

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 672**

51 Int. Cl.:

C07D 207/16 (2006.01)

C07D 403/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2013 PCT/EP2013/073460**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072498**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2013 E 13794837 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2917209**

54 Título: **Derivados de 1-[1-(benzoil)-pirrolidin-2-carbonil]-pirrolidin-2-carbonitrilo**

30 Prioridad:

12.11.2012 EP 12382446

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

04.07.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE BARCELONA (33.3%)
Centro de Patentes de la UB C. Baldiri Reixac, 4
08028 Barcelona, ES;
FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA
IRB (BARCELONA) (33.3%) y
IPROTEOS S.L. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GIRALT LLEDÓ, ERNEST;
TARRAGÓ CLUA, TERESA;
PRADES COSANO, ROGER y
ROYO GRACIA, SOLEDAD**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 621 672 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de 1-[1-(benzoil)-pirrolidin-2-carbonil]-pirrolidin-2-carbonitrilo

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad farmacológica, y más particularmente a algunos derivados de 1-[1-(benzoil)-pirrolidin-2-carbonil]-pirrolidin-2-carbonitrilo, a los procedimientos de preparación de tales compuestos, a composiciones farmacéuticas que los comprenden y a su uso en terapia y/o profilaxis de trastornos cognitivos.

ANTECEDENTES

10 La prolil oligopeptidasa (EC 3.4.21.26) (POP), también conocida como prolil endopeptidasa (PREP), es una serín proteasa que cataliza la hidrólisis de péptidos en el lado C-terminal de residuos de L-prolina. Está ampliamente distribuida en mamíferos y puede purificarse a partir de diversos órganos, incluyendo el cerebro.

La enzima desempeña un papel importante en la degradación de neuropéptidos que contienen prolina relacionados con funciones de aprendizaje y memoria (Wilk S *et al*, Life Sci. 1983;33:2149-57; O'Leary RM, O'Connor B, J. Neurochem. 1995;65:953-63).

15 Se han sometido a prueba los efectos de la inhibición de la prolil oligopeptidasa en el tratamiento de déficits cognitivos relacionados con procesos neurodegenerativos. Se generó enfermedad de Parkinson en monos mediante el tratamiento con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), una neurotoxina que produce la reducción de la sustancia P. El tratamiento posterior con S-17092, un potente inhibidor de POP aumentó el rendimiento de las tareas cognitivas (Schneider JS *et al*, Neuropsychopharmacology 2002;26(2):176-82). También se ha encontrado que la inhibición de POP previene la oligomerización de α -sinucleína *ex vivo* [Myöhänen TT *et al*, Br. J. Pharmacol. 2012;166(3):1097-1113]. En el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA), varios experimentos *in vivo* en modelos animales mostraron que la inhibición de POP llevó a efectos neuroprotectores y de potenciación de la cognición (Kato A *et al*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997;283(1):328-35 y Toide K *et al*, Rev. Neurosci. 1998; 9(1):17-29). El grupo de Katsube observó originalmente efectos neuroprotectores cuando se impidió la apoptosis inducida por edad en las células del gránulo cerebeloso y cortical mediante el tratamiento con el inhibidor de POP ONO-1603 (Katsube N *et al*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999;288(1):6-13).

20 Sólo se han realizado ensayos clínicos con inhibidores de POP en el tratamiento de déficits cognitivos en algunos casos. En un estudio clínico de fase I, el grupo de Morain (Morain P *et al*, Br. J. Clin. Pharmacol. 2000;50(4):350-9) encontró que S 17092, un nuevo inhibidor de prolil endopeptidasa activo por vía oral, mostraba propiedades de potenciación de la cognición en sujetos ancianos sanos y una clara dependencia de la dosis; además, no se detectaron efectos adversos. Estudios posteriores sugirieron ligeras propiedades de estabilización del estado de ánimo adicionales por parte de este compuesto (Morain P *et al*, Neuropsychobiology 2007;55(3-4):176-83).

30 Se ha informado de que la actividad de la prolil oligopeptidasa se ve alterada (post-mortem) en varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis múltiple (EM) (Mantle D *et al*, Clin. Chim. Acta 1996;249(1-2):129-39).

40 También hay una cantidad sustancial de datos experimentales que apuntan a un papel de la neuroinflamación en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas tales como la EA, la EM y la enfermedad de Parkinson (Hirsch EC *et al*, Lancet Neurol 2009;8(4):382-97, Philips T *et al*, Lancet Neurol 2011;10(3):253-63). Se ha considerado que POP es la principal enzima implicada en la liberación de un tetrapéptido antiinflamatorio Ac-SDKP a partir de T β 4 en el cerebro (Yang F *et al*, Hypertension 2004;43(2):229-36, Nolte WM *et al*, Biochemistry, 2009;48(50):11971-81). Esto sugiere que la inhibición de POP puede ayudar a reducir la neuroinflamación y en consecuencia los inhibidores de POP pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas con un componente inflamatorio tales como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson y, en particular, pueden ayudar a mejorar los trastornos cognitivos asociados con estas enfermedades.

45 Las placas seniles que se extienden sobre las áreas cerebrales corticales son los sellos distintivos neuropatológicos típicos de la EA. El componente proteico principal de estas placas es el péptido amiloide β (A β). La deposición de A β desencadena disfunción neuronal y muerte en el cerebro. Este péptido se deriva de la proteína precursora de β -amiloide (APP). En condiciones normales, la APP se escinde mediante la α -secretasa para generar APP α soluble que evita la generación de A β .

50 Resulta interesante que la inhibición de POP aumenta los niveles intracelulares de IP3, lo que puede contribuir a la estimulación de la producción de APP α , que a su vez disminuye la generación de A β .

Además, Rossner (S Rossner *et al*, Neurochem. Res. 2005;30(6-7):695-702) encontraron menos neuronas inmunorreactivas a POP en estructuras cerebrales de pacientes con EA afectadas por placas A β .

Además, parece que la sustancia P puede suprimir la acción neurotóxica de la proteína β -amiloide (Kowall NW *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991;88(16):7247-51). Los inhibidores de la prolil oligopeptidasa inhiben el metabolismo de la sustancia P, contribuyendo a mantener los niveles de la sustancia P que pueden suprimir la acción neurotóxica de la proteína β -amiloide.

- 5 En vista de los efectos anteriormente mencionados, se cree que los inhibidores de prolil oligopeptidasa pueden ser fármacos útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer ayudando a mejorar los trastornos cognitivos asociados con la enfermedad.

La prolil oligopeptidasa también se ha asociado con varios factores que podrían ser relevantes para la esclerosis múltiple (EM). Por ejemplo, POP está implicada en la regulación de la toxicidad de la microglía (Klegeris A *et al*, Glia 2008;56(6):675-85). De hecho, un informe reciente estableció una conexión directa entre POP y la EM; las actividades de POP en plasma de pacientes con EM-RR se redujeron significativamente (Tenorio-Laranga J *et al*, J. Neuroinflammation 2010;7:23). Resulta interesante que la reducción se correlacionaba con la gravedad de los síntomas de la enfermedad, pero no con la edad del paciente. En cambio, se observó una correlación inversa entre la actividad de POP y la edad en controles sanos, y en controles de ancianos los niveles eran comparables a los encontrados en pacientes con EM.

El sello distintivo neuropatológico de la enfermedad de Parkinson es la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas melanizadas en la parte compacta de la sustancia negra junto con inclusiones intracelulares conocidas como cuerpos de Lewy. Un componente principal de los cuerpos de Lewy es una proteína de 140 aminoácidos, la α -sinucleína. En determinadas condiciones, los monómeros de α -sinucleína interaccionan para formar agregados prefibrilares o protofibrillas, que pueden crear fibrillas citotóxicas insolubles. Estas fibrillas no pueden degradarse por el proteasoma y alteran la función de este sistema proteolítico intracelular. Esto conduce a una acumulación de protofibrillas de α -sinucleína (y otras proteínas que se degradan por el proteasoma) en el citosol (Bennett MC, Pharmacol. Ther. 2005;105(3):311-31) y, como consecuencia, las protofibrillas de α -sinucleína se incrementan en cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson. Estas fibrillas se han asociado con la neurotoxicidad en células que sobreexpresan α -sinucleína y en modelos de ratón (Masliah E *et al*, Science 2000;287(5456):1265-9; Gosavi N *et al*, J. Biol. Chem. 2002;277(50):48984-92). La acumulación anómala de α -sinucleína incorrectamente plegada puede conducir a cambios mitocondriales que pueden promover el estrés oxidativo y provocar la muerte celular (Hsu LJ *et al*, Am. J. Pathol 2000;157(2):401-10). Más aún, se sabe que tres mutaciones puntuales (A53T, A30P o E46K) en el gen de la α -sinucleína están implicados en la patogénesis de la forma familiar de la enfermedad de Parkinson (Polymeropoulos MH *et al*, Science 1997;276(5321):2045-7; Zarranz JJ *et al*, Ann Neurol 2004;55 (2):164-73).

Se ha demostrado *in vitro* que la velocidad de agregación de α -sinucleína se potenció cuando la proteína se incubó con un clon de POP porcino de tipo silvestre, y esta potenciación dependía de la concentración de POP (Brandt I *et al*, Peptides 2008;29(9):1472-8). Además, una variante mutada sin actividad de POP (S544A) no aceleró la velocidad de agregación.

La agregación potenciada también pudo evitarse mediante la adición de inhibidores de POP, lo que sugiere que el efecto era dependiente de la actividad enzimática de POP. Experimentos recientes han sugerido que los inhibidores de POP pueden bloquear el aumento de la agregación de α -sinucleína inducida por estrés oxidativo en células humanas de neuroblastoma que sobreexpresan α -sinucleína (SH-SY5Y) Myöhänen TT *et al*, Fr. J. Pharmacol. 2012;166(3):1097-113. POP se colocaliza con α -sinucleína en células SH-SY5Y, y esta colocalización desaparece después de la incubación con inhibidores de POP, lo que apunta a una interacción entre POP y α -sinucleína. Un tratamiento de 5 días con un inhibidor de POP redujo la cantidad de α -sinucleína soluble en el cerebro de ratones transgénicos para α -sinucleína, A30P.

De esta forma, la inhibición de la actividad de POP podría prevenir la agregación de α -sinucleína y, por tanto, prevenir la formación de las protofibrillas citotóxicas presentes en los cuerpos de Lewy. Por lo tanto, los inhibidores de POP podrían tener potencialmente valor terapéutico en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos donde se ha descrito una agregación acelerada de α -sinucleína.

Los compuestos que pueden inhibir POP son eficaces para prevenir la amnesia experimental inducida por escopolamina en ratas, deduciéndose que los inhibidores de POP tienen funciones en la paliación de disfunciones mnemónicas (Yoshimoto T *et al*, J. Pharmacobiodyn 1987;10:730-5).

Se sometió a prueba el efecto de la administración subcrónica de ácido rosmarínico, un inhibidor no competitivo de POP (con un valor relativamente alto de CI50 de 63,7 μ M), en el laberinto de agua de Morris con ratas, y se notificó una potenciación en la memoria espacial (Park DH *et al*, Fitoterapia 2010;81(6):644-8).

Se ha encontrado que los pacientes con trastorno bipolar tienen altos niveles de actividad de POP en suero. En los últimos años, POP ha adquirido importancia como diana para el tratamiento de esta enfermedad, especialmente debido a su implicación en el metabolismo de inositol-1,4,5-P3 (IP3). IP3 es una molécula clave en la transducción de la señal en la cascada de neuropéptidos. A través de la unión a receptores específicos, los neuropéptidos

inducen un aumento de IP3, que se une a su receptor en la membrana del retículo endoplasmático e induce la liberación de Ca²⁺, que se cree que desempeña un papel crucial en el aprendizaje y la memoria. Descubrimientos recientes han mostrado que POP modula la concentración de IP3 (Komatsu Y J. *Neurosci* 1996;16:6342-52). Así, se sabe que una alteración del gen de POP en eucariotas *Dictyostelium discoideum* induce resistencia al litio a través de la elevación de IP3 (Schulz I *et al*, *Eur. J. Biochem* 2002;269:5813-20), y también reduce la actividad proteolítica de POP, que es responsable de la alta concentración de IP3 en antisentido de células de glioma humano para POP. Este efecto se observa también cuando estas células se tratan con inhibidores específicos de POP (Williams RS *et al*, *EMBO J.* 1999;18:2734-45).

La ruta de señalización de IP3 está implicada en la acción de varios fármacos estabilizadores del estado de ánimo (litio, carbamazepina y ácido valproico) y defectos en los mecanismos que regulan la señalización de IP3 pueden provocar trastorno bipolar. Además, el fármaco estabilizador del estado ánimo que se utiliza comúnmente para tratar el trastorno bipolar, el ácido valproico, inhibe directamente la actividad de POP recombinante (Cheng L *et al*, *Mol Cell Neurosci* 2005;29:155-61). En resumen, hay una fuerte evidencia de que los inhibidores de POP son útiles en la prevención y/o el tratamiento del trastorno afectivo bipolar en mamíferos. Por lo tanto, proporcionar inhibidores novedosos de POP es interesante en el tratamiento de este trastorno o enfermedad.

En resumen, se han caracterizado los efectos de varios inhibidores de POP en diversas tareas cognitivas, y hay una especie de consenso de que los inhibidores de POP tienen efectos positivos sobre el aprendizaje y la memoria (Morain P *et al*, *CNS Drug Rev.* 2002;8(1):31-52; Shinoda M *et al*, *Eur. J. Pharmacol.* 1996;305(1-3):31-8; Marighetto A *et al*, *Learn. Mem.* 2000;7(3):159-69; Toide K *et al*, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997;56(3):427-34; Schneider JS *et al*, *Neuropsychopharmacology* 2002;26(2):176-82).

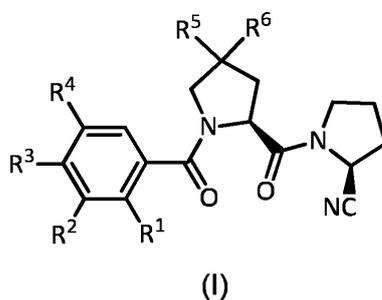
Varias patentes y solicitudes de patente describen inhibidores de POP: documentos WO 2008/077978 A1, WO 2005/027934 A1, JP 2011-037874 A2, WO 2005/002624 A1, WO 2004/060862 A2, WO 03/04468 A1; DE 196 03 510 A1, US 2006/0100253 A1 y US 6.159.938 A, pero sólo algunos compuestos han sido objeto de estudios *in vivo* (JTP-4819, S 17092, Z-321, ONO-1603, Y-29794, ZTTA, Z-Pro-Prolinal y KYP-2047), sólo los tres primeros de la lista han entrado en ensayos clínicos y ninguno de ellos ha llegado al mercado.

A pesar de la existencia de inhibidores de POP, todavía existe una necesidad en la técnica de proporcionar compuestos alternativos con alta afinidad por POP y buena capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica para alcanzar el cerebro, donde tiene lugar la acción del inhibidor, cuando se usa para tratar trastornos cognitivos. Esta es una característica importante para que los compuestos sean buenos candidatos para el uso en la terapia de trastornos cognitivos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Ahora, los inventores han encontrado satisfactoriamente que una serie de derivados de 1-[1-(benzoil)-pirrolidin-2-carbonil]-pirrolidin-2-carbonitrilo no sólo son capaces de inhibir POP con una alta potencia, sino que también son capaces de atravesar una membrana artificial paralela, que es un método bien aceptado para predecir la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Estas dos propiedades hacen que los compuestos de la presente invención sean candidatos ideales para su uso en la terapia de trastornos cognitivos.

Así, un aspecto de la invención se refiere a compuestos que tienen la fórmula (I):



en la que

R¹, R², R³ y R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alcoxilo C₁₋₄, alquilcarboniloxilo C₁₋₄, benciloxilo, fenilcarboniloxilo, naftil-carboniloxilo, quinolinilcarboniloxilo, isoquinolinilcarboniloxilo, trifluorometilo, halógeno e hidrógeno;

R⁵ se selecciona del grupo que consiste en halógeno, nitrilo, alcoxilo C₁₋₄, alquiltio C₁₋₄, alquilo C₁₋₄, alquilcarboniloxilo C₁₋₄, fenilo, fenoxilo, feniltio y trifluorometilo;

R⁶ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, flúor y metilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos.

Otro aspecto de la invención se refiere a procedimientos para la preparación de un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos.

- 5 Otro aspecto de esta invención se refiere a un medicamento o composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 Otro aspecto de esta invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos, para su uso como medicamento, particularmente para la prevención y/o el tratamiento de trastornos cognitivos.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un gráfico que compara los resultados obtenidos en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR) para PBS + vehículo, MK-801 + vehículo y MK-801 y el compuesto del ejemplo 4.

- 15 La figura 2 es un gráfico que compara los resultados obtenidos en la prueba de la tarea de evitación pasiva para PBS + vehículo, MK-801 + vehículo y MK-801 y el compuesto del ejemplo 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen el significado que se detalla a continuación.

- 20 Tal como se usa en el presente documento alquilo C_{1-4} , como grupo o parte de un grupo, define radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono tales como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, sec-butilo y terc-butilo. Los radicales alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un arilo, halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcocarbonilo, amino, nitro, mercapto, alquiltio, etc. Si está sustituido por arilo se tiene un radical "aralquilo", tal como bencilo y fenetilo.

- 25 El término alcoxilo C_{1-4} significa alquioxilo C_{1-4} o un radical alquil C_{1-4} éter, en el que el término alquilo C_{1-4} es tal como se definió anteriormente. Los ejemplos de radicales alquil éter adecuados incluyen metoxilo, etoxilo, n-propoxilo, iso-propoxilo, n-butoxilo, i-butoxilo, sec-butoxilo y terc-butoxilo.

El término alquilcarboniloxilo C_{1-4} significa un alquilo C_{1-4} unido a un grupo $-C(=O)-O-$ en el que el término alquilo C_{1-4} es tal como se definió anteriormente.

- 30 "Halógeno", "halo" o "hal" se refieren a bromo, cloro, yodo o fluoro.

"Nitrilo", "ciano" o "carbonitrilo" se refiere al grupo $-C\equiv N$.

El término alquilcarbonilo C_{1-4} se refiere a un alquilo C_{1-4} unido a un grupo carbonilo $-C(=O)-$.

El término fenoxilo significa feniloxilo o un radical fenil éter.

El término feniltio significa un fenilo unido al grupo tioéter $-S-$.

- 35 Cabe señalar que las posiciones de radicales en cualquier resto molecular usado en las definiciones pueden estar en cualquier lugar de dicho resto siempre que sea químicamente estable.

Los radicales usados en las definiciones de cualquier variable del presente documento incluyen todos los isómeros posibles a menos que se indique otra cosa.

- 40 El término "sal" debe entenderse como cualquier forma de un compuesto activo usado según esta invención en la que dicho compuesto está en forma iónica o está cargado y acoplado a un contraión (un catión o anión) o está en disolución. Esta definición incluye también sales de amonio cuaternario y complejos de la molécula activa con otras moléculas e iones, en particular, complejos formados mediante interacciones iónicas. La definición incluye en particular sales fisiológicamente aceptables; este término debe entenderse como equivalente a "sales farmacológicamente aceptables" o "sales farmacéuticamente aceptables".

- 45 El término "sales farmacéuticamente aceptables" en el contexto de esta invención, significa cualquier sal que se tolera fisiológicamente (lo que normalmente significa que no es tóxica, en particular, como resultado del contraión) cuando se utiliza de manera apropiada para un tratamiento, aplicado o utilizado, en particular, en seres humanos y/o mamíferos. Estas sales fisiológicamente aceptables pueden formarse con cationes o bases y, en el contexto de esta invención, se entiende que son sales formadas por al menos un compuesto usado según la invención, normalmente

un ácido (desprotonado) - tal como un anión, particularmente cuando se usa en seres humanos y/o mamíferos. Estas sales fisiológicamente aceptables pueden formarse también con aniones o ácidos y, en el contexto de esta invención, se entienden como sales formadas por al menos un compuesto usado según la invención - normalmente protonado, por ejemplo en nitrógeno - tal como un catión y al menos un anión fisiológicamente tolerado, particularmente cuando se usa en seres humanos y/o mamíferos. Esta definición incluye específicamente en el contexto de esta invención una sal formada por un ácido fisiológicamente tolerado, es decir, sales de un compuesto activo específico con ácidos orgánicos o inorgánicos fisiológicamente tolerados - particularmente cuando se usa en seres humanos y/o mamíferos. Ejemplos de este tipo de sales son las formadas con: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido láctico o ácido cítrico.

El término "solvato", según esta invención debe entenderse que significa cualquier forma del compuesto activo según la invención en la que dicho compuesto está unido por un enlace no covalente a otra molécula (normalmente un disolvente polar), incluyendo especialmente hidratos y alcoholatos, como por ejemplo, metanolato. Un solvato preferido es el hidrato.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) anteriormente descrita pueden incluir enantiómeros dependiendo de la presencia de centros quirales o isómeros dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo Z, E). Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y mezclas de los mismos están dentro del alcance de la presente invención.

Además, cualquier compuesto mencionado en el presente documento puede existir como tautómero. Específicamente, el término tautómero se refiere a uno de dos o más isómeros estructurales de un compuesto que existen en equilibrio y se convierten fácilmente de una forma isomérica a otra. Parejas tautoméricas comunes son amina-imina, amida-ácido imídico, ceto-enol, lactama-lactima, etc.

A menos que se indique otra cosa, los compuestos de la invención también pretenden incluir formas isotópicamente marcadas, es decir, compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por la sustitución de al menos un átomo de hidrógeno por un deuterio o tritio, o la sustitución de al menos un carbono por carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C , o la sustitución de al menos un nitrógeno por nitrógeno enriquecido en ^{15}N están dentro del alcance de esta invención.

Los compuestos de fórmula (I), o sus sales o solvatos están preferiblemente en forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura. Por forma farmacéuticamente aceptable se entiende, entre otras cosas, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y que no incluyen ningún material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para la sustancia farmacológica están preferiblemente por encima del 50%, más preferiblemente por encima del 70%, lo más preferiblemente por encima del 90%. En una realización preferida, están por encima del 95% del compuesto de fórmula (I), o de sus sales o solvatos.

Tal como se ha señalado anteriormente, el término "sales farmacéuticamente aceptables, solvatos" se refiere a cualquier sal, solvato que, tras la administración al receptor, puede proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal como se describe en el presente documento. Sin embargo, se apreciará que sales no farmacéuticamente aceptables y solvatos también están dentro del alcance de la invención puesto que pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables y solvatos. La preparación de sales y solvatos puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" incluyen la erradicación, eliminación, reversión, alivio, modificación o control de una enfermedad o estado, tal como un trastorno cognitivo.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "prevención", "previniendo", "preventivo", "prevenir" y "profilaxis" se refieren a la capacidad de un compuesto de fórmula (I) para evitar, minimizar o dificultar la aparición o el desarrollo de una enfermedad o estado, tal como un trastorno cognitivo, antes de su aparición.

Por lo tanto, por "tratar" o "tratamiento" y/o "prevenir" o "prevención", como un todo, se entiende al menos una supresión o una mejora de los síntomas asociados con el estado que padece el sujeto, donde la supresión y la mejora se usan en un sentido amplio para referirse al menos a una reducción en la magnitud de un parámetro, por ejemplo, síntoma asociado con el estado que está tratándose, tal como un trastorno cognitivo. Como tal, el método de la presente invención también incluye situaciones en las que se inhibe completamente el estado, por ejemplo, se previene que se produzca, o se detiene, es decir se termina, de manera que el sujeto ya no experimenta el estado. Como tal, el presente método incluye tanto la prevención como el tratamiento de un trastorno cognitivo.

El término "trastorno cognitivo", tal como se usa en el presente documento, significa cualquier estado caracterizado por un déficit en las actividades mentales asociadas con el pensamiento, el aprendizaje o la memoria. Los ejemplos de tales trastornos incluyen agnosias, amnesias, afasias, apraxias, delirios, demencias y trastornos del aprendizaje.

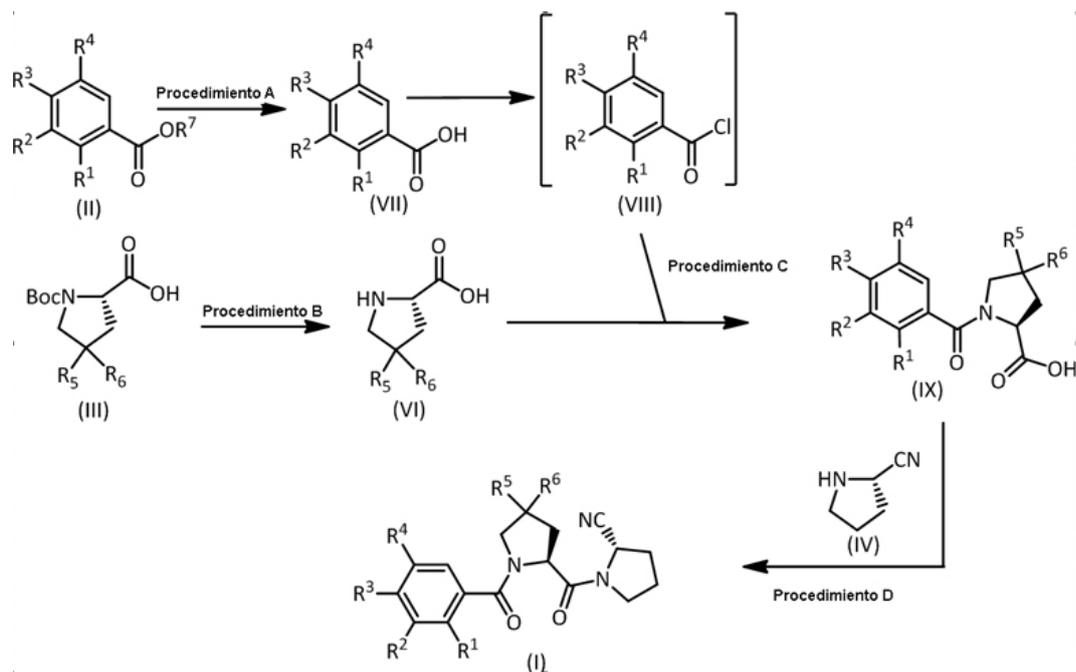
- El trastorno cognitivo puede estar (y frecuentemente lo está) asociado con (es decir, puede estar producido por o puede producirse en presencia de) otros estados caracterizados por daño en o pérdida de neuronas o de otras estructuras que intervienen en la transmisión de señales entre las neuronas. Por lo tanto, los trastornos cognitivos pueden estar asociados con enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, hidrocefalia de presión normal, síndrome cerebral orgánico crónico, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva o demencia senil (tipo Alzheimer).
- Los trastornos cognitivos también pueden estar asociados con otros estados que alteran el funcionamiento normal del sistema nervioso central, incluyendo trastornos psiquiátricos tales como trastornos de ansiedad, trastornos disociativos, trastornos del estado de ánimo tales como trastorno afectivo bipolar, esquizofrenia y trastornos somatomorfos y facticios.
- Los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar agnosias, amnesias, afasias, apraxias, delirios, demencias, trastornos de aprendizaje y otros trastornos cognitivos.
- Los ejemplos de demencias que pueden tratarse con los métodos de la invención incluyen complejo de demencia del SIDA, enfermedad de Binswanger, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, demencia por infartos múltiples, enfermedad de Pick, demencia semántica, demencia senil y demencia vascular.
- Los ejemplos de trastornos de aprendizaje que pueden tratarse con los métodos de la invención incluyen síndrome de Asperger, trastorno por déficit de atención, trastorno de hiperactividad por déficit de atención, autismo, trastorno desintegrativo infantil y síndrome de Rett.
- Los ejemplos de afasia que pueden tratarse con los métodos de la invención incluyen afasia progresiva no fluente.
- Los compuestos descritos en el presente documento también pueden usarse para tratar pacientes con déficits en las actividades mentales que son leves o que en cualquier caso no interfieren significativamente con la vida diaria. El deterioro cognitivo leve es un ejemplo de un estado de este tipo: un paciente con deterioro cognitivo leve presenta síntomas de demencia (por ejemplo, dificultades con el lenguaje o la memoria), pero la gravedad de estos síntomas es tal que un diagnóstico de demencia puede no ser apropiado. Los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar el deterioro cognitivo leve y otras formas menos graves de manera similar de trastornos cognitivos.
- En una realización particular de la presente invención los compuestos descritos aquí se pueden usar para tratar pacientes que tienen un trastorno cognitivo asociado con esquizofrenia, trastorno afectivo bipolar, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.
- En una realización particular de la presente invención en los compuestos de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos, R¹ es hidrógeno; R², R³ y R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alcoxilo C₁₋₄, alquilcarboniloxilo C₁₋₄, benciloxilo, fenilcarboniloxilo, naftil-carboniloxilo, quinolinilcarboniloxilo e isoquinolinilcarboniloxilo; R⁵ se selecciona del grupo que consiste en halógeno, nitrilo, alcoxilo C₁₋₄, alquiltio C₁₋₄, alquilo C₁₋₄, fenilo, fenoxilo, feniltio y trifluorometilo y R⁶ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, flúor y metilo.
- En una realización particular, R² y R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, trifluorometilo y alcoxilo C₁₋₄.
- En otra realización particular, R² se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y metoxilo y R⁴ se selecciona del grupo que consiste en flúor, trifluorometilo y metoxilo.
- En otra realización particular, R⁵ es flúor.
- En una realización particular, R² y R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alcoxilo C₁₋₄, alquilcarboniloxilo C₁₋₄ y benciloxilo.
- En una realización particular, R² y R⁴ son metoxilo.
- En otra realización, R³ es un benciloxilo.
- En otra realización, R¹ es hidrógeno.
- En otra realización, R⁵ se selecciona de flúor, metoxilo, metiltio y fenilo, preferiblemente flúor.
- En otra realización, R⁶ es hidrógeno o flúor.
- En realizaciones preferidas adicionales, se combinan las preferencias descritas anteriormente para los diferentes sustituyentes. La presente invención también se refiere a tales combinaciones de sustituciones preferidas en las fórmulas anteriores.

Compuestos particulares individuales de la invención que son según la fórmula (I) incluyen los compuestos enumerados a continuación:

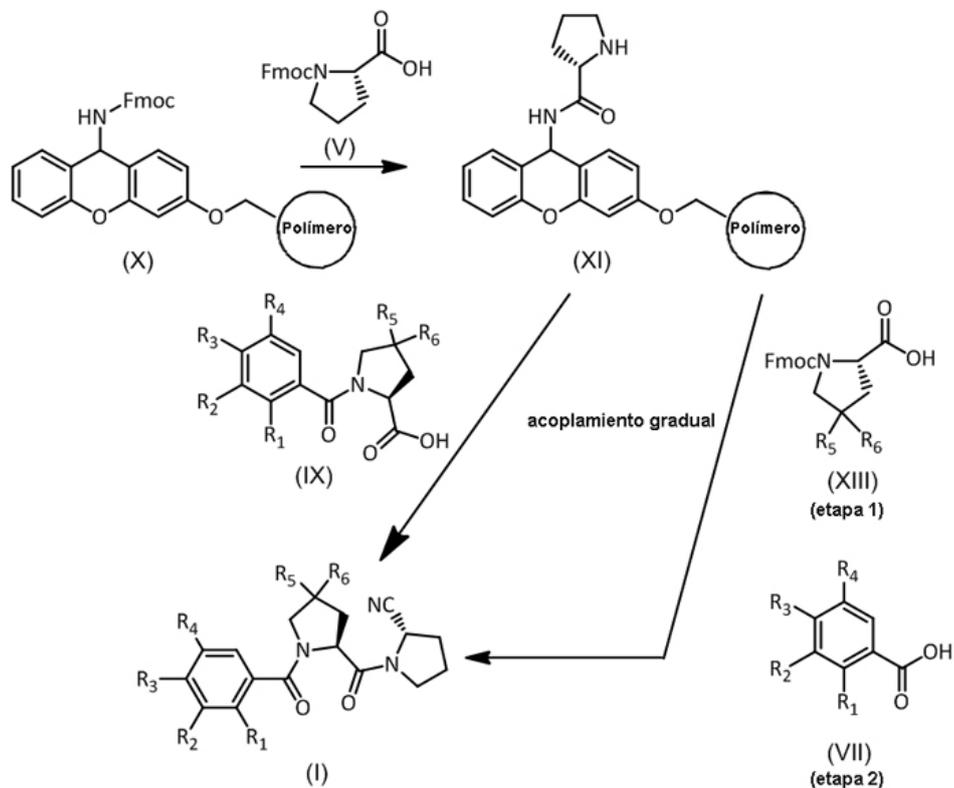
- (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-metoxipirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- 5 • (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-fenilpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(metiltio)pirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-metilpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- 10 • (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-cianopirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(trifluorometil)-pirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(terc-butoxi)pirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- 15 • (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-acetoxipirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S)-1-(4-acetoxi-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S)-1-(4-benzoiloxi-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S)-1-(3,4-dibenciloxi-5-metoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S)-1-(3,4-dibenzoiloxi-5-metoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- 20 • (S)-1-((2S)-1-(3-acetoxi-4,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S)-1-(3-pivaloiloxi-4,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((S)-1-(4-(benciloxi)benzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((S)-1-(3-(benciloxi)benzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((S)-1-(2-(benciloxi)benzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- 25 • (S)-1-((S)-1-(4-(benciloxi)-3-(trifluorometil)benzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((S)-1-(4-(benciloxi)-3-fluorobenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo.

o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos.

Los compuestos de fórmula (I) definidos anteriormente pueden obtenerse mediante procedimientos de síntesis disponibles, tal como se ilustra por los siguientes esquemas generales:



ESQUEMA DETALLADO PARA EL PROCEDIMIENTO E



- 5 En una primera etapa, el éster de fórmula (II) se disuelve o suspende en un disolvente orgánico polar (preferiblemente un disolvente orgánico prótico polar) tal como etanol (EtOH) o metanol o una mezcla de disolventes orgánicos polares. Se añade una disolución de base acuosa y la reacción hidrolítica se lleva a cabo mediante el mantenimiento de la mezcla, normalmente a reflujo, a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla de disolventes hasta la finalización de la hidrólisis, normalmente durante un período de 0,5 a 4 horas, preferiblemente 1-2 horas. La disolución de base es preferiblemente de naturaleza
- 10

inorgánica, tal como álcali diluido, por ejemplo NaOH. A continuación, se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente y, preferiblemente, se concentra hasta aproximadamente un quinto del volumen de reacción. Entonces se añade lentamente la mezcla de reacción a una disolución de ácido tal como una disolución de HCl 1 M para efectuar la neutralización, mientras se enfría en un baño de hielo. Si la acidificación conduce a precipitación, se filtra el sólido y se lava con agua, proporcionando el producto de fórmula (VII). Si no se obtiene precipitado, se extrae la disolución resultante varias veces con un disolvente orgánico apropiado tal como acetato de etilo, se seca la fase orgánica y se evapora. Se purifica el producto en bruto de fórmula (VII) mediante cromatografía ultrarrápida.

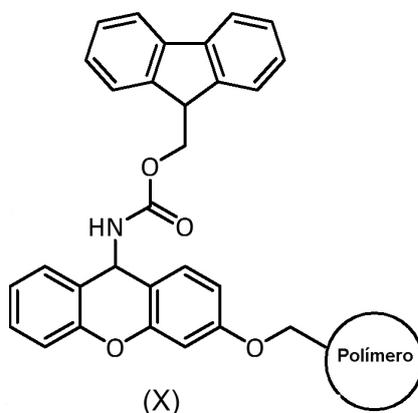
La desprotección de la amina de fórmula (III) se consigue en condiciones ácidas suaves, tales como adición a una disolución de cloruro de hidrógeno en un disolvente orgánico tal como dioxano, o con una mezcla de TFA/DCM, a baja temperatura que oscila entre 0°C y temperatura ambiente. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1-3 horas. El disolvente se evapora entonces hasta la sequedad, para dar la sal de clorhidrato o la sal de trifluoroacetato de la amina de fórmula (VI), dependiendo del ácido usado.

El compuesto de fórmula (IX) se prepara a partir del ácido carboxílico de fórmula (VII) y la amina de fórmula (VI) en condiciones de Schotten-Baumann. Así, un agente de cloración tal como cloruro de oxalilo se añade a una disolución del ácido carboxílico de fórmula (VII) en un disolvente orgánico tal como tolueno. La reacción se agita a una temperatura entre 50°C y 80°C durante de 1 a 2 horas para permitir la formación del cloruro de ácido carboxílico de fórmula (VIII). Después de la evaporación del disolvente, el producto en bruto resultante se solubiliza en un disolvente orgánico tal como THF y se añade a una disolución acuosa básica de la amina de fórmula (VI), normalmente una disolución acuosa de NaOH de la amina de fórmula (VI), a una temperatura baja tal como 0°C. La mezcla de reacción se agita a la temperatura baja durante de 1 a 2 horas y a temperatura ambiente durante de 2 a 4 horas. Después, el disolvente se evapora y la fracción acuosa restante se ajusta a pH ácido (3-4) mediante la adición de una disolución de HCl y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca, se filtra y se evapora. El producto en bruto se purifica mediante cromatografía ultrarrápida cuando es necesario.

El producto de fórmula (IX) se acopla entonces a (S)-pirrolidin-2-carbonitrilo de fórmula (IV) en presencia de una base, tal como N,N-diisopropiletilamina (DIEA), y con la ayuda de un reactivo de acoplamiento, tal como una carbodiimida. En particular, el compuesto de fórmula (IX) se disuelve en un disolvente orgánico aprótico tal como diclorometano y se añade a una carbodiimida, por ejemplo una carbodiimida en un soporte sólido tal como N-ciclohexilcarbodiimida, N'-metilpoliestireno, junto con DIEA. Después de 5 min, se añaden (S)-pirrolidin-2-carbonitrilo de fórmula (IV) y más DIEA. La reacción se agita a temperatura ambiente durante de 8 a 16 horas. A continuación, la mezcla de reacción se filtra y el sólido remanente se lava con el disolvente orgánico aprótico. El filtrado se evapora hasta la sequedad. El producto en bruto se purifica entonces mediante RP-HPLC preparativa.

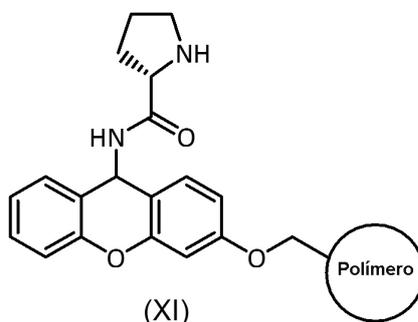
Alternativamente, los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse tal como se ilustra en el esquema E y se describe a continuación:

Una resina funcionalizada con amina tal como la resina de amida de Sieber de fórmula (X) se coloca en una jeringa equipada con un disco poroso de polietileno. La resina se hincha mediante lavados con disolventes orgánicos apropiados tales como diclorometano (DCM) y dimetilformamida (DMF). Cuando el grupo amina de la resina está protegido (es decir, en el caso de la resina de amida de Sieber), la eliminación del grupo protector (tal como un grupo protector de fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc)) se consigue mediante tratamiento con una disolución de base de amina tal como una disolución de piperidina en DMF.

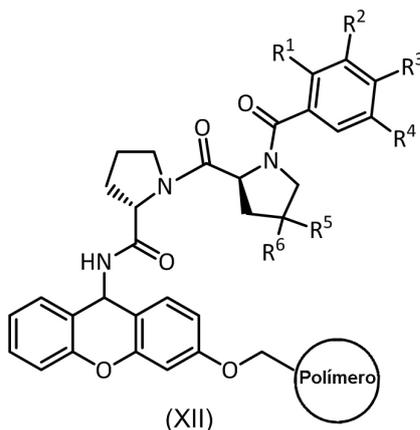


Después de la eliminación del grupo protector de la resina, se une L-prolina de fórmula (V) protegida con Fmoc a la resina usando un agente de activación tal como un triazol (es decir, TBTU) y una base de amina tal como DIEA en un disolvente orgánico apropiado tal como DMF. La mezcla se agita durante de 1 a 2 horas. Después de filtrar y lavar, el grado del acoplamiento puede monitorizarse mediante la prueba de Kaiser, realizando un re-acoplamiento cuando es necesario. Se elimina Fmoc para dar el producto de fórmula (XI) mediante un tratamiento con una disolución de base de amina tal como una disolución de piperidina en DMF y/o una mezcla de

piperidina/DBU/tolueno/DMF. La eliminación de Fmoc puede evaluarse usando la prueba del éster de p-nitrofenilo NF31.



5 El producto de fórmula (XI) se acopla con el producto de fórmula (IX) para obtener el producto de fórmula (XII) usando un agente de activación tal como PyBOP, en presencia o en ausencia de un aditivo tal como HOAt, y un base de amina tal como DIEA en un disolvente orgánico apropiado tal como DMF. La mezcla se agita manualmente durante el tiempo de reacción total de 1 a 2 horas. Se realiza un re-acoplamiento sistemático usando las mismas cantidades y el mismo tiempo. El grado del acoplamiento puede monitorizarse mediante la prueba del éster de p-nitrofenilo NF31.



10 Alternativamente, el producto de fórmula (XII) también puede obtenerse mediante acoplamiento gradual del producto (XI) primero al compuesto de fórmula (XIII), seguido por la eliminación del grupo protector Fmoc y, a continuación el acoplamiento con el compuesto de fórmula (VII).

15 El producto de fórmula (XII), minuciosamente lavado con un disolvente orgánico apropiado tal como DCM y secado, se transfiere a un matraz, al que se añaden anhídrido trifluoroacético y piridina en una pequeña cantidad de un disolvente orgánico. La mezcla se mantiene a una temperatura de 20 a 40°C durante 8 a 16 horas. A continuación, la mezcla de reacción se filtra y la resina se lava con el mismo disolvente orgánico. Los filtrados se recogen y el disolvente se evapora hasta la sequedad. El producto en bruto resultante se disuelve en un disolvente apropiado tal como acetato de etilo y se lava con disolución saturada de NaHCO₃ y una disolución acuosa de KHSO₄ al 5%. La fase orgánica se seca, se filtra y se evapora. El producto en bruto se lleva a H₂O:CH₃CN y se liofiliza para dar el péptido-nitrilo de fórmula (I).

25 Alternativamente, la peptidil-resina de fórmula (XII) puede tratarse con una mezcla de TFA/H₂O/TIS durante 1-2 horas. A continuación, la resina se filtra y se lava con TFA, los filtrados se recogen y el disolvente se evapora hasta la sequedad. El producto en bruto se resuspende en una mezcla de H₂O:CH₃CN y se liofiliza. La amida de péptido en bruto resultante se lleva a un disolvente orgánico apropiado tal como DCM y se convierte en el nitrilo por ejemplo en presencia de pentóxido de fósforo, tetracloruro de titanio, cloruro de tionilo, anhídrido trifluoroacético/piridina o trifenilfosfina/tetracloruro de carbono. La mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante de 8 a 16 horas, el disolvente se evapora y el residuo se lleva a acetato de etilo. La disolución orgánica se lava posteriormente con disolución acuosa de KHSO₄ y disolución acuosa de NaHCO₃. El secado y la evaporación de la fase orgánica permiten obtener el péptido-nitrilo de fórmula (I).

30 El producto en bruto se purifica mediante RP-HPLC.

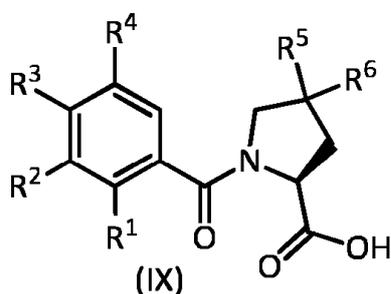
Cuando los procedimientos descritos anteriormente para la preparación de compuestos de la invención dan lugar a mezclas de estereoisómeros, estos isómeros pueden separarse mediante técnicas convencionales tales como cromatografía preparativa. Si hay centros quirales, los compuestos pueden prepararse en forma racémica, o los enantiómeros individuales pueden prepararse o bien mediante síntesis enantioespecífica o bien mediante resolución.

- 5 Los compuestos de fórmulas (II), (III), (IV) y (V), así como algunos de los compuestos de fórmula (VII), usados como productos de partida están disponibles o bien comercialmente o bien también pueden prepararse usando métodos bien conocidos por el experto en el campo.

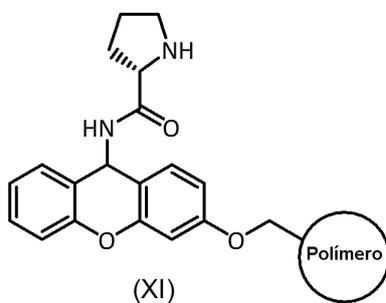
10 Así, en un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para la preparación de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos.

En una realización, el procedimiento comprende las etapas de:

- a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IX):

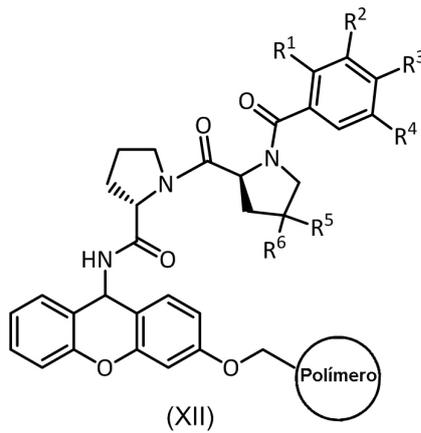


15 en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son tal como se definieron anteriormente en la fórmula (I), con un compuesto de fórmula (XI):

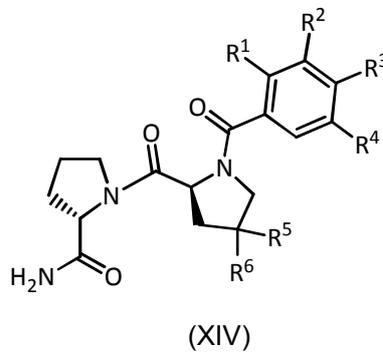


20 en la que el polímero representa un polímero que es inerte en las condiciones de reacción del método de síntesis descrito en el presente documento e insoluble pero hinchable en los disolventes empleados en el presente documento, por ejemplo, poliestireno de baja reticulación y polímeros de poliestireno injertados con polietilenglicol;

para producir un compuesto de fórmula (XII);



b) hidrolizar el compuesto de fórmula (XII) para producir el compuesto de fórmula (XIV)



y

5 c) someter el compuesto de fórmula (XIV) a condiciones que pueden transformar un grupo carboxamida en un grupo nitrilo para dar el compuesto de fórmula (I);

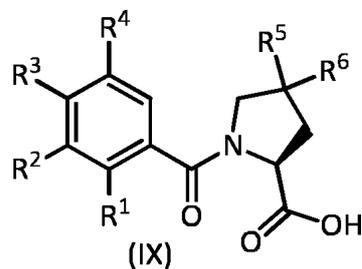
en el que las etapas b) y c) pueden realizarse por separado o en una reacción en un solo recipiente (*one pot*).

En otra realización de la presente invención, el procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos,

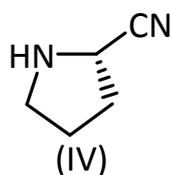
10

comprende las etapas de:

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IX):



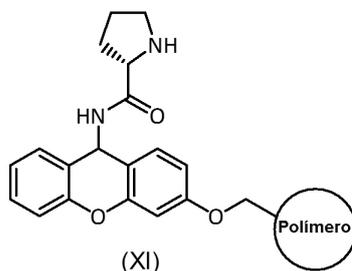
en la que R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son tal como se definieron anteriormente en la fórmula (I), con un compuesto de fórmula (IV)



15

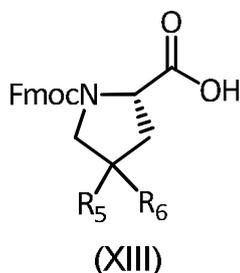
Todavía en otra realización, el procedimiento comprende las etapas de:

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (XI):



5 en la que "polímero" representa un polímero que es inerte en las condiciones de reacción del método de síntesis descrito en el presente documento e insoluble pero hinchable en los disolventes empleados en el presente documento, por ejemplo, poliestireno de baja reticulación y polímeros de poliestireno injertado con polietilenglicol;

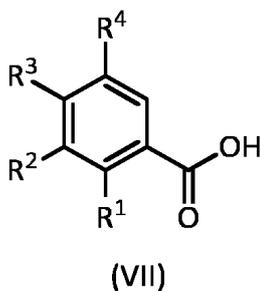
con un compuesto de fórmula (XIII):



en la que R⁵ y R⁶ son tal como se definieron anteriormente en la fórmula (I);

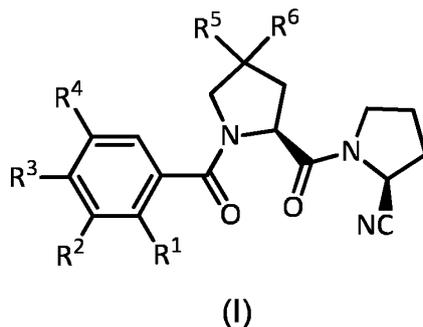
10 b) eliminar el grupo protector Fmoc

c) hacer reaccionar con un compuesto de fórmula (VII):



en la que R¹, R², R³ y R⁴ son como se definió anteriormente en la fórmula (I);

d) hidrolizar el producto resultante a partir del polímero de soporte para producir el compuesto de fórmula (I)



15 en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son como se definieron anteriormente.

Se ha encontrado que los compuestos de fórmula general (I) son útiles en el tratamiento de trastornos cognitivos, en particular trastornos cognitivos asociados con otras enfermedades o estados del sistema nervioso central.

5 En una realización particular de la presente invención, el trastorno cognitivo es un trastorno cognitivo asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esquizofrenia, trastorno afectivo bipolar, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

La presente invención proporciona además medicamentos o composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de esta invención, o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos, junto con un portador, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable, para su administración a un paciente.

10 Los materiales auxiliares o aditivos de una composición farmacéutica según la presente invención pueden seleccionarse entre portadores, excipientes, materiales de soporte, lubricantes, cargas, disolventes, diluyentes, colorantes, acondicionadores del sabor como azúcares, antioxidantes, aglutinantes, adhesivos, disgregantes, agentes anti-adherentes, deslizantes y/o aglutinantes. En el caso de supositorios, esto puede implicar ceras o ésteres de ácidos grasos o conservantes, emulsionantes y/o portadores para aplicación parenteral. La selección de
15 estos materiales auxiliares y/o aditivos y las cantidades que van a usarse dependerán de la forma de aplicación de la composición farmacéutica.

El medicamento o composición farmacéutica según la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada para la aplicación a seres humanos y/o animales, preferiblemente seres humanos, incluyendo bebés, niños y
20 adultos, y puede producirse mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, la formulación según la invención puede adaptarse para aplicación tópica o sistémica, particularmente para administración dérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intra-articular, intraperitoneal, intravenosa, intra-arterial, intravesical, intraósea, intracavernosa, intranasal, pulmonar, bucal, sublingual, ocular, intravítrea, percutánea, rectal, vaginal, oral, epidural, intratecal, intraventricular, intracerebral, intracerebroventricular, intracisternal, intraespinal, periespinal, intracraneal, a través de agujas o catéteres con o sin dispositivos de bombeo,
25 o mediante otras vías de aplicación.

En una realización, las composiciones farmacéuticas están en forma oral, ya sea sólida o líquida. Las formas farmacéuticas adecuadas para administración oral pueden ser comprimidos, píldoras, comprimidos oblongos, cápsulas de gel, gomas de mascar, cápsulas, gránulos, gotas, jarabes o disoluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en la técnica tales como agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina
30 , sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para la fabricación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio; disgregantes, por ejemplo almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón o celulosa microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables tales como lauril sulfato de sodio.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas están en forma de productos para la administración intranasal no parenteral, preferiblemente en forma de productos para la administración intranasal. Normalmente, la
35 administración intranasal se lleva a cabo mediante el uso de pulverizaciones nasales, botellas de compresión y cuentagotas de líquido como dispositivos de administración. Para usarse con estos dispositivos, las composiciones farmacéuticas son ventajosamente disoluciones o suspensiones líquidas de los compuestos de la invención.

Las composiciones pueden prepararse mediante métodos convencionales de combinación, relleno o formación de comprimidos. Pueden usarse operaciones de combinación repetidas para distribuir el agente activo por toda la
40 composición empleando grandes cantidades de cargas. Tales operaciones son convencionales en la técnica. Los comprimidos pueden prepararse por ejemplo mediante granulación en húmedo o en seco y pueden revestirse opcionalmente según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal, en particular con un recubrimiento entérico.

45 Las composiciones farmacéuticas también pueden adaptarse para administración parenteral, tales como disoluciones estériles, suspensiones o preparaciones secas reconstituibles, aerosoles o pulverizaciones en la forma farmacéutica unitaria adecuada. Pueden usarse excipientes adecuados, tales como agentes de carga, agentes tamponantes o tensioactivos.

50 La composición de la invención puede formularse como depósitos en forma disuelta o en parches, para aplicación percutánea.

Las aplicaciones cutáneas incluyen ungüentos, geles, cremas, lociones, suspensiones o emulsiones.

La forma adecuada de aplicación rectal es por medio de supositorios.

Las formulaciones mencionadas se prepararán usando procedimientos convencionales tales como los descritos o mencionados en las Farmacopeas Española de los EE.UU. y textos de referencia similares.

En una realización de la invención, se prefiere que el compuesto de fórmula (I) se use en cantidades terapéuticamente eficaces. El médico determinará la dosificación de los presentes agentes terapéuticos que será la más adecuada y que variará con la forma de administración y el compuesto particular elegido, y además, variará con el paciente bajo tratamiento, la edad del paciente, el tipo de enfermedad o estado que está tratándose. Cuando la composición se administra por vía oral, se requieren cantidades mayores del agente activo para producir el mismo efecto que una cantidad menor administrada por vía parenteral. Los compuestos son útiles de la misma manera como agentes terapéuticos comparables, y el nivel de dosificación es del mismo orden de magnitud que el empleado generalmente con estos otros agentes terapéuticos. Los compuestos activos se administrarán normalmente una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces al día, con dosis diarias totales típicas en el intervalo de desde 0,1 hasta 1000 mg / kg / día.

Los compuestos y las composiciones de esta invención pueden usarse con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o pueden proporcionarse como una composición separada para su administración al mismo tiempo o en momentos diferentes.

En particular, la combinación de al menos un compuesto de fórmula (I) y al menos un otro medicamento puede formularse para su administración simultánea, separada o secuencial, con al menos un portador, aditivo, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Esto tiene la implicación de que la combinación del compuesto de fórmula (I) y el otro fármaco pueden administrarse:

- a) como una combinación que está formando parte de la misma formulación de medicamento, administrándose entonces ambas siempre simultáneamente.
- b) como una combinación de dos unidades, cada una con uno de ellos dando lugar a la posibilidad de administración simultánea, secuencial o separada. En una realización particular, el compuesto de fórmula (I) se administra de forma independiente del otro fármaco (es decir, en dos unidades), pero al mismo tiempo. En otra realización particular, el compuesto de fórmula (I) se administra primero, y luego el otro fármaco se administra por separado o secuencialmente. En aún otra realización particular, el otro fármaco se administra primero, y después se administra el compuesto de fórmula (I), por separado o secuencialmente, según se defina.

En el contexto de la presente invención, se han utilizado los siguientes acrónimos y abreviaturas, cuyo significado se detalla a continuación:

AcOEt	Acetato de etilo
30 AcSDKP	N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina
EA	Enfermedad de Alzheimer
BBB	Barrera hematoencefálica
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
BSA	Albúmina sérica bovina
35 DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCM	Diclorometano
DIEA	N,N'-Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
40 DPPIV	Dipeptidil peptidasa IV
EtOH	Etanol
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
FPLC	Cromatografía de líquidos rápida de proteínas
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
45 IP3	Trifosfato de inositol
IPTG	β -D-1-Tiogalactopiranosido de isopropilo

	LB	Caldo de lisogenia
	MALDI-TOF	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz - tiempo-de-vuelo-
	MK-801	Dixocilpina (INN)
	EM	Esclerosis múltiple
5	DO	Densidad óptica
	PAMPA	Ensayo de permeabilidad a través de membrana artificial paralela
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
	PC	Fosfatidilcolina
	PE	Fosfatidiletanolamina
10	pETM10	Plásmido pETM10
	PI	Fosfatidilinositol
	POP	Prolil oligopeptidasa
	hPOP	Prolil oligopeptidasa humana
	PREP	Prolil endopeptidasa (POP y PREP se consideran sinónimos)
15	PS	Fosfatidilserina
	PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio
	RP-HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa
	DE	Desviación estándar
	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
20	TBTU	Tetrafluoroborato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
	TFA	Ácido trifluoroacético
	THF	Tetrahidrofurano
	TIS	Triisopropilsilano
	Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
25	Tβ4	Proteína timosina beta-4
	Z-G-P-AMC	(<i>N</i> -Benciloxycarbonil-Gly-Pro-metilumarinil-7-amida)

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos de determinadas realizaciones de la invención y no pueden considerarse limitativos en modo alguno.

EJEMPLOS

30 CONDICIONES DE SÍNTESIS ESPECÍFICAS USADAS PARA LAS PREPARACIONES DESCRITAS EN LOS EJEMPLOS

Procedimiento A: Hidrólisis del éster de fórmula (II) para dar el ácido carboxílico de fórmula (VII)

El éster de fórmula (II) (1 mmol) se solubiliza en EtOH al 95%. Se añade NaOH (3,7 mmol) y la reacción se mantiene a reflujo durante aproximadamente 2 horas. Luego se deja que alcance la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentra hasta aproximadamente 15-20 ml y entonces se añade esta disolución lentamente a una disolución de HCl 1 M, mientras que se enfría en un baño de hielo. Precipita un sólido blanco, que se recoge mediante filtración, se lava con agua y se seca bien antes de la siguiente etapa de síntesis. En caso de que no aparezca precipitado, se extrae la disolución resultante con AcOEt (3x), se seca la fase orgánica y se evapora. El producto en bruto se purifica mediante cromatografía ultrarrápida, si es necesario.

40 Procedimiento B: Desprotección de una amina protegida con Boc de fórmula (III) para dar la amina de fórmula (VI)

La amina protegida con Boc de fórmula (III) (1 mmol) se añade lentamente a HCl 4 M en dioxano (20 ml) a 0°C. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se evapora entonces hasta la sequedad, para dar la sal de clorhidrato de la amina de fórmula (VI).

5 Procedimiento C: Acoplamiento de una amina de fórmula (VI) a un ácido carboxílico de fórmula (VII) a través de la formación del cloruro de ácido carboxílico de fórmula (VIII).

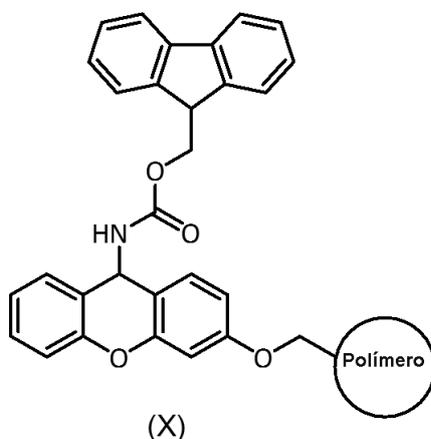
10 Se añade cloruro de oxalilo (1,5 mmol) a una disolución del ácido carboxílico de fórmula (VII) (1 mmol) en tolueno (5 ml). La reacción se agita a 50°C durante 1,5 horas para permitir la formación del cloruro de ácido carboxílico de fórmula (VIII). Después de la evaporación del disolvente, el producto en bruto resultante se solubiliza en THF y se añade a una disolución acuosa de NaOH de la amina de fórmula (VI) (1,1 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agita a 0°C durante 1,5 horas y a temperatura ambiente durante 3 horas. Entonces, se evapora el THF y la fracción acuosa restante se ajusta a pH ácido (3-4) mediante la adición de disolución de HCl 1 M y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con salmuera, se seca, se filtra y se evapora. El producto en bruto de fórmula (IX) se purifica mediante cromatografía ultrarrápida cuando es necesario.

15 Procedimiento D: Acoplamiento en disolución del producto de fórmula (IX) a (S)-pirrolidin-2-carbonitrilo de fórmula (IV)

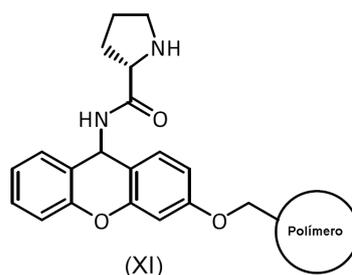
20 El producto de fórmula (IX) (1,2 mmol) se disuelve en DCM y se añade a N-ciclohexilcarbodiimida, N'-metil poliestireno (3 mmol), junto con DIEA (1 mmol). Después de 5 min, se añade (S)-pirrolidin-2-carbonitrilo de fórmula (IV) (1 mmol) y DIEA (1 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche. Después, la mezcla de reacción se filtra y el sólido restante se lava con DCM. El filtrado se evapora hasta la sequedad. El producto en bruto se purifica mediante RP-HPLC preparativa.

Procedimiento E: Procedimiento general para la síntesis en fase sólida:

25 Hinchado/acondicionamiento de la resina: Se coloca resina de amida de Sieber de fórmula (X) (1 eq) en una jeringa equipada con un disco poroso de polietileno. La resina se hincha mediante lavados con DCM y DMF. La eliminación del grupo protector fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) se consigue mediante tratamientos con una disolución de piperidina al 20% en DMF.

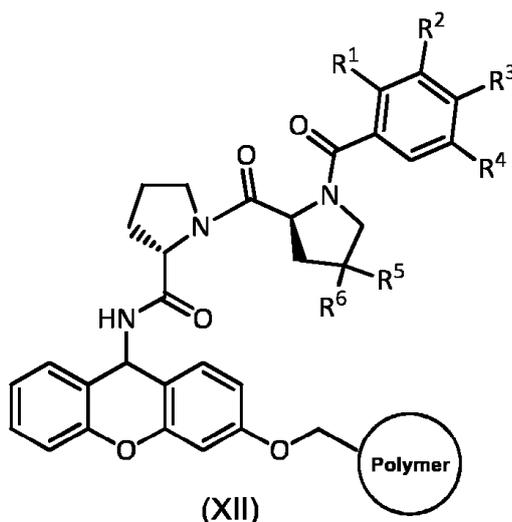


30 A continuación, se une Fmoc-L-prolina de fórmula (V) (4 eq) a la resina usando TBTU (4 eq) y DIEA (8 eq) en DMF. La mezcla se agita manualmente de forma intermitente durante 90 min. Después de filtrar y lavar, el grado del acoplamiento se monitoriza usando la prueba de Kaiser, realizándose un re-acoplamiento cuando es necesario. Se elimina Fmoc para dar el producto de fórmula (XI) mediante un tratamiento con una disolución de piperidina al 20% en DMF y posteriormente con una disolución de piperidina/DBU/tolueno/DMF (20:5:5:70). La eliminación de Fmoc se evalúa usando la prueba del éster de p-nitrofenilo NF31 (descrito en Madder, A. *et al*, Eur. J. Org Chem. 1999;(11):2787-91).



El producto de fórmula (IX) (2 eq) se acopla al producto de fórmula (XI) para obtener el producto de fórmula (XII) usando PyBOP (2 eq), HOAt (6 eq) y DIEA (6 eq) en DMF. La mezcla se agita manualmente de forma intermitente durante el tiempo de reacción total, 90 min. Se realiza un reacoplamiento sistemático usando las mismas cantidades y el mismo tiempo. El grado del acoplamiento se monitoriza usando la prueba del éster de p-nitrofenilo NF31.

Alternativamente, el producto de fórmula (XIII) (4 eq) se acopla al producto de fórmula (XI) usando PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) y DIEA (12 eq) en DMF. La mezcla se agita manualmente de forma intermitente durante el tiempo de reacción total, 90 min. El grado del acoplamiento se monitoriza usando la prueba del éster de p-nitrofenilo NF31, y se realiza un re-acoplamiento si es necesario. El grupo Fmoc se elimina mediante un tratamiento con una disolución de piperidina al 20% en DMF y un tratamiento con una disolución de piperidina/DBU/tolueno/DMF (20:5:5:70). Posteriormente, el producto de fórmula (VII) (4 eq) se incorpora, usando PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) y DIEA (12 eq) en DMF, para obtener el producto de fórmula (XII). La mezcla se agita manualmente de forma intermitente durante el tiempo de reacción total, 90 min. El grado del acoplamiento se monitoriza usando la prueba del éster de p-nitrofenilo NF31, y se realiza un re-acoplamiento si es necesario.

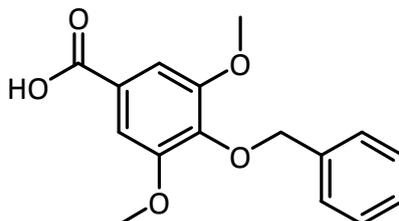


El producto de fórmula (XII) se lava a fondo con DCM y se seca, se transfiere a un matraz de fondo redondo, y se añaden anhídrido trifluoroacético (5 eq) y piridina (10 eq) en DCM (aprox. 2 ml/100 mg). La mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, la mezcla de reacción se filtra y la resina se lava con DCM. Se recogen los filtrados y se evapora hasta la sequedad el disolvente. El producto en bruto resultante se disuelve en AcOEt y se lava con disolución saturada de NaHCO₃ y disolución acuosa de KHSO₄ al 5%. La fase orgánica se seca, se filtra y se evapora. El producto en bruto se recoge en H₂O:CH₃CN (1:1) y se liofiliza para dar el péptido-nitrilo de fórmula (I).

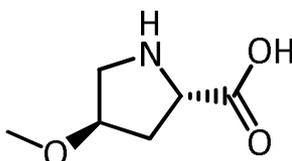
Alternativamente, la peptidil-resina de fórmula (XII) puede tratarse con una mezcla de TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5, aprox. 2-5 ml/100 mg) durante 1-2 horas. A continuación, la resina se filtra y se lava con TFA, se recogen los filtrados y el disolvente se evapora hasta la sequedad. El producto en bruto se resuspende en una mezcla de H₂O:CH₃CN (1:1) y se liofiliza. La amida de péptido en bruto resultante se disuelve en DCM y se añaden anhídrido trifluoroacético (5 eq) y piridina (10 eq). La mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante la noche, el disolvente se evapora y el residuo se recoge en AcOEt. La disolución orgánica se lava posteriormente con una disolución acuosa de KHSO₄ al 5% y una disolución acuosa de NaHCO₃ al 10%. Tras secar y evaporar la fase orgánica se obtiene el péptido-nitrilo de fórmula (I).

El producto en bruto se purifica mediante RP-HPLC.

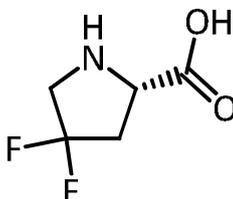
SÍNTESIS DE COMPUESTOS INTERMEDIOS:

Producto intermedio 1: Ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico

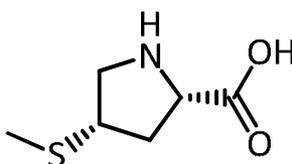
Se introducen 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoato de metilo (2,0 g, 9,4 mmol), carbonato de potasio (3,2 g, 22,6 mmol) y yoduro de potasio (500 mg, 3,0 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se añade acetona (200 ml). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entonces, se añade cloruro de bencilo (4,3 ml, 37,7 mmol) a la mezcla de reacción y se mantiene la agitación a reflujo durante 8 horas. Después, la reacción se deja enfriar a temperatura ambiente. Se añade agua y se realizan tres extracciones con éter dietílico, el extracto orgánico se lava con salmuera, se seca y se evapora. El producto en bruto se purifica mediante cromatografía ultrarrápida, obteniéndose 1,7 g (5,7 mmol). Posteriormente, la hidrólisis del éster metílico se lleva a cabo siguiendo el procedimiento A descrito anteriormente, para dar el ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico (2,4 g, 7,9 mmol).

Producto intermedio 2: Ácido (2S,4R)-4-metoxipirrolidin-2-carboxílico

A partir del ácido (2S,4R)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-metoxipirrolidin-2-carboxílico (221 mg, 1,5 mmol), disponible comercialmente, se obtiene el producto como sal de clorhidrato en rendimiento cuantitativo siguiendo el procedimiento B descrito anteriormente y se usa sin purificación adicional.

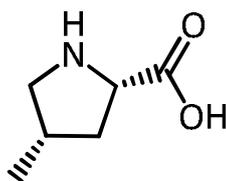
Producto intermedio 3: Ácido (S)-4,4-difluoropirrolidin-2-carboxílico

A partir del ácido (S)-1-(terc-butoxicarbonil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carboxílico (150 mg, 1,0 mmol), disponible comercialmente, se obtiene el producto como sal de clorhidrato en rendimiento cuantitativo siguiendo el procedimiento B descrito anteriormente y se usa sin purificación adicional.

Producto intermedio 4: Ácido (2S,4S)-4-(metiltio)pirrolidin-2-carboxílico

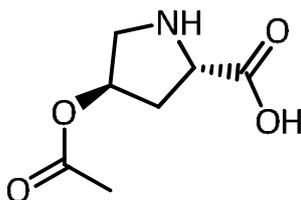
A partir del ácido (2S,4S)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-metiltio-pirrolidin-2-carboxílico (310 mg, 1,93 mmol), disponible comercialmente, se obtiene el producto como sal de clorhidrato en rendimiento cuantitativo siguiendo el procedimiento B descrito anteriormente y se usa sin purificación adicional.

Producto intermedio 5: Ácido (2S,4S)-4-metilpirrolidin-2-carboxílico



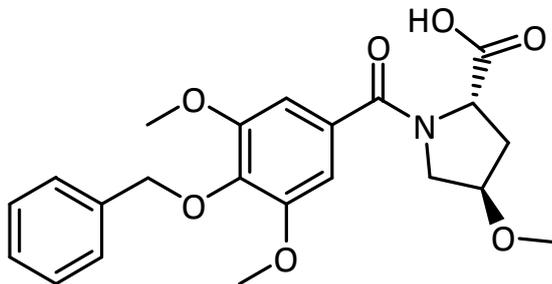
A partir del ácido (2S,4S)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-metilpirrolidin-2-carboxílico (500 mg, 2,18 mmol), disponible comercialmente, se obtiene el producto como sal de clorhidrato en rendimiento cuantitativo siguiendo el procedimiento B descrito anteriormente y se usa sin purificación adicional.

5 **Producto intermedio 6: Ácido (2S,4R)-4-acetoxipirrolidin-2-carboxílico**



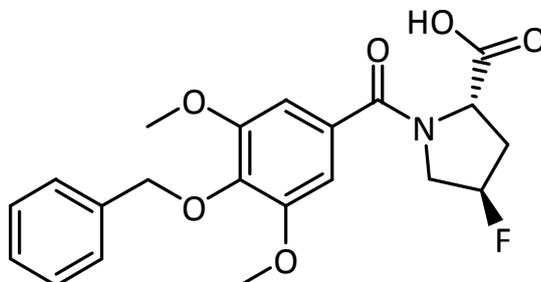
10 Se disuelve *trans*-L-hidroxiprolina (500 mg, 3,81 mmol), disponible comercialmente, en ácido clorhídrico 6 N (1 ml). Se añade ácido acético glacial (1 ml) y la disolución se enfría a 0°C en un baño de hielo. Se añade entonces cloruro de acetilo (10 ml) lentamente. Después de unos minutos, el producto se obtiene a través de precipitación, ayudado por la adición de éter. El compuesto (626 mg, 2,98 mmol), en forma de sal de clorhidrato, se aísla mediante filtración, se lava con éter, se seca y se usa directamente en la siguiente etapa.

Producto intermedio 7: Ácido (2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-metoxi-pirrolidin-2-carboxílico



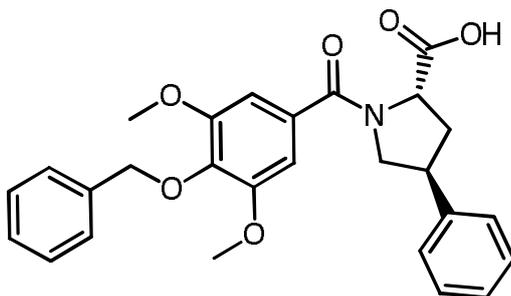
15 Se prepara siguiendo el procedimiento C descrito anteriormente a partir del producto intermedio 1 (ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico) (425 mg, 1,5 mmol) y el producto intermedio 2 (ácido (2S,4R)-4-metoxipirrolidin-2-carboxílico) (1,5 mmol). La purificación mediante cromatografía ultrarrápida proporciona el producto deseado (428 mg, 1,0 mmol).

Producto intermedio 8: Ácido (2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-fluoropirrolidin-2-carboxílico



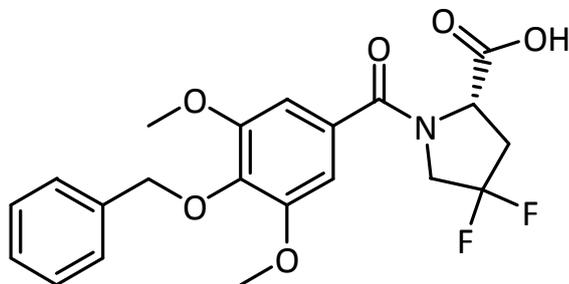
20 Se prepara siguiendo el procedimiento C descrito anteriormente a partir del producto intermedio 1 (ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico) (714 mg, 2,5 mmol) y ácido (2S,4R)-4-fluoropirrolidin-2-carboxílico (363 mg, 2,7 mmol), disponible comercialmente. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida proporciona el producto deseado (670 mg, 1,7 mmol).

Producto intermedio 9: Ácido (2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-fenilpirrolidin-2-carboxílico



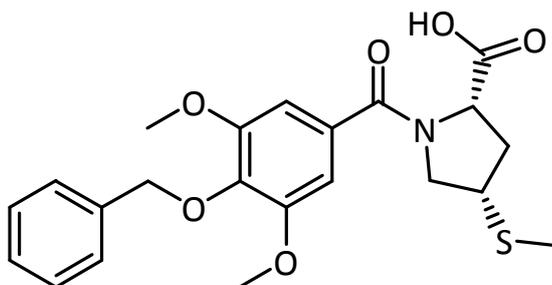
- 5 Se prepara siguiendo el procedimiento C descrito anteriormente a partir del producto intermedio 1 (ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico) (700 mg, 2,4 mmol) y ácido (2S,4S)-4-fenilpirrolidin-2-carboxílico (608 mg, 2,7 mmol) disponible comercialmente. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida proporciona el producto deseado (700 mg, 1,5 mmol).

Producto intermedio 10: Ácido (S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carboxílico



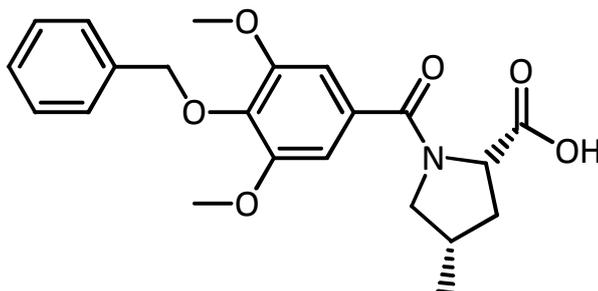
- 10 Se prepara siguiendo el procedimiento C descrito anteriormente a partir del producto intermedio 1 (ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico) (260 mg, 0,9 mmol) y el producto intermedio 3 (ácido (S)-4,4-difluoropirrolidin-2-carboxílico) (1,0 mmol). La purificación mediante cromatografía ultrarrápida proporciona el producto deseado (366 mg, 0,9 mmol).

Producto intermedio 11: Ácido (2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(metiltio)pirrolidin-2-carboxílico



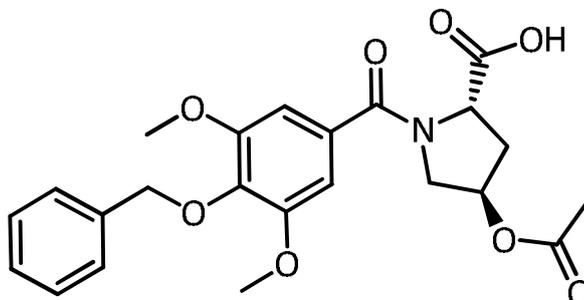
- 15 Se prepara siguiendo el procedimiento C descrito anteriormente a partir del producto intermedio 1 (ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico) (505 mg, 1,75 mmol) y el producto intermedio 4 (ácido (2S,4S)-4-(metiltio)pirrolidin-2-carboxílico) (1,93 mmol). La purificación mediante cromatografía ultrarrápida proporciona el producto deseado (537 mg, 1,24 mmol).

Producto intermedio 12: Ácido (2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-metilpirrolidin-2-carboxílico



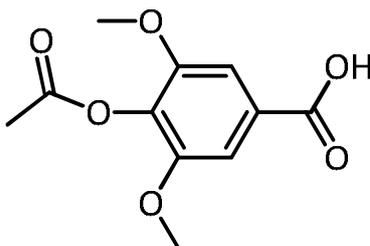
Se prepara siguiendo el procedimiento C descrito anteriormente a partir del producto intermedio 1 (ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico) (384 mg, 1,33 mmol) y el producto intermedio 5 (ácido (2S,4S)-4-metilpirrolidin-2-carboxílico) (1,47 mmol). La purificación mediante cromatografía ultrarrápida proporciona el producto deseado (342 mg, 0,85 mmol).

5 **Producto intermedio 13: Ácido (2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-acetoxipirrolidin-2-carboxílico**



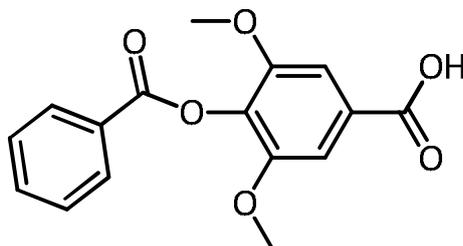
10 Se prepara siguiendo el procedimiento C descrito anteriormente a partir del producto intermedio 1 (ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico) (400 mg, 1,39 mmol) y el producto intermedio 6 (ácido (2S,4R)-4-acetoxipirrolidin-2-carboxílico) (1,53 mmol). La purificación mediante cromatografía ultrarrápida proporciona el producto deseado (342 mg, 0,85 mmol).

Producto intermedio 14: Ácido 4-acetoxi-3,5-dimetoxibenzoico



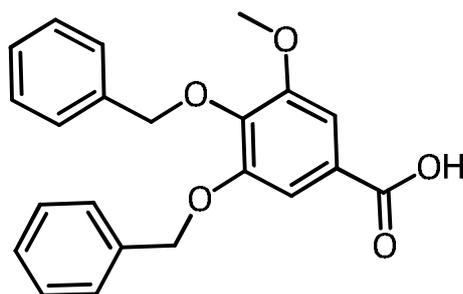
15 Se disuelve ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (300 mg, 1,51 mmol) en piridina (732 μ l, 9,08 mmol) a 0°C. Se añade anhídrido acético (214 μ l, 2,27 mmol) gota a gota mientras se agita la mezcla. El baño de hielo se mantiene durante 2 h, después de lo cual la mezcla se vierte en agua con hielo. La mezcla se extrae con DCM (3x), la fase orgánica se lava con disolución de HCl 1 N (3x), con agua y con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora, para dar ácido 4-acetoxi-3,5-dimetoxibenzoico (266 mg, 1,10 mmol).

Producto intermedio 15: Ácido 4-benzoiloxi-3,5-dimetoxibenzoico



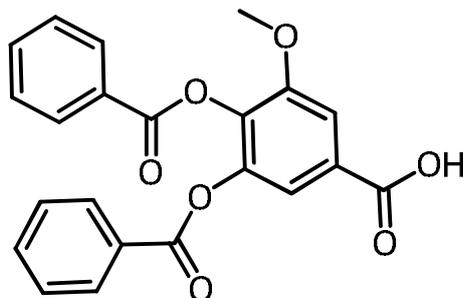
20 Se disuelve ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (300 mg, 1,51 mmol) en agua (6 ml) y luego se añade isopropanol (2,5 ml), seguido por carbonato de potasio (523 mg, 3,78 mmol). La mezcla se mantiene bajo argón y se enfría hasta 0°C. Entonces, se añade gota a gota cloruro de benzoilo (185 μ l, 1,59 mmol) a la mezcla de reacción con agitación vigorosa. Se forma un precipitado blanco espeso durante la adición. La mezcla se agita durante 20 min adicionales antes de extinguirse con HCl 6 M, mientras se mantiene la mezcla de reacción fría. El sólido se recoge por filtración, se lava con agua fría y se seca para dar ácido 4-benzoiloxi-3,5-dimetoxibenzoico como un sólido blanco (401 mg, 1,33 mmol).

Producto intermedio 16: Ácido 3,4-dibenciloxi-5-metoxibenzoico



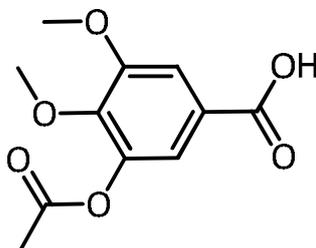
5 Se introducen 3,4-dihidroxi-5-metoxibenzoato de metilo (300 mg, 1,51 mmol), carbonato de potasio (1,0 g, 7,3 mmol) y yoduro de potasio (161 mg, 0,97 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se añade acetona (60 ml). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entonces, se añade a la mezcla de reacción cloruro de bencilo (1,39 ml, 12,1 mmol) y se mantiene la agitación a reflujo durante 8 horas. Después, la reacción se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Se añade agua y se realizan tres extracciones con éter dietílico, el extracto orgánico se lava con salmuera, se seca y se evapora. El producto en bruto se purifica mediante cromatografía ultrarrápida, proporcionando 377 mg (1,0 mmol). Posteriormente, se realiza la hidrólisis del éster metílico siguiendo el procedimiento A descrito anteriormente para dar ácido 3,4-dibenzoiloxi-5-metoxibenzoico (144, 0,4 mmol).

10 **Producto intermedio 17: Ácido 3,4-dibenzoiloxi-5-metoxibenzoico**



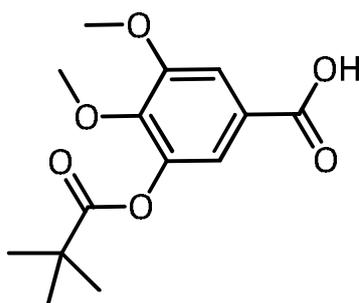
15 Se disuelve ácido 3,4-dihidroxi-5-metoxibenzoico (300 mg, 1,63 mmol) en agua (6 ml) y luego se añade isopropanol (2,5 ml), seguido por carbonato de potasio (1,13 g, 8,15 mmol). La mezcla se mantiene bajo argón y se enfría hasta 0°C. Entonces, se añade gota a gota cloruro de benzoilo (388 μ l, 3,34 mmol) a la mezcla de reacción con agitación vigorosa. La mezcla se agita durante 20 min adicionales antes de extinguirse con HCl 6 M, mientras se mantiene la mezcla de reacción fría. A continuación, se diluye con AcOEt y se separan las fases. La fase orgánica se lava sucesivamente con disolución de HCl 1 M y con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora. La purificación del producto en bruto mediante cromatografía ultrarrápida da ácido 3,4-dibenzoiloxi-5-metoxibenzoico como un sólido blanco (548 mg, 1,40 mmol).

20 **Producto intermedio 18: Ácido 3-acetoxi-4,5-dimetoxibenzoico**



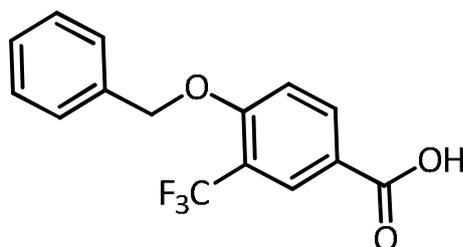
25 Se disuelve ácido 3-hidroxi-4,5-dimetoxibenzoico (300 mg, 1,51 mmol) en piridina (732 μ l, 9,08 mmol) a 0°C. Se añade anhídrido acético (214 μ l, 2,27 mmol) gota a gota mientras se agita la mezcla. El baño de hielo se mantiene durante 2 h, después de lo cual la mezcla se vierte en agua con hielo. La mezcla se extrae con DCM (3x), la fase orgánica se lava con disolución de HCl 1 N (3x), con agua (2x) y con salmuera (2x), se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora para dar ácido 3-acetoxi-4,5-dimetoxibenzoico (277 mg, 1,15 mmol).

Producto intermedio 19: Ácido 3-pivaloiloxi-4,5-dimetoxibenzoico



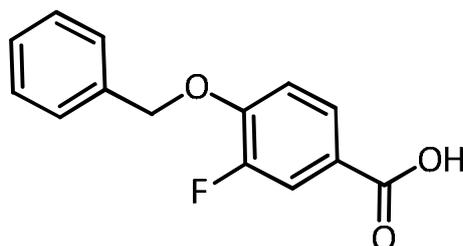
5 Una disolución de ácido 3-hidroxi-4,5-dimetoxibenzoico (300 mg, 1,51 mmol) y piridina (244 μ l, 3,02 mmol) en cloroformo (2 ml) se agita durante 30 min. A esta mezcla de reacción se le añade gota a gota una disolución de cloruro de pivaloilo (196 μ l, 1,59 mmol) en cloroformo (2 ml) a temperatura ambiente, y se agita la reacción hasta su finalización según CCF (alrededor de 3 h). A continuación, la mezcla de reacción se diluye con DCM, se añade una disolución de HCl 1 M y se separan las fases. La fase orgánica se lava sucesivamente con disolución de HCl 1 M (2x), con agua y con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida proporciona ácido 4-pivaloiloxi-3,5-dimetoxibenzoico (321 mg, 1,14 mmol).

Producto intermedio 20: Ácido 4-benciloxi-3-trifluorometilbenzoico



10 Se introducen ácido 4-hidroxi-3-trifluorometilbenzoico (1,0 g, 4,9 mmol) y carbonato de potasio (1,6 g, 11,6 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se añade DMF (10 ml) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se añade cloruro de bencilo (2,2 ml, 19,4 mmol) a la mezcla de reacción y se mantiene a reflujo durante 4 horas. Después de eso, la reacción se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Se añade agua y se realizan tres extracciones con acetato de etilo (3x50 ml), el extracto orgánico se lava con salmuera, se seca y se evapora. El producto en bruto se purifica mediante cromatografía ultrarrápida, proporcionando 1,3 g (3,4 mmol).
 15 Posteriormente, se realiza la hidrólisis del éster bencilico siguiendo el procedimiento A descrito anteriormente, para dar ácido 4-benciloxi-3-trifluorometilbenzoico (320 mg, 1,1 mmol).

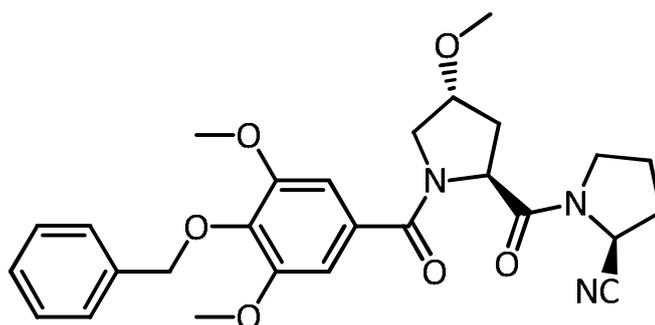
Producto intermedio 21: Ácido 4-benciloxi-3-fluorobenzoico



20 Se introducen ácido 4-hidroxi-3-fluorobenzoico (1,0 g, 6,4 mmol), carbonato de potasio (2,7 g, 19,2 mmol) y yoduro de potasio (532 mg, 3,2 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se añade acetona (140 ml) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se añade bromuro de bencilo (3,8 ml, 32,0 mmol) a la mezcla de reacción y se mantiene a reflujo durante 12 horas. Después de eso, la reacción se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Se añade agua y se realizan tres extracciones con acetato de etilo (3x50 ml), el extracto orgánico se lava con salmuera, se seca y se evapora. El producto en bruto se purifica mediante cromatografía ultrarrápida proporcionando 1,2 g (3,5 mmol).
 25 Posteriormente, se realiza la hidrólisis del éster bencilico siguiendo el procedimiento A descrito anteriormente, para dar ácido 4-benciloxi-3-fluorometilbenzoico (612 mg, 2,5 mmol).

Ejemplo 1:

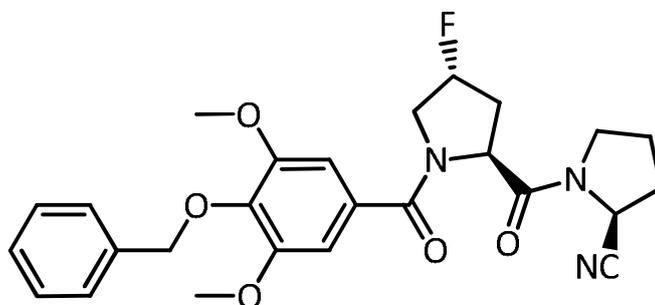
30 **(S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-metoxipirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**



5 (S)-pirrolidin-2-carbonitrilo (58 mg, 0,4 mmol), disponible comercialmente, y el producto intermedio 7 (ácido (2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-metoxipirrolidin-2-carboxílico) (220 mg, 0,5 mmol) se acoplan siguiendo el procedimiento D descrito anteriormente. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 10 mg (0,02 mmol) del producto final.

Ejemplo 2:

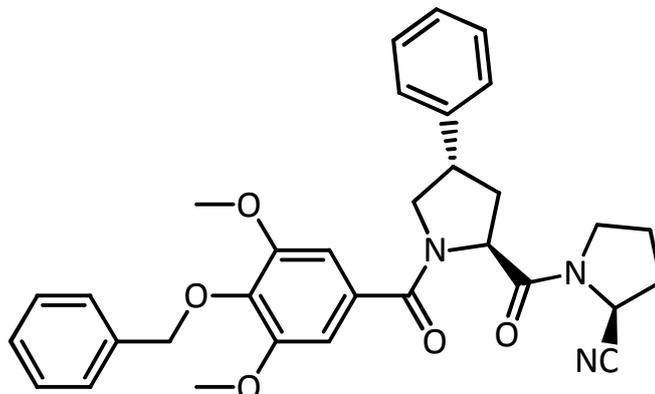
(S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo



10 A partir de resina de amida de Sieber disponible comercialmente (500 mg, 0,30 mmol, 1 eq), L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (400 mg, 1,2 mmol) y el producto intermedio 8 (ácido (2S,4R)-1-(4-(bencil(3,5-dimethoxyphenyl)oxy)-4-fluoropirrolidin-2-carboxílico) (239 mg, 0,60 mmol), el producto se prepara siguiendo el procedimiento E descrito anteriormente. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 80 mg (0,17 mmol) del producto final.

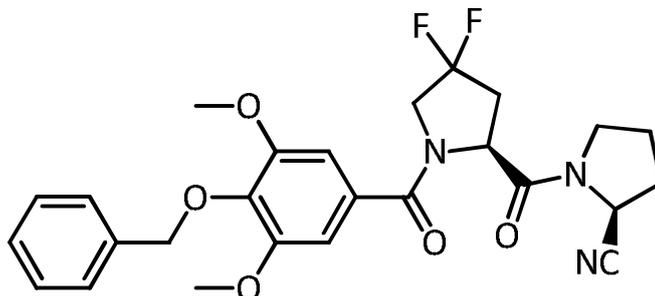
Ejemplo 3:

15 (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(bencil(3,5-dimethoxyphenyl)oxy)-4-fenilpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo

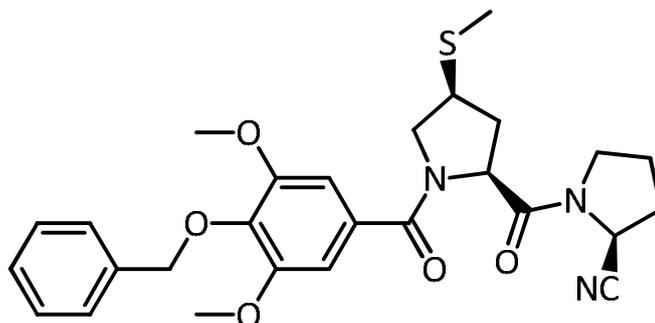


20 A partir de resina de amida de Sieber disponible comercialmente (500 mg, 0,38 mmol, 1 eq), L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (516 mg, 1,53 mmol) y el producto intermedio 9 (ácido (2S,4S)-1-(4-(bencil(3,5-dimethoxyphenyl)oxy)-4-fenilpirrolidin-2-carboxílico) (351 mg, 0,76 mmol), el producto se prepara siguiendo el procedimiento E descrito anteriormente. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 16 mg (0,03 mmol) del producto final.

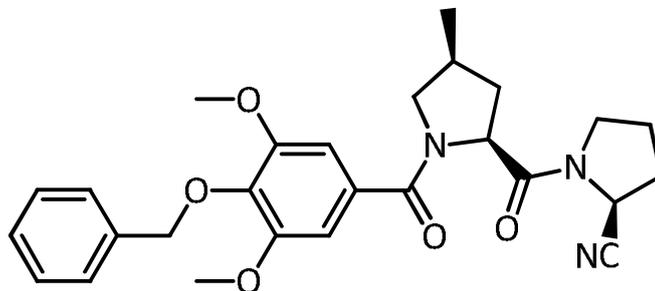
Ejemplo 4:

(S)-1-((2S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo

5 A partir de resina de amida de Sieber disponible comercialmente (250 mg, 0,19 mmol, 1 eq), L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (258 mg, 0,77 mmol) y el producto intermedio 10 (ácido (S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carboxílico) (161 mg, 0,38 mmol), el producto se prepara siguiendo el procedimiento E descrito anteriormente. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 18 mg (0,036 mmol) del producto final.

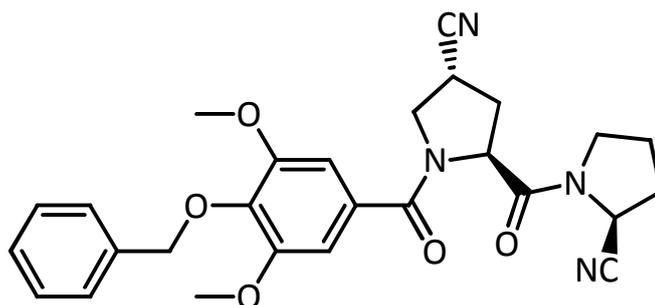
Ejemplo 5:**(S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(metiltio)pirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**

10 A partir de resina de amida de Sieber disponible comercialmente (500 mg, 0,38 mmol, 1 eq), L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (516 mg, 1,53 mmol) y el producto intermedio 11 (ácido (2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(metiltio)pirrolidin-2-carboxílico) (330 mg, 0,76 mmol), el producto se prepara siguiendo el procedimiento E descrito anteriormente. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 22 mg (0,043 mmol) del producto final.

Ejemplo 6:**(S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-metilpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**

20 A partir de resina de amida de Sieber disponible comercialmente (300 mg, 0,18 mmol, 1 eq), L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (247 mg, 0,73 mmol) y el producto intermedio 12 (ácido (2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-metilpirrolidin-2-carboxílico) (146 mg, 0,37 mmol), el producto se prepara siguiendo el procedimiento E descrito anteriormente. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 10 mg (0,02 mmol) del producto final.

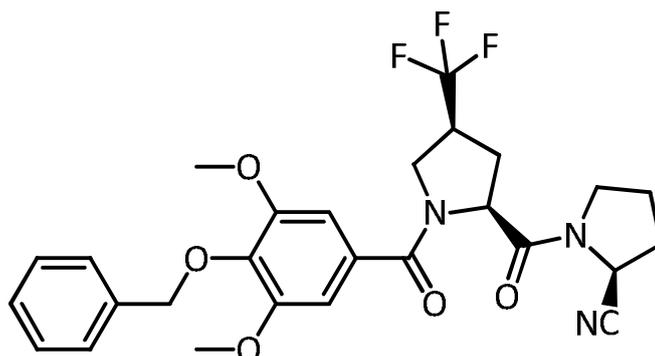
Ejemplo 7:**(S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-cianopirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**



5 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (516 mg, 1,53 mmol) y Boc-trans-4-ciano-L-prolina (368 mg, 1,53 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (500 mg, 0,38 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. Después de la escisión del dipéptido de la resina, se acopla el producto intermedio 1 (4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico) (145 mg, 0,5 mmol) al dipéptido-nitrilo resultante siguiendo el procedimiento C, a través de la formación del cloruro de ácido carboxílico. La purificación del bruto mediante RP-HPLC proporciona 11 mg (0,03 mmol) del producto final.

Ejemplo 8:

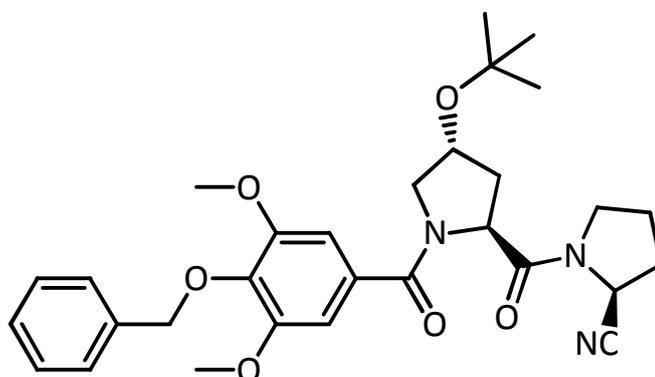
10 **(S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(trifluorometil)-pirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**



15 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (135 mg, 0,40 mmol), ácido (2S,4S)-Fmoc-4-trifluorometil-pirrolidin-2-carboxílico (162 mg, 0,40 mmol) y el producto intermedio 1 (ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico) (115 mg, 0,40 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (165 mg, 0,10 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 13 mg (0,045 mmol) del producto final.

Ejemplo 9:

(S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(terc-butoxi)pirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo

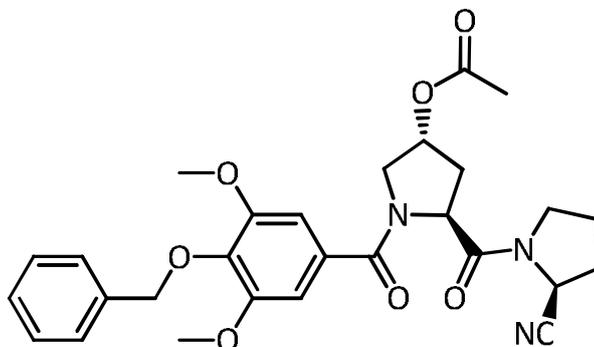


20 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (135 mg, 0,40 mmol), Fmoc-4-terc-butoxi-L-prolina (164 mg, 0,40 mmol) y el producto intermedio 1 (ácido 4-benciloxi-3,5-dimetoxibenzoico) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (165 mg, 0,10 mmol, 1 eq), a través de un

acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 22 mg (0,076 mmol) del producto final.

Ejemplo 10:

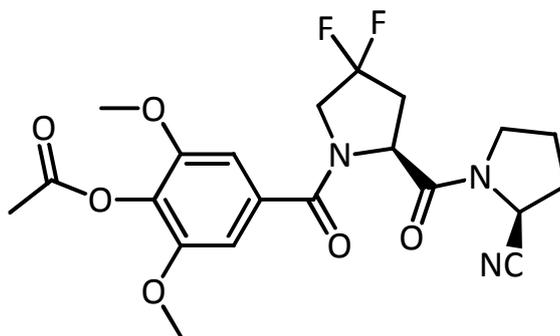
(S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-acetoxipirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo



5 A partir de resina de amida de Sieber disponible comercialmente (165 mg, 0,10 mmol, 1 eq), L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (135 mg, 0,40 mmol) y el producto intermedio 13 (ácido (2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-acetoxipirrolidin-2-carboxílico) (90 mg, 0,20 mmol), el producto se prepara siguiendo el procedimiento E descrito anteriormente. La purificación mediante RP-HPLC da 6,2 mg (0,012 mmol) del producto final.

Ejemplo 11:

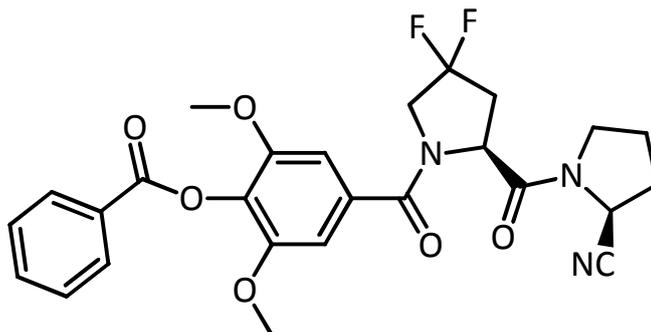
(S)-1-((2S)-1-(4-acetoxi-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo



15 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (135 mg, 0,40 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (149 mg, 0,40 mmol) y el producto intermedio 14 (ácido 4-acetoxi-3,5-dimetoxibenzoico) (96 mg, 0,40 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (165 mg, 0,10 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 25 mg (0,054 mmol) del producto final.

Ejemplo 12:

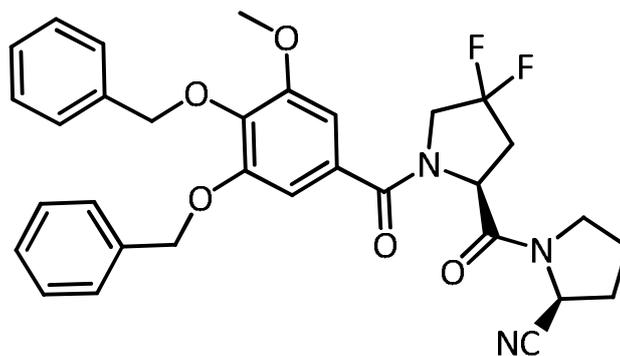
20 **(S)-1-((2S)-1-(4-benzoiloxi-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**



5 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (135 mg, 0,4 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (149 mg, 0,4 mmol), y el producto intermedio 15 (ácido 4-benzoiloxi-3,5-dimetoxibenzoico) (121 mg, 0,4 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (165 mg, 0,1 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 26 mg (0,051 mmol) del producto final.

Ejemplo 13:

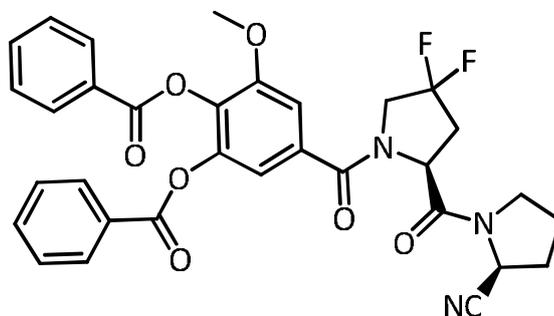
(S)-1-((2S)-1-(3,4-dibenciloxi-5-metoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo



10 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (135 mg, 0,4 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (149 mg, 0,4 mmol) y el producto intermedio 16 (ácido 3,4-dibenciloxi-5-metoxibenzoico) (146 mg, 0,4 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (165 mg, 0,1 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 24 mg (0,041 mmol) del producto final.

Ejemplo 14:

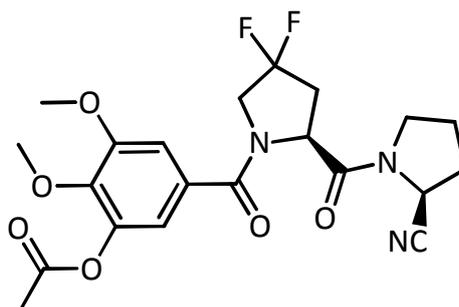
15 **(S)-1-((2S)-1-(3,4-dibenzoiloxi-5-metoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**



20 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (135 mg, 0,4 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (149 mg, 0,4 mmol) y el producto intermedio 17 (ácido 3,4-dibenzoiloxi-5-metoxibenzoico) (157 mg, 0,4 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (165 mg, 0,1 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 31 mg (0,052 mmol) del producto final.

Ejemplo 15:

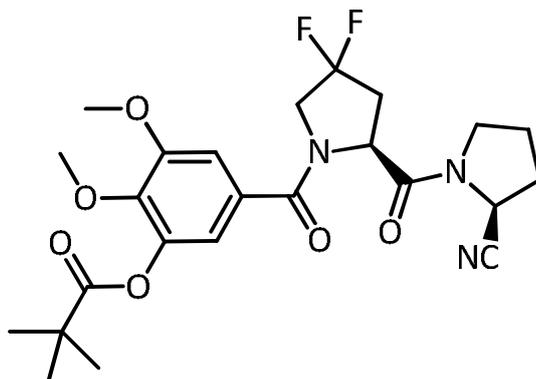
(S)-1-((2S)-1-(3-acetoxi-4,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo



5 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (135 mg, 0,4 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (149 mg, 0,4 mmol) y el producto intermedio 18 (ácido 3-acetoxi-4,5-dimetoxibenzoico) (96 mg, 0,4 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (165 mg, 0,1 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 22 mg (0,048 mmol) del producto final.

Ejemplo 16:

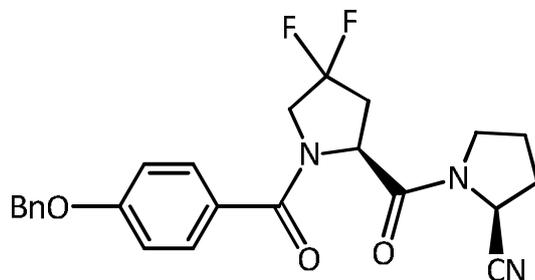
(S)-1-((2S)-1-(3-pivaloiloxi-4,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo



10 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (135 mg, 0,4 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (149 mg, 0,4 mmol) y el producto intermedio 19 (ácido 3-pivaloiloxi-4,5-dimetoxibenzoico) (113 mg, 0,4 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (165 mg, 0,1 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 19 mg (0,040 mmol) del producto final.

Ejemplo 17:

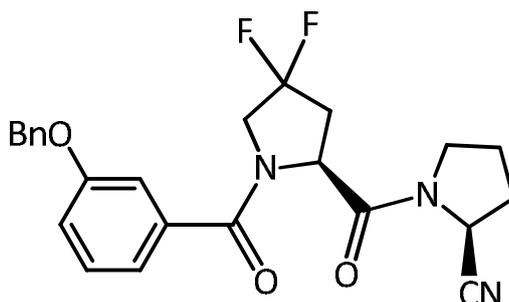
15 **(S)-1-((S)-1-(4-(benciloxi)benzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**



20 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (150 mg, 0,45 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (166 mg, 0,45 mmol) y ácido 4-benciloxibenzoico (101 mg, 0,45 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (200 mg, 0,15 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 17 mg (0,038 mmol) del producto final.

Ejemplo 18:

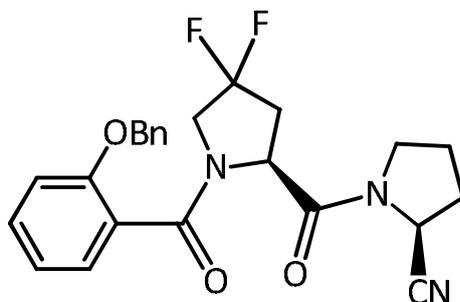
(S)-1-((S)-1-(3-(benciloxi)benzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo



5 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (150 mg, 0,45 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (166 mg, 0,45 mmol) y ácido 3-benciloxibenzoico (101 mg, 0,45 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (200 mg, 0,15 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 8 mg (0,018 mmol) del producto final.

Ejemplo 19:

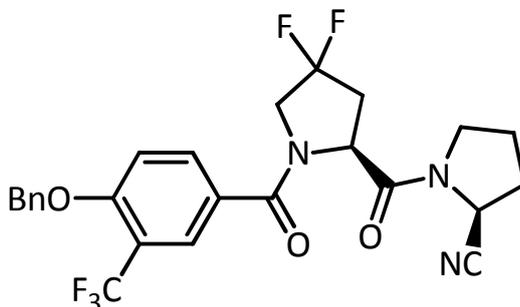
(S)-1-((S)-1-(2-(benciloxi)benzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo



10 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (150 mg, 0,45 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (166 mg, 0,45 mmol) y ácido 2-benciloxibenzoico (101 mg, 0,45 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (200 mg, 0,15 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 5 mg (0,011 mmol) del producto final.

Ejemplo 20:

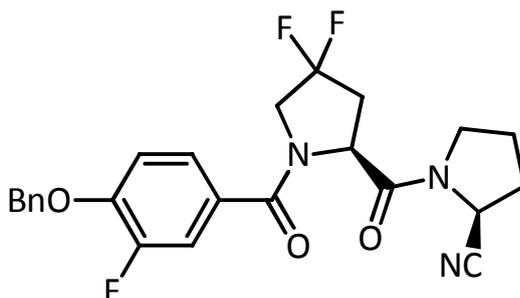
15 **(S)-1-((S)-1-(4-(benciloxi)-3-(trifluorometil)benzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**



20 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (150 mg, 0,45 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (166 mg, 0,45 mmol) y el producto intermedio 20 (ácido 4-benciloxi-3-trifluorometilbenzoico) (132 mg, 0,45 mmol) se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (200 mg, 0,15 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 32 mg (0,061 mmol) del producto final.

Ejemplo 21:

(S)-1-((S)-1-(4-(benciloxi)-3-fluorobenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo



25 L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) (150 mg, 0,45 mmol), Fmoc-4,4-difluoro-L-prolina (166 mg, 0,45 mmol) y el producto intermedio 21 (ácido 4-benciloxi-3-fluorobenzoico) (109 mg, 0,45 mmol)

se acoplan secuencialmente a resina de amida de Sieber disponible comercialmente (200 mg, 0,15 mmol, 1 eq), a través de un acoplamiento gradual tal como se describió en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 14 mg (0,030 mmol) del producto final.

Datos farmacológicos

5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBIDOR DE COMPUESTOS NOVEDOSOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE PROLIL OLIGOPEPTIDASA (HUMANA)

Expresión y purificación de prolil oligopeptidasa (POP)

Se obtuvo POP mediante expresión en *E. coli* y purificación por afinidad usando una fusión con cola de His de acuerdo con un procedimiento de la bibliografía (Tarragó T *et al*, ChemBioChem 2006; 7:827-33) resumido a continuación:

Expresión de hPOP: Células competentes *E. coli* BL21 se transformaron con pETM10 hPOP. Para inducir la expresión, un pre-cultivo de medio LB (50 ml) que contenía kanamicina (50 µg/ml) se inoculó con una colonia y se cultivó durante la noche a 37°C. Al día siguiente, dos cultivos de medio LB (500 ml) se inocularon con el cultivo durante la noche (10 ml). Los cultivos inoculados se hicieron crecer a 37°C y 220 rpm hasta que la DO₅₉₅ fue de 1,2 (de 2,5 a 3 horas). A continuación se añadió IPTG (concentración final de 1 mM) y la inducción se realizó durante la noche a 25°C. Las células se recogieron (3500 g, 15 min, 4°C) y el sedimento se suspendió en tampón de suspensión (50 ml) [Tris-HCl pH 8 (50 mM), NaCl (300 mM), imidazol (1 mM)] y se sonicó con el uso de cuatro ciclos (consistiendo cada uno en 15 segundos de sonicación y 15 segundos de reposo) a una intensidad del 50% y 0,5 pulsos; manteniéndose la muestra en hielo. Después de la sonicación, la muestra se centrifugó (40000 g, 30 min, 4°C) y el sobrenadante se usó inmediatamente para la purificación de POP. Un sistema de FPLC ÄKTA explorer se usó para la purificación. El sobrenadante se aplicó a un flujo de 1 ml/min a una columna HiTrapQuelating (5 ml) previamente equilibrada con 5 volúmenes de columna de tampón de suspensión. La columna se lavó con tampón de suspensión hasta que la absorbancia a 280 nm volvió al nivel basal. La columna se aclaró a continuación con 5 volúmenes de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM). La elución se realizó con 4 volúmenes de tampón de elución (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM). Las fracciones (4 ml) se recogieron durante toda la elución. La actividad de POP se comprobó en todas las fracciones y las positivas se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con colorante Coomassie G-250 de Biosafe. Las fracciones positivas se recogieron y se desalaron mediante el uso de una columna de desalación HiPrep 26/10 con Tris-HCl (50 mM, pH 8) como tampón. La hPOP recombinante se cuantificó con el ensayo de proteínas Bio-Rad con BSA como patrón. Las alícuotas de la enzima recombinante se prepararon y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Ensayos de inhibición de POP

La actividad de POP se determinó siguiendo el método descrito por Toide *et al* (Toide K *et al*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1995; 274:1370-8), usando Z-G-P-AMC (N-benciloxycarbonil-Gly-Pro-metilumarinil-7-amida) como sustrato de POP. Las reacciones se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos, lo que permitió la monitorización simultánea de múltiples reacciones. Para cada reacción, el tampón de actividad (134 µl, tampón de fosfato de Na/K 100 mM, pH 8,0) se preincubó durante 15 min a 37°C con hPOP (que oscilaba entre 20 y 60 nM, dependiendo de la actividad del lote de hPOP) y la disolución de compuesto nuevo correspondiente (3 µl). Una disolución madre de compuesto nuevo se preparó en DMSO (100 mM), y las diluciones se prepararon a partir de esta disolución madre con DMSO. Alternativamente, las reacciones se realizaron usando otro tampón de actividad (141 µl, Tris-acetato 100 mM, BSA 10 mM, DTT 1 mM, pH 7,3), preincubando con hPOP (10 nM) y la disolución de compuesto nuevo correspondiente (3 µl) (condiciones B).

Después de la preincubación, se añadió Z-G-P-AMC (10 µl, 3 mM en el 40% de 1,4-dioxano) (3 µl, 1,5 mM en el 40% de 1,4-dioxano en las condiciones B), y la reacción se incubó durante 1 hora a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de acetato de sodio (150 µl, 1 M, pH 4) y la formación de AMC se midió fluorimétricamente. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 360/40 y 485/20 nm, respectivamente.

Para cada compuesto se midieron varios puntos de concentración (que oscilaron entre 25 pM y 400 µM). La actividad inhibidora sobre prolil oligopeptidasa se calculó de acuerdo a la ecuación 1. Para cada compuesto nuevo, se midió la fluorescencia en presencia (a) y en ausencia de hPOP (b). La fluorescencia máxima (el 0% de actividad inhibidora) se obtuvo de una muestra de hPOP en ausencia de compuestos inhibidores. Para la estimación de la potencia inhibidora del compuesto novedoso, las actividades se representaron frente a la concentración logarítmica del compuesto, ajustando a una curva sigmoidea usando el software GraphPad Prism, y a partir de la curva resultante se determinó el valor de CI₅₀, definido como la concentración de compuesto requerida para inhibir el 50% de la actividad de POP.

$$55 \quad \text{Actividad inhibidora (\%)} = \left[1 - \left(\frac{a - b}{c - d} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde:

a corresponde a la intensidad de fluorescencia en presencia de sustrato + compuesto analizado + hPOP

b corresponde a la intensidad de fluorescencia en presencia de sustrato + compuesto analizado

c corresponde a la intensidad de fluorescencia en presencia de sustrato + hPOP

5 *d* corresponde a la intensidad de fluorescencia en presencia de sustrato.

Los nuevos compuestos muestran una alta potencia de inhibición frente a prolil oligopeptidasa humana. Los resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Inhibición de prolil oligopeptidasa humana.

Compuesto (ejemplo n.º)	CI ₅₀ (nM)	DE
1	63,8	11,4
2	60,4	10,6
3	339,0	138,5
4	48,7	20,3
5	175,9	72,0
6	13,1 (*)	7,3
8	176,5	8,3
9	668,1	327,3
11	352	–
12	111	–
13	336	–
15	5600	–
16	2140	–
17	287,3 (*)	135,8
18	487,3 (*)	16,8
19	255,4 (*)	34,2
20	4,5 (*)	0,02
21	5,0 (*)	1,6

(*) Medido en condiciones B

10 **Actividad inhibidora contra proteasas específicas de prolina relacionadas**

Se sometió a prueba el efecto inhibidor de los nuevos compuestos sobre la actividad de dipeptidil peptidasa IV (DPPIV). Se siguió el procedimiento descrito anteriormente para la determinación de la actividad inhibidora sobre prolil oligopeptidasa, usando G-P-AMC (H-Gly-Pro-metilcumarinil-7-amida) como sustrato. Después de la preincubación de DPPIV con el tampón de actividad y la disolución del compuesto correspondiente, se añadió G-P-AMC (10 µl, 750 µM en el 40% de 1,4-dioxano), y la reacción se incubó durante 20 min a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de acetato de sodio (150 µl, 1 M, pH 4) y la formación de AMC se midió fluorimétricamente. Para cada compuesto se midieron varios puntos de concentración (que oscilaron entre 100 µM y 400 µM). La actividad inhibidora sobre DPPIV se calculó de acuerdo con la ecuación 1. Ninguno de los compuestos novedosos mostró actividad inhibidora frente a dipeptidil peptidasa IV (valores de CI₅₀ superiores a 400 µM), y son por lo tanto inhibidores específicos de POP.

Además, se sometió a prueba la actividad inhibitoria de los compuestos nuevos frente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP). Se siguió un procedimiento similar al descrito anteriormente para la determinación de la actividad inhibitoria sobre POP. Z-G-P-AMC se usó como sustrato, a una concentración final de 100 μM . El tampón usado en los ensayos fue Tris 50 mM, NaCl 1 M, BSA 1 mg/ml, pH: 7,5. Se usó FAP humana recombinante a una concentración de disolución madre de 2 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de actividad, llevando a una concentración final de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ en el ensayo. Las disoluciones madre de cada compuesto nuevo se prepararon a 20 mM en DMSO y se diluyeron convenientemente. Después de la preincubación de FAP con el tampón de actividad y la disolución de compuesto nuevo correspondiente a 37°C durante 15 min, se añadió el sustrato (50 μl , 100 μM en tampón de actividad), y la reacción se incubó durante 1 hora a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de acetato de sodio (150 μl , 1 M, pH 4) y la formación de AMC se midió fluorimétricamente. Para cada compuesto se midieron varios puntos de concentración (que oscilaron entre 100 μM y 400 μM). La actividad inhibitoria sobre FAP se calculó de acuerdo a la ecuación 1. Ninguno de los compuestos novedosos mostraron actividad inhibitoria frente a FAP (valores de CI_{50} superiores a 400 μM), y son por lo tanto inhibidores específicos de POP.

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES DE PERMEABILIDAD DE LOS COMPUESTOS

15 Ensayo de permeabilidad a través de membrana artificial paralela (PAMPA)

Para determinar la capacidad de los compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) mediante difusión pasiva (Di L *et al*, Eur. J. Med. Chem. 2003; 38(3):223-32) se usó el ensayo de permeabilidad a través de membrana artificial paralela (PAMPA) descrito en Kansy M *et al.*, J. Med. Chem. 1998; 41(7):1007-10. La permeabilidad efectiva (P_e) de los compuestos se midió a una concentración inicial de 200 μM . La disolución tampón se preparó a partir de una concentrada comercial siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ajustó el pH a 7,4 usando una disolución de NaOH 0,5 M. Se preparó una disolución madre de compuesto nuevo en DMSO y se diluyó con disolución tampón hasta una concentración final de 200 μM (contenido de DMSO del 0,5%). El sándwich PAMPA se separó y cada pocillo donante se llenó con 200 μl de la disolución de compuesto. La placa aceptora se colocó en la placa donante, asegurando que el lado inferior de la membrana estaba en contacto con el tampón. Se añadieron 4 μl de la mezcla de fosfolípidos (20 mg/ml) en dodecano al filtro de cada pocillo, y se añadieron 200 μl de disolución tampón en cada pocillo aceptor. La placa se cubrió y se incubó a temperatura ambiente en una atmósfera de humedad saturada durante 4 horas con agitación orbital a 100 rpm. Después de 4 horas, los contenidos de los compartimentos aceptores y donantes se analizaron por HPLC: 150 μl de cada pocillo de la placa donante y 150 μl de cada pocillo de la placa aceptora se transfirieron a viales de HPLC, inyectando cada muestra en una columna C_{18} de fase inversa (150 mm x 4,6 mm x 5 μm , 100 \AA) (100 μl /inyección de los pocillos aceptores, 10 μl /inyección de los pocillos donantes y para las referencias a t_0). El transporte también se confirmó mediante espectrometría MALDI-TOF.

La mezcla de fosfolípidos usada fue un extracto de lípidos polares de cerebro porcino, proporcionado por Avanti Polar Lipids, con la siguiente composición: el 12,6% de fosfatidilcolina (PC), el 33,1% de fosfatidiletanolamina (PE), el 18,5% de fosfatidilserina (PS), el 4,1% de fosfatidilinositol (PI), el 0,8% de ácido fosfático y el 30,9% de otros compuestos.

La permeabilidad efectiva (P_e) después de 4 horas se calculó usando la ecuación 2 y el porcentaje de transporte se calculó usando la ecuación 3:

$$P_e = \frac{-218,3}{t} \times \log \left[1 - \frac{2C_A(t)}{C_D(t_0)} \right] \times 10^{-6} \text{ cm/s} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$T\% = \frac{C_A(t)}{C_D(t_0)} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde:

t es el tiempo (h)

$C_A(t)$ es la concentración de compuesto en el pocillo aceptor a tiempo t

y $C_D(t_0)$ es la concentración de compuesto en el pocillo donante a t_0 .

45 Basándose en los valores indicativos de P_e mostrados en la tabla 2, los compuestos novedosos muestran buena permeabilidad a través de la BBB (tabla 3).

Tabla 2: Valores indicativos de P_e

Valores indicativos de P_e (cm/s)	Transporte al interior del SNC
-------------------------------------	--------------------------------

$P_e \geq 4 \cdot 10^{-6}$	Bueno
$2 \cdot 10^{-6} \leq P_e < 4 \cdot 10^{-6}$	Cuestionable
$P_e < 2 \cdot 10^{-6}$	Malo

Tabla 3: Permeabilidad efectiva (P_e) y porcentaje de transporte de los nuevos compuestos

Compuesto (ejemplo n.º)	P_e ($\times 10^{-6}$ cm/s)	DE	% de T	DE
1	1,00	0,1	4,3	--
2	7,28	2,75	13,03	4,39
3	2,89	0,84	5,72	1,58
4	22,14	5,86	29,92	4,80
5	9,98	3,07	17,03	4,25
6	3,79	0,16	14,76	0,59
8	5,07	0,30	19,27	1,00
12	2,10	0,02	8,47	0,06
16	5,02	0,30	19,08	1,01
17	8,04	3,13	14,12	4,69
18	6,51	1,79	11,91	2,88
19	10,29	1,50	17,55	2,03
20	1,29	0,66	2,64	1,33
21	5,57	1,25	10,43	2,06

5 EFECTO DE LOS COMPUESTOS NUEVOS SOBRE EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA EN UN MODELO ANIMAL DE DETERIORO COGNITIVO

Los compuestos nuevos se evaluaron para determinar su eficacia como potenciadores de la cognición en un modelo farmacológico para deterioro cognitivo. Los efectos de los compuestos nuevos se evaluaron en roedores sin tratar y tratados con MK-801 (ratones o ratas). MK-801 es un antagonista no competitivo del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) que altera la conducta animal en diversos paradigmas de aprendizaje y memoria (Castellano C *et al.*, Curr. Drug Targets 2001; 2: 273–83.; Riedel G *et al.*, Behav. Brain Res. 2003; 140:1–47). MK-801 también produce diversos efectos sobre el comportamiento de roedores, incluyendo déficits en el procesamiento sensorial, hipermovilidad, estereotipia y ataxia. El fenotipo de comportamiento inducido por el tratamiento con MK-801 se ha usado ampliamente como modelo animal de déficits cognitivos (Bardgett ME *et al.*, Brain Res. Bull. 2003; 60:131–42; Van der Staay FJ *et al.*, Behav. Brain Res. 2011; 220:215–29; Mutlu O *et al.*, Pharmacol. Biochem. Behav. 2011; 99:557–65).

Con el fin de determinar si los compuestos sometidos a prueba actúan como potenciador cognitivo, su capacidad para restaurar el comportamiento cognitivo normal se sometió a prueba mediante pruebas ampliamente usadas tales como la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (Dere E *et al.*, Neurosci. Biobehav. Rev. 2007; 31:673–704; Boess FG *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007; 321:716–25); la tarea de evitación pasiva o inhibitoria (Sarter M *et al.*, Psychopharmacology (Berl) 1992; 107:144–59); el laberinto de agua de Morris (D’Hooge R *et al.*, Brain Res. Rev. 2001; 36:60–90); y la tarea de alternancia de laberinto en T (Boess FG *et al.*, Neuropharmacology 2004; 47:1081–92; Spowart-Manning L *et al.*, Behav. Brain Res. 2004; 151:37–46).

Como ejemplo representativo de la evaluación de los nuevos inhibidores de POP, se describe el protocolo seguido para cada una de las pruebas de comportamiento, así como los resultados obtenidos en la prueba de reconocimiento de objetos y la prueba de evitación pasiva.

Tarea de reconocimiento de objetos nuevos

La tarea de reconocimiento de objetos nuevos (NOR) se basa en la preferencia natural de los roedores por explorar objetos nuevos (Ennaceur A *et al.*, Behav. Brain Res. 1988; 31:47–59). Es una prueba relevante sin recompensa para estudiar déficits de aprendizaje visual y memoria. En resumen, el procedimiento de la tarea de NOR consistió en tres ensayos: habituación, entrenamiento y retención. Cada animal se habituó a un campo circular de 40 cm de diámetro durante 10 min en ausencia de objetos (sesión de habituación). Al día siguiente, el animal se colocó durante 10 min en el campo circular para el ensayo de entrenamiento, y dos objetos idénticos se colocaron en una posición simétrica. Esta etapa se realizó durante dos días consecutivos. En el tercer día, uno de los objetos se sustituyó por un objeto diferente. El objeto no usado en el ensayo de entrenamiento se usó como objeto nuevo en el ensayo de retención. Entonces se dejó que los animales exploraran libremente durante 10 min, y se registró el tiempo dedicado a explorar cada objeto. Se espera que el animal dedique más tiempo a explorar el objeto nuevo, lo cual es un signo de memoria de reconocimiento intacta. Un índice de distinción se calculó de la siguiente manera: tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo menos tiempo dedicado a explorar el objeto antiguo, dividido entre el tiempo total explorando ambos objetos, y multiplicado por 100. Se consideró que un índice de distinción superior reflejaba una mayor retención de memoria.

El inhibidor de POP sometido a prueba correspondiente, recién disuelto en Tween 80 al 5% en PBS, se administró por vía subcutánea (s.c.) a una dosis de 5 mg/Kg, en un volumen de 0,1 ml por 10 g de peso corporal del animal. Quince minutos después, MK-801 disuelto en tampón PBS se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 0,2 mg/kg, en un volumen de 0,1 ml por 10 g de peso corporal del animal. A un grupo de control se le administró i.p. MK-801 y s.c. el mismo volumen de vehículo (PBS con un 5% de Tween 80). Otro grupo de control recibió PBS i.p. y el mismo volumen de vehículo s.c. Las dosis de fármaco se seleccionaron según estudios de comportamiento y neuroquímicos, mostrando que los fármacos tienen el efecto previsto. A los animales se les inyectaron los dos fármacos cada día durante el periodo de entrenamiento así como antes de la sesión de prueba.

Los resultados obtenidos cuando se administró el compuesto del ejemplo 4, como representativo de los compuestos de la invención, se muestran en la figura 1.

Tal como se ilustra con el compuesto del ejemplo 4, los compuestos de la invención pueden revertir el deterioro de la memoria inducido por MK-801 en la prueba de NOR.

Tarea de evitación pasiva

Para la evaluación de la tarea de evitación pasiva, se usó una caja de dos compartimentos con un compartimento claro y un compartimento oscuro de iguales dimensiones. Los dos compartimentos estaban separados por una puerta de guillotina que podía levantarse. El aparato usado era según procedimientos convencionales para esta prueba. Se realizaron una sesión de descarga y una sesión de evaluación, separadas por intervalos entre sesiones de 24 h. En la sesión de descarga, el roedor se colocó en el compartimento claro. Tras un periodo de acomodación de 20 s, la puerta de guillotina al otro compartimento se abrió y volvió a bajarse una vez que el roedor había entrado en el compartimento oscuro. Entonces se administró una descarga corta y débil en las patas. El roedor se retiró del aparato 60 s tras terminarse la descarga y se puso de vuelta en su jaula. En la sesión de evaluación, se midió el tiempo que tarda el animal en entrar en el compartimento oscuro (en segundos) como signo de retención de memoria de la descarga recibida en el compartimento oscuro durante la sesión anterior. Una segunda sesión de evaluación se realizó una semana tras la sesión de descarga inicial. El compuesto evaluado correspondiente se inyectó s.c. 35 min antes de la sesión de descarga, seguido 15 minutos después por inyección i.p. de MK-801, o PBS en el caso del control, a las mismas dosis y volumen que los descritos para la prueba de reconocimiento de objetos. Los animales tratados con MK-801 solo mostraron poca retención de la memoria de la sesión de descarga, mientras que los animales que además recibieron un inhibidor de POP mostraron una mayor latencia para entrar en el compartimento oscuro, indicativa de una mejor retención de memoria.

Los resultados obtenidos cuando se administró el compuesto del ejemplo 4, como representativo de los compuestos de la invención, se muestran en la figura 2.

Tal como se ilustra con el compuesto del ejemplo 4, los compuestos de la invención pueden revertir el deterioro de la memoria inducido por MK-801 en la prueba de evitación pasiva.

Laberinto de agua (prueba de escape de Morris)

Se evaluó la conducta de escape de agua de Morris en un tanque de agua, según procedimientos y dimensiones convencionales para esta prueba, lleno con agua del grifo teñida con látex a una temperatura de aproximadamente 22°C. La plataforma de escape consistía en un cilindro de polietileno gris, sumergido 1,5 cm por debajo de la superficie del agua. El inhibidor de POP evaluado correspondiente se administró s.c. 35 min antes de las sesiones de entrenamiento y de prueba, seguido tras 15 min por inyección i.p. de MK-801, o PBS en el caso del control, a la misma dosis y volumen que los descritos para la prueba de reconocimiento de objetos. A los animales se les inyectaron los dos compuestos cada día durante las sesiones de entrenamiento, así como en las sesiones de evaluación.

Los roedores recibieron dos series de sesiones de entrenamiento durante tres días consecutivos, con un intervalo de dos días entre las dos series. Cada sesión de entrenamiento consistió en dos series de tres ensayos, que se

realizaron en estrecha sucesión. Un ensayo se inició colocando al roedor en la piscina, mirando a la pared del tanque. Cuatro posiciones de partida (norte, este, sur y oeste) se usaron en orden aleatorizado. La plataforma de escape estaba siempre en el mismo cuadrante. Un ensayo se terminó en cuanto el animal había subido a la plataforma de escape o cuando habían transcurrido 60 s, lo que sucediera primero. Una vez que los roedores alcanzaron la plataforma, se les dejó permanecer en ella durante 30 s con el fin de permitirles asociar la plataforma de escape con una posición específica en el tanque. Entonces se sacó de la plataforma y se inició el siguiente ensayo. Si un animal no encontró la plataforma en el plazo de 60 s, el encargado del experimento lo puso sobre la plataforma y se le dejó permanecer en ella durante 30 s. Durante la primera sesión de entrenamiento se colocó una pista visual para marcar la posición de la plataforma. Esta pista se retiró para las siguientes sesiones. Durante las sesiones de entrenamiento se registró la latencia para alcanzar la plataforma.

El día tras terminarse la segunda serie de sesiones de entrenamiento, se realizó una evaluación: se retiró la plataforma, y se midió durante 60 s el tiempo que pasó el roedor en el cuadrante de la piscina en el que había estado colocada la plataforma durante las sesiones de entrenamiento (cuadrante objetivo). En el ensayo de sondeo, todos los animales se liberaron a partir de la misma posición de partida, opuesta al cuadrante objetivo. Los animales tratados con MK-801 no pudieron aprender y recordar eficazmente dónde estaba la plataforma, tal como se muestra mediante distancias de nado y latencia de escape más largas, así como el tiempo que pasaron estos animales en el cuadrante objetivo, que fue aproximadamente el promedio en comparación con los demás cuadrantes. Los animales que se trataron con MK-801 y con el inhibidor de POP correspondiente mostraron una mejor conducta en la prueba, aprendiendo la posición de la plataforma (tal como se refleja por un porcentaje superior de tiempo que pasaron en el cuadrante objetivo), mostrando por tanto que el efecto de MK-801 se revirtió eficazmente. Se dejó descansar a los animales durante una semana y posteriormente se entrenaron durante 4 días adicionales. En el quinto día se retiró la plataforma y se realizó una segunda evaluación.

Tarea de alternancia de laberinto en T

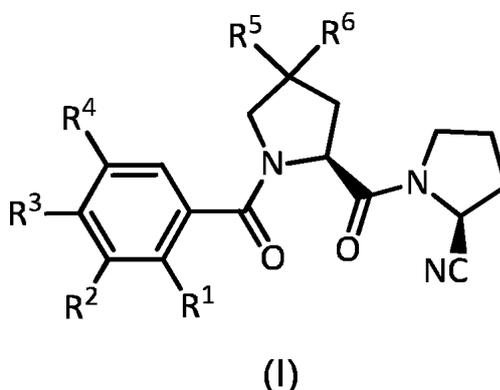
La memoria de trabajo se sometió a prueba usando una tarea de alternancia de laberinto en T. Los experimentos se realizaron en un laberinto en T construido con madera y pintado de negro, según dimensiones y procedimiento generales. Los pasillos laterales estaban cerrados del pasillo principal mediante puertas móviles. Una semana antes de la habituación, todos los animales se sometieron a restricción parcial de la alimentación y permanecieron de ese modo a lo largo de toda la parte restante del experimento, con el fin de mantener los animales al 85% de su peso corporal con alimentación libre. Una videocámara se situó ~1 m encima del laberinto en T para grabar en vídeo la sesión de prueba. El laberinto en T se limpió entre diferentes animales pero no entre diferentes ensayos. Todo el experimento consistió en tres partes: habituación, entrenamiento y pruebas. Durante la habituación, todos los animales se colocaron en el laberinto en T hasta que comieron dos trozos de alimento o habían transcurrido 90 s. Esto se repitió tres veces al día durante 5 d. Durante el entrenamiento, todos los animales recibieron seis ensayos al día por día. Cada ensayo consistió en dos ejecuciones: una ejecución forzada y una ejecución libre. En la ejecución forzada, se forzó a los roedores a obtener un trozo de alimento de un brazo objetivo del laberinto en T, estando el otro brazo objetivo bloqueado por su puerta. Los animales se colocaron entonces de vuelta en el brazo de partida durante un periodo de retardo de 10 s. Al comienzo de la ejecución libre, se dejó que los animales eligieran cualquier brazo objetivo. Si los animales elegían el brazo opuesto a aquel al que se les había forzado durante la ejecución forzada, recibían la recompensa de alimento. Si los animales elegían el mismo brazo al que se les había forzado, no recibían ninguna recompensa de alimento. Hubo un intervalo entre ensayos de 5 min. El periodo de entrenamiento terminó después de que los animales de control realizaran >70% de elecciones correctas en 2 días consecutivos. Los animales tardaron 7–12 días en alcanzar el criterio. Los animales que no alcanzaron el criterio a los 14 días se rechazaron del estudio. Los roedores se sometieron entonces a prueba para determinar su conducta a periodos de retardo de 10 ó 40 s. Los animales se sometieron a tres ensayos con retardo de 10 s y tres con retardo de 40 s durante el día de pruebas. Para someter a prueba el fármaco, los roedores se sometieron a seis ensayos con retardo de 10 s 15 min tras la exposición a fármaco. La secuencia de retardos y ubicaciones de alimento en ejecución forzada (o bien a la izquierda o bien a la derecha) se aleatorizaron cada día, siempre que no se usara el mismo retardo o la misma ubicación de brazo forzada para tres ensayos seguidos. Las entradas en objetivo se definieron como colocar las cuatro patas en el brazo.

El inhibidor de POP evaluado correspondiente se inyectó s.c. 35 min antes de la sesión de prueba, seguido 15 minutos después por inyección i.p. de MK-801, o PBS en el caso del control, a las mismas dosis y volumen que los descritos para la prueba de reconocimiento de objetos.

Los animales de control mostraron curvas de aprendizaje con una conducta a nivel casi de casualidad (aproximadamente el 50% de entradas en el brazo correcto) entre los días 1 y 4 de entrenamiento, y una mejora gradual entre los días 11 y 14 del entrenamiento alcanzando una meseta del 70% de entradas en el brazo correcto. Su conducta permaneció estable en ensayos con retardo de 10 y 40 s. Los animales tratados con MK-801 no pudieron aprender eficazmente la tarea de alternancia y presentaron una conducta por debajo del nivel de casualidad en los ensayos con retardo. Los animales que se trataron con MK-801 y con el inhibidor de POP correspondiente mostraron una mejor conducta en la prueba, con curvas de aprendizaje similares a los animales de control y retención de memoria en los ensayos con retardo, mostrando por tanto que el efecto de MK-801 se revirtió eficazmente.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



en la que

- 5 R^1 ; R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alcoxi C_{1-4} , alquilcarbonilo C_{1-4} , benciloxi, fenilcarbonilo, naftilcarbonilo, quinolinilcarbonilo, isoquinolinilcarbonilo, trifluorometilo, halógeno e hidrógeno;
- R^5 se selecciona del grupo que consiste en halógeno, nitrilo, alcoxi C_{1-4} , alquiltio C_{1-4} , alquilo C_{1-4} , fenilo, fenoxi, feniltio y trifluorometilo;
- 10 R^6 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, flúor y metilo;
- o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos.
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^2 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, trifluorometilo y alcoxi C_{1-4} .
- 15 3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que R^2 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y metoxi y R^4 se selecciona del grupo que consiste en flúor, trifluorometilo y metoxi.
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R^3 es un benciloxi.
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R^5 es flúor.
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que R^6 es hidrógeno o flúor.
- 20 7. Compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona de:
- (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-metoxipirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
 - (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
 - (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-fenilpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
 - (S)-1-((2S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo

25

 - (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(metiltio)pirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
 - (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-metilpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
 - (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-cianopirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
 - (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(trifluorometil)-pirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo

30

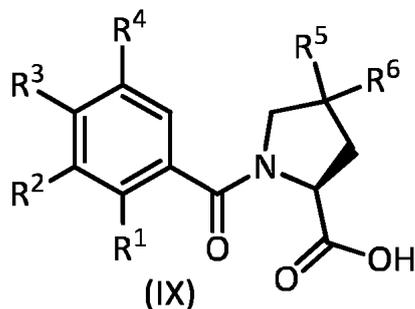
 - (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-(terc-butoxi)pirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
 - (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4-acetoxipirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo

- (S)-1-((2S)-1-(4-acetoxi-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S)-1-(4-benzoiloxi-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S)-1-(3,4-dibenciloxi-5-metoxibenzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S)-1-(3,4-dibenzoiloxi-5-metoxibenzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- 5 • (S)-1-((2S)-1-(3-acetoxi-4,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S)-1-(3-pivaloiloxi-4,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((S)-1-(4-(benciloxi)benzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((S)-1-(3-(benciloxi)benzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((S)-1-(2-(benciloxi)benzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- 10 • (S)-1-((S)-1-(4-(benciloxi)-3-(trifluorometil)benzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((S)-1-(4-(benciloxi)-3-fluorobenzoil)-4,4-difluorpirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo

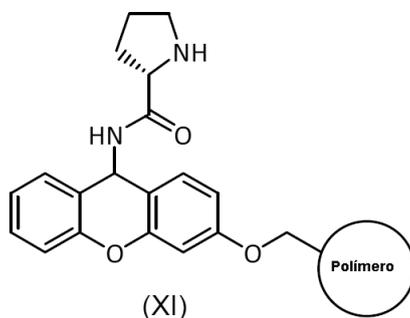
o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos.

8. Procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I) según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos, que comprende

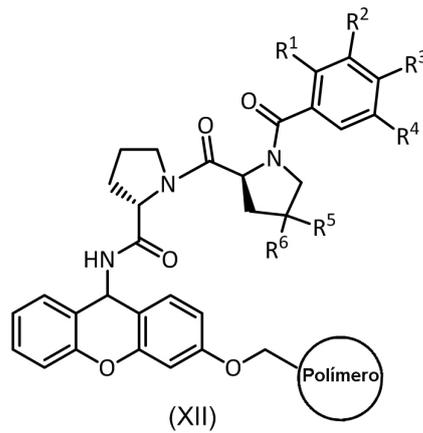
a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IX):



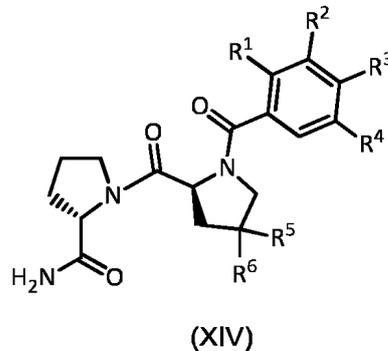
- 20 en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son tal como se definieron anteriormente en la fórmula (I), con un compuesto de fórmula (XI):



para dar un compuesto de fórmula (XII);



b) hidrolizar el compuesto de fórmula (XII) para dar el compuesto de fórmula (XIV)



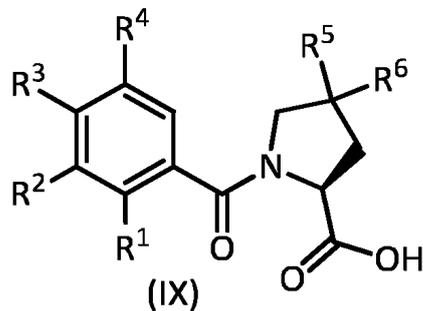
y

5 c) someter el compuesto de formula (XIV) a condiciones que pueden transformar un grupo carboxamida en un grupo nitrilo para dar el compuesto de formula (I);

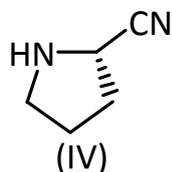
en el que las etapas b) y c) pueden realizarse por separado o en una reacción en un solo recipiente.

9. Procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I) según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos, que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IX):

10



en la que R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son tal como se definieron anteriormente en la fórmula (I), con un compuesto de fórmula (IV)



10. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, isómero geométrico o solvato de los mismos y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 11. Compuesto de fórmula (I) según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso como medicamento.
12. Compuesto de fórmula (I) según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno cognitivo.
- 10 13. Compuesto para su uso según se define en la reivindicación 12, en el que el trastorno cognitivo es un trastorno cognitivo asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esquizofrenia, trastorno afectivo bipolar, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

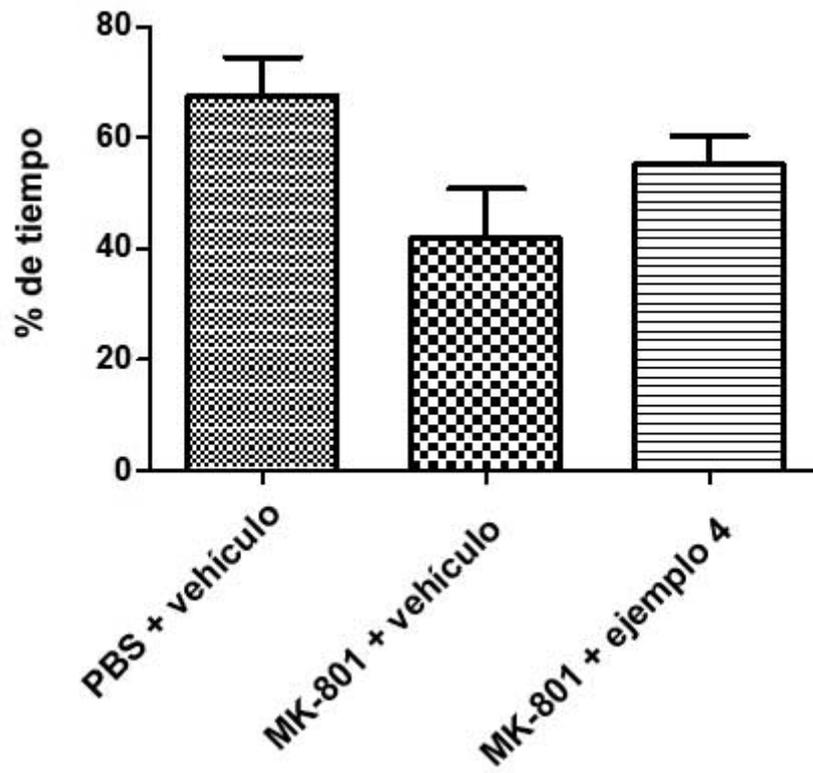


FIGURA 1

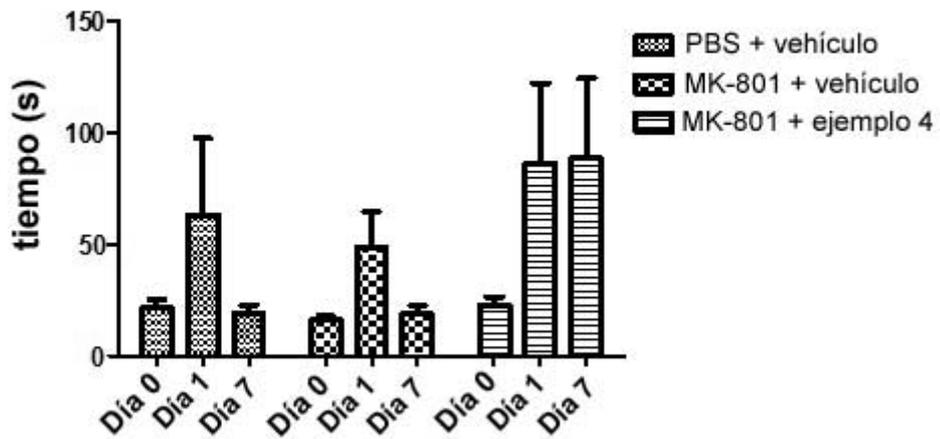


FIGURA 2