograma con Avisoft SASLab Pro (Alemania) como lo describió Burgdorf et al., "Positive emotional learning is regulated in the medial prefrontal cortex by GluN2B-containing NMDA receptors," Neuroscience, 192:515-523, 2011. Las USVs de 50 kHz modulados en frecuencia que ocurrieron durante cada uno de los periodos de no estimulación se cuantificaron para medir el PEL. Los animales no estaban acostumbrados a la estimulación por juego antes de la prueba.

Los resultados del estudio PEL para los Compuestos A y B se informan en las FIGURAS 11 y 12.

EJEMPLO 14

Este ejemplo se relaciona con la evaluación del efecto ansiolítico del tratamiento en el modelo de ansiedad inducida por el estrés, la hipofagia inducida por novedad. Este ensayo
5 también es sensible a los antidepresivos de acción rápida ketamina y GLYX-13 (Li et al., "mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists," Science 329:959-964, 2010; y Burgdorf et al., 2013). Véase también Bodnoff et al., "A comparison of the
10 effects of diazepam versus several typical y atypical antidepressant drugs in an animal model of anxiety," Psychopharmacology, 97:277-279, 1989.

Las pruebas se realizaron como se describe en (Burgdorf et al., 2013). Se usó una versión de la prueba de hipofagia
15 inducida por novedad (NIH) que se ha demostrado anteriormente para detectar el efecto ansiolítico agudo de la ketamina (Li et al., 2010). Los animales se privaron de alimento durante la noche antes de la prueba, y se colocó la comida de laboratorio en la cámara central de un campo abierto
20 (40x40x20 cm) durante 10 minutos bajo una luz roja tenue. Entre las pruebas de cada animal, se eliminaron del aparato las heces y la orina. Después de las pruebas de NIH, la latencia para comer en la jaula de la casa del animal se determinó como un control para garantizar que el efecto sobre

la alimentación sea específico para el nuevo entorno. Los animales se grabaron en video, y la latencia (seg) para que el animal tomara el primer bocado de alimento se marcó manualmente fuera de línea.

5 Un único punto por grupo de dosis que eran 2 o más desviaciones estándar de la media se consideró un valor atípico y se excluyó del análisis de datos. ED₅₀ se definió como la dosis (o interpolación logarítmica lineal de la dosis) que exhibió un efecto medio máximo (promedio de la
10 dosis eficaz máxima y del vehículo) a partir de un gráfico de log (dosis) lineal (valor NIH). La dosis máxima eficaz se definió como la dosis más baja que fue estadísticamente diferente del vehículo pero estadísticamente equivalente (según PLSD de Fisher; conjunto α de 0.05) a las dosis más
15 altas.

Los resultados se muestran en las FIGURAS 13 y 14. Como se muestra en la FIGURA 13, el Compuesto A produce un efecto ansiolítico en la prueba de hipofagia inducida por novedad (NIH) en ratas. Latencia media $\pm$ SEM para comer en la prueba
20 de hipofagia inducida por novedad (NIH) en ratas SD macho de 2-3 meses de edad tratadas con el Compuesto A (10-1000 μ g/kg PO; círculos azules) o solución salina estéril + vehículo de Na-CMC al 0.5% (1 ml/kg PO; círculo negro) 1 h antes de una sesión de prueba de 10 minutos. Los animales se privaron de

alimento durante la noche antes de la prueba, y se colocó comida de laboratorio en la cámara central del campo abierto durante la prueba.

Como se muestra en la FIGURA 14, el compuesto B produce un efecto ansiolítico en la prueba de hipofagia inducida por novedad (NIH) en ratas. Latencia media $\pm$ SEM para comer en el ensayo de hipofagia inducida por novedad (NIH) en ratas SD macho de 2-3 meses de edad tratadas con Compuesto B (0.0001-1 μ g/kg PO; círculos azules) o solución salina estéril + vehículo de Na-CMC al 0.5% (1 ml/kg PO; círculo negro) 1 h antes de una sesión de prueba de 10 minutos. Los animales se privaron de alimento durante la noche antes de la prueba, y se colocó comida de laboratorio en la cámara central del campo abierto durante la prueba.

15 **EJEMPLO 15**

El modelo de analgesia mecánica de Bennett se utiliza para evaluar los efectos analgésicos de los compuestos, medidos por el umbral de retirada de la pata. Bennett GJ, Xie YK, "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man," Pain 33:87-107, 1988.

La cirugía de lesión nerviosa reparada se realiza en animales con pruebas de respuesta analgésica una vez que los animales se han recuperado de la cirugía, pero aún muestran un umbral bajo de retirada de la pata después de la aplicación de los

filamentos de von frey. Los animales del vehículo reciben la cirugía y luego reciben el vehículo en lugar del compuesto de prueba. Los animales se analizaron 1 h, 24 h y 1 semana después de la prueba del compuesto o la administración del
5 vehículo.

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho de 2-3 meses de edad. Harlan fue el proveedor de todos los estudios. Las ratas se alojaron en jaulas de Lucite con lecho de astillas de álamo, mantenidas en un ciclo de luz:oscuridad 12:12
10 (luces encendidas a las 5 AM) y se les dio acceso ad libitum a Purina Lab Chow (E.U.A) y agua del grifo durante todo el estudio.

Las ratas se anestesiaron con isoflurano inhalado (2.5%). La cirugía de lesión nerviosa reparada se realizó
15 como se describió anteriormente (Bennett y Xie, 1988). Se realizó una incisión (~1.5 cm de longitud) con una hoja de bisturí dorsalmente a través de la piel en la extremidad posterior derecha, paralela y posterior al fémur. Usando un pequeño hemostato puntiagudo, se separaron los músculos
20 bíceps femoral y glúteo superficial. Usando fórceps romos curvos, el nervio ciático común fue aislado y expuesto. Para los estudios de analgesia mecánica, se ligó todo el nervio ciático. Usando hemostáticos/fórceps y tripa crómica (5-0), el nervio se ligó ligeramente con un nudo cuadrado; se

colocaron 3 ligaduras, separadas 1 mm en el nervio. Las ligaduras se apretaron hasta el punto de que la sutura no se deslizó hacia arriba o hacia abajo del nervio. Este protocolo dio lugar a una pérdida parcial de la función del nervio.

5 Para los estudios de analgesia térmica, se ligaron y cortaron las ramas peroneas y tibiales comunes del nervio ciático, y se salvó la rama sural. Ver Decosterd I, Woolf CJ, "Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain," Pain 87:149-158, 2000. Las pruebas se
10 realizaron 1-2 semanas después de la cirugía.

Durante la prueba, las ratas se aclimataron a la superficie de una rejilla de malla de alambre suspendida (1 cm x 1 cm, con el alambre de 0.3 cm de diámetro) durante 15-20 min. Comenzando desde el más pequeño, cada filamento de
15 Von Frey se presionó perpendicularmente a la superficie plantar de la pata trasera afectada (ipsilateral) hasta que esté ligeramente doblada y luego se mantiene durante 6 segundos. Si no se observó una retirada obvia de la pata trasera o un comportamiento de encogimiento inmediatamente
20 después de la extracción del filamento, se usó el siguiente filamento más grande de la misma manera. En caso de respuesta, se utilizó un filamento inferior. Esto se repitió hasta que se recolectaron seis respuestas.

La prueba se realizó 1 h después de la dosificación con

el Compuesto A y el Compuesto B (0.1-10 mg/kg PO), gabapentina (150 mg/kg PO) o 0.5% de Na-CMC en solución salina estéril al 0.9%. Los animales se volvieron a analizar 24 horas y 1 semana después de la dosificación. Los resultados para el Compuesto A se muestran en la FIGURA 15 y los resultados para el Compuesto B se muestran en la FIGURA 16. Para ambos compuestos, una dosis única de 10 mg/kg PO produjo un efecto analgésico mecánico en el modelo de Bennett 1 h, 24 h y 1 semana después de la administración, mientras que la gabapentina solo produjo un efecto analgésico 1 h después de la administración.

EJEMPLO 16

Se realizó un estudio de farmacología *in vivo* no clínico (ensayo de Porsolt) para medir los efectos similares a los antidepresivos. Se usó un control negativo (0.5% de carboximetilcelulosa de sodio en un vehículo salino estéril al 0.9%) y un control positivo (Compuesto D) para comparar el Compuesto A y el Compuesto B. El estudio permitió la construcción de una curva de dosis-respuesta de los efectos de cada compuesto en la prueba de natación forzada de Porsolt según lo evaluado por la respuesta de las ratas (tiempo de flotación reducido) durante una prueba de natación de 5 minutos.

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho de 2-3 meses

(Harlan, Indianápolis, IN). Las ratas se alojaron en jaulas de Lucite con cama de astillas de álamo, se mantuvieron en un ciclo de luz:oscuridad de 12: 12 (luces encendidas a las 5 AM), y se les dio acceso ad libitum a Purina Lab Chow (E.U.A) y agua del grifo durante todo el estudio.

La prueba de natación forzada de Porsolt, adaptada para su uso en ratas, se realizó según lo descrito por Burgdorf et al., (The long-lasting antidepressant effects of rapastinel (GLYX-13) are associated with a metaplasticity process in the medial prefrontal cortex y hippocampus. Neuroscience 308:202-211, 2015). Los animales se colocaron en un tubo de vidrio transparente de 46 cm de alto x 20 cm de diámetro lleno a 30 cm con agua del grifo (23 ± 1 °C) durante 15 minutos el primer día (habitación) y 5 minutos el día de la prueba posterior. Los animales se analizaron 1 h después de la dosis con los compuestos (Compuesto A y Compuesto B), control positivo (Compuesto D, 10 µg/kg) o vehículo (carboximetilcelulosa sódica al 0.5% (Na-CMC) en solución salina estéril al 0.9%). El agua se cambió después de cada animal. Los animales fueron grabados en video, y el tiempo de flotación definido como la cantidad mínima de esfuerzo requerido para mantener a los animales cabeza arriba del agua fue calificado fuera de línea por un experimentador a ciegas con una alta confiabilidad entre los evaluadores (r de

Pearson > 0.9).

El EC_{50} se definió como la dosis (o interpolación logarítmica lineal de la dosis) que exhibió un efecto medio máximo (promedio del vehículo y dosis máxima eficaz) de un gráfico lineal log (dosis). La dosis máxima eficaz se definió como la dosis más baja que fue estadísticamente diferente del vehículo pero estadísticamente equivalente (según la PLSD de Fisher) a las dosis más altas.

Los resultados para el Compuesto A se muestran en la FIGURA 17. A ratas Sprague Dawley macho adultas se les administró el Compuesto A (10-1000 $\mu\text{g/kg}$ PO; círculos azules o puntos de datos conectados a través de líneas), Compuesto D de control positivo (10 $\mu\text{g/kg}$ PO; círculo verde o el punto de datos a 10 $\mu\text{g/kg}$ PO) o Na-CMC en solución salina al 0.9% (1 ml/kg PO; círculos negros o puntos de datos a 1 ml/kg PO) 1 h antes de la prueba. Se muestra el tiempo de flotación medio $\pm$ SEM en la prueba de Porsolt de rata. Los animales recibieron una sesión de habituación de 15 minutos 1 día antes de la prueba de 5 minutos. N = 6-18 por grupo. Como se muestra, el Compuesto A produce un efecto antidepresivo medido por el tiempo de flotación reducido en la prueba de Porsolt en comparación con el grupo de vehículo 1 h después de la dosificación.

Los resultados para el Compuesto B se muestran en la

FIGURA 18. A ratas Sprague Dawley macho adultas se les administró el Compuesto B (0.1-10 µg/kg PO; círculos azules o puntos de datos vinculados con la línea), Compuesto D de control positivo (10 µg/kg PO; círculo verde o punto de datos a 10 µg/kg PO), o Na-CMC en solución salina al 0.9% (1 ml/kg PO; círculos negros o puntos de datos a 1 ml/kg PO) 1 h antes de la prueba. Se muestra el tiempo de flotación medio ± SEM en la prueba de Porsolt de rata. Los animales recibieron una sesión de habituación de 15 minutos 1 día antes de la prueba de 5 minutos. N = 6-18 por grupo. Como se muestra, el Compuesto B produce un efecto antidepresivo medido por el tiempo de flotación reducido en la prueba de Porsolt en comparación con el grupo de vehículos 1 hora después de la dosificación.

15 **EJEMPLO 17**

La siguiente tabla muestra los datos comparativos de unión *in vivo* para los subtipos NMDAR2 de tipo salvaje en presencia del Compuesto A, Compuesto B, (R)-2-((2S,3R)-1-amino-3-hidroxi-1-oxobutan-2-il)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-carboxilato de tert-butilo (Compuesto W), (S)-2-((2S,3R)-1-amino-3-hidroxi-1-oxobutan-2-il)-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-5-carboxilato de tert-butilo (Compuesto X), (2S,3R)-3-hidroxi-2-((R)-5-isobutiril-1-oxo-2,5-diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (Compuesto Y), o

(2S,3R)-3-hidroxi-2-((S)-5-isobutiril-1-oxo-2,5-

diazaspiro[3.4]octan-2-il)butanamida (Compuesto Z).

Compuesto	PERFIL DE UNIÓN DE NMDAR2A			PERFIL DE UNIÓN DE NMDAR2B		
	-logEC ₅₀	Glicina % 1 mM	Conclusión	-logEC ₅₀	Glicina % 1 mM	Conclusión
Compuesto W	-11.35	18.33	Agonista WT2A	-8.976	53.09	Agonista WT2B
Compuesto X	-12.01	41.04	Agonista WT2A	-9.833	59.55	Agonista WT2B
Compuesto Y	-11.05	61.76	Agonista WT2A	-13.36	70.74	Agonista WT2B
Compuesto Z	-10.06	42.5	Agonista WT2A	-13	70.49	Agonista WT2B
Compuesto A	-11.34	47.42	Agonista WT2A	-8.51	68.22	Agonista WT2B
Compuesto B	-9.01	24.48	Agonista WT2A	-13.11	49.02	Agonista WT2B
Compuesto W	-9.839	67.5	Agonista WT2C	-11.15	66.72	Agonista WT2D
Compuesto X	-12.9	59.73	Agonista WT2C	-11.88	93.58	Agonista WT2D
Compuesto Y	-11.44	64.24	Agonista WT2C	-9.999	54.85	Agonista WT2D
Compuesto Z	-11.5	47.76	Agonista WT2C	-11.22	65.32	Agonista WT2D
Compuesto A	-8.822	66.21	Agonista WT2C	0	0	Agonista WT2D
Compuesto B	-13.02	85.37	Agonista WT2C	-8.4	66.21	Agonista WT2D

EQUIVALENTES

- 5 Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descritas en la presente. Dichos equivalentes están destinados a incluirse en las siguientes reivindicaciones.

10 INCORPORACIÓN PARA REFERENCIA

El contenido completo de todas las patentes, solicitudes de patentes publicadas, sitios web y otras referencias citadas en la presente se incorporan aquí expresamente en su totalidad por referencia.