

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 164**

51 Int. Cl.:

C07D 207/16 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2021** **PCT/EP2021/068577**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2022** **WO22008477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2021** **E 21739678 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024** **EP 4178945**

54 Título: **1-[1-(4-Benciloxi-3,5-difluoro-benzoil)-4-fluoro-pirrolidin-2-carbonil]-pirrolidin-2-carbonitrilo**

30 Prioridad:

07.07.2020 EP 20382606

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

14.02.2025

73 Titular/es:

ACCURE THERAPEUTICS, S.L. (100.00%)
Baldiri Reixac, 4-8, Torres I, 5a Planta
08028 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

TARRAGÓ CLUA, TERESA y
PRADES COSANO, ROGER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 997 164 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

1-[1-(4-BENCILOXI-3,5-DIFLUORO-BENZOIL)-4-FLUORO-PIRROLIDIN-2-CARBONIL]-PIRROLIDIN-2-CARBONITRILLO

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad farmacológica, y más particularmente a 1-[1-(4-benciloxi-3,5-difluoro-benzoil)-4-fluoro-pirrolidin-2-carbonil]-pirrolidin-2-carbonitrilo, sus estereoisómeros y sales del mismo, a procedimientos de preparación de tales compuestos, a composiciones farmacéuticas que los comprenden, y a su uso en terapia y/o profilaxis de trastornos neurodegenerativos y/o deterioro cognitivo.

10 ANTECEDENTES

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

15 La enzima desempeña un papel importante en la descomposición de neuropéptidos que contienen prolina relacionados con las 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).

Los efectos de la inhibición de prolil oligopeptidasa se han sometido a prueba en el tratamiento de deficiencias cognitivas relacionadas con procesos neurodegenerativos. La enfermedad de Parkinson se generó en monos mediante el tratamiento con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), una neurotoxina que produce el
20 agotamiento 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 hallado que la inhibición de POP previene la oligomerización de α -sinucleína *ex vivo* (Myöhänen TT *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 2012;166(3):1097-113). En el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA), varios experimentos *in vivo* en modelos animales mostraron que la inhibición de POP conducía a efectos neuroprotectores y potenciadores de la
25 capacidad intelectual (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). Los efectos neuroprotectores se observaron originalmente por el grupo de Katsube, cuando se previno la apoptosis inducida por la edad de células en gránulos corticales y cerebelosos mediante el tratamiento con el inhibidor de POP ONO-1603 (Katsube N *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999;288(1):6-13).

30 Los ensayos clínicos con inhibidores de POP en el tratamiento de deficiencias cognitivas se han realizado sólo en algunos casos. En un estudio clínico en fase I, el grupo de Morain (Morain P *et al.*, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2000;50(4):350-9) hallaron que el inhibidor de prolil endopeptidasa S-17092 anteriormente mencionado tiene propiedades potenciadoras de la capacidad intelectual 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 para este compuesto (Morain P *et al.*, *Neuropsychobiology* 2007;55(3-4):176-83).

35 Se ha notificado que la actividad prolil oligopeptidasa se ve alterada (en la autopsia) 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).

También hay una cantidad sustancial de evidencias que apuntan a un papel de neuroinflamación en la patogenia 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
40 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, por consiguiente, los inhibidores de POP pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas con un componente inflamatorio, tales como
45 la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, y en particular ayudar a mejorar los trastornos cognitivos asociados con estas enfermedades.

Las placas seniles que se diseminan a lo largo de las áreas corticales del cerebro son señales distintivas neuropatológicas típicas de la EA. El principal componente proteico de estas placas es el péptido β -amiloide (A β). La deposición de A β desencadena la disfunción y la muerte de neuronas en el cerebro. Este péptido se deriva de la proteína precursora de β -amiloide (APP). En condiciones normales, la α -secretasa escinde la APP para generar APP α soluble que impide la generación de A β .
50

Curiosamente, la inhibición de POP aumenta los niveles intracelulares de IP3, lo cual puede contribuir a la estimulación de la producción de APP α , que a su vez disminuiría la generación de A β .

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

De manera adicional, 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 prolil oligopeptidasa inhiben el metabolismo de la sustancia P ayudando a mantener niveles de sustancia P que pueden suprimir la acción neurotóxica de la proteína β -amiloide.

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

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

La señal distintiva neuropatológica de la enfermedad de Parkinson es la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas melanizadas en la pars 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 insolubles citotóxicas. El proteasoma no puede degradar estas fibrillas, y estas pueden alterar la función de este sistema proteolítico intracelular. Esto conduce a una acumulación de protofibrillas de α -sinucleína (y otras proteínas que degrada el proteasoma) en el citosol (Bennett MC, *Pharmacol. Ther.* 2005;105(3):311-31), y como consecuencia, aumentan las protofibrillas de α -sinucleína en los 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 plegada de manera incorrecta puede conducir a cambios mitocondriales que pueden fomentar el estrés oxidativo y provocar la muerte celular (Hsu LJ *et al.*, *Am. J. Pathol.* 2000;157(2):401-10). Además, se sabe que tres mutaciones puntuales (A53T, A30P o E46K) en el gen de α -sinucleína están implicadas en la patogenia 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 tasa de agregación de la α -sinucleína se potenciaba cuando se incubó la proteína con un clon de POP porcina 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 POP (S544A) no aceleró la tasa de agregación.

35 La agregación potenciada también podía prevenirse mediante la adición de inhibidores de POP, lo que sugiere que el efecto dependía de la actividad de la enzima POP. Los datos experimentales sugieren que los inhibidores de POP pueden bloquear la agregación de α -sinucleína aumentada inducida por el estrés oxidativo en células SH-SY5Y de neuroblastoma que sobreexpresan α -sinucleína humana (Myöhänen TT *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 2012; 166(3):1097-113). POP se colocaliza con la α -sinucleína en células SH-SY5Y, y esta colocalización desaparece después de la incubación con inhibidores de POP, lo que señala una interacción entre POP y la α -sinucleína. Un tratamiento de 5 días con un inhibidor de POP redujo la cantidad de α -sinucleína soluble en los cerebros de ratones transgénicos de α -sinucleína A30P. A este respecto, se ha notificado que los inhibidores de POP potencian el aclaramiento de α -sinucleína mediante la modulación de la autofagia (Myöhänen TT *et al.*, *Pharmacological Research* 2020; 151:104558).

40 Por tanto, la inhibición de la actividad POP cerebral podría prevenir la agregación de α -sinucleína y, por tanto, prevenir la formación de las protofibrillas citotóxicas presentes en los cuerpos de Lewy. Por tanto, los inhibidores de POP podrían tener posiblemente valor terapéutico en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos en los que se ha descrito la agregación α -sinucleína acelerada.

Los compuestos que pueden inhibir POP son eficaces para prevenir el deterioro cognitivo experimental inducido por escopolamina en ratas, infiriendo que los inhibidores de POP tienen funciones en el alivio de disfunciones nemónicas (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 de POP no competitivo (con un valor de CI50 relativamente alto de 63,7 μ M), en el laberinto acuático de Morris en ratas, y se notificó una potenciación en la memoria espacial (Park DH *et al.*, *Fitoterapia* 2010;81(6):644-8).

55 Se ha hallado que los pacientes con trastorno bipolar tienen altos niveles de actividad POP en suero. En los últimos años, POP ha ganado importancia como diana para el tratamiento de esta enfermedad, especialmente debido a su implicación en el metabolismo de inositol-1,4,5-trisfosfato (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 endoplásmico e induce la liberación de Ca^{2+} , que se cree que desempeña un papel crucial en el aprendizaje y la memoria. Los últimos hallazgos han demostrado

que POP modula la concentración de IP3 (Komatsu Y *J. Neurosci.* 1996;16:6342-52). Por tanto, se sabe que una alteración del gen de POP en *Dictyostelium discoideum* eucariota 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 células de glioma humanas antisentido para POP. Este efecto también se observó cuando se tratan estas células con inhibidores de POP específicos (Williams RS *et al.*, *EMBO J.* 1999;18:2734-45).

La ruta de señalización de IP3 está implicada en la acción de varios fármacos terapéuticos 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 de ánimo que se usa habitualmente 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 fuertes evidencias de que los inhibidores de POP son útiles en la prevención y/o el tratamiento de trastorno afectivo bipolar en mamíferos. Por tanto, proporcionar novedosos inhibidores de POP es interesante en la terapia de este trastorno o enfermedad.

En resumen, se han caracterizado los efectos de varios inhibidores de POP en diversas tareas cognitivas, y existe el 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 dan a conocer inhibidores de POP: 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 se han sometido a estudios *in vivo* (JTP-4819, S-17092, Z-321, ONO-1603, Y-29794, ZTTA, Z-Pro-Prolinal y KYP-2047). A partir de esta lista, los primeros cuatro inhibidores en la lista han entrado a ensayos clínicos y ninguno de ellos se ha comercializado.

El documento WO 2014/072498 A1 da a conocer inhibidores de POP con una alta afinidad por POP y una 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 usarse en la terapia de trastornos cognitivos.

En el documento WO 2014/072498 A1 se describió que la formulación de los compuestos dados a conocer en ese documento podría adaptarse para cualquier vía de administración. Sin embargo, en los únicos ejemplos *in vivo* dados a conocer en dicha solicitud, los compuestos se administraron por vía subcutánea.

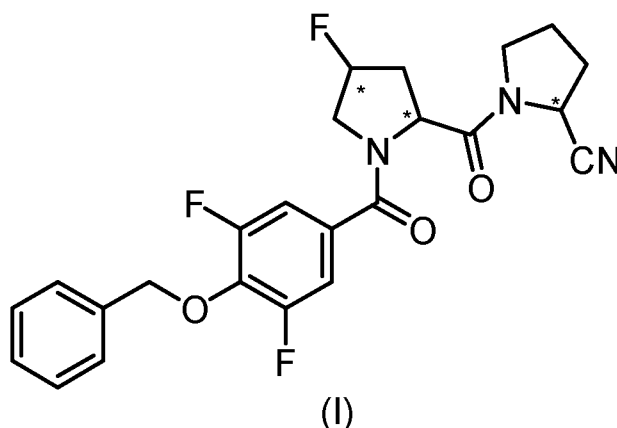
Sería ventajoso poder administrar un inhibidor de POP por vía oral ya que esto es lo más conveniente desde la perspectiva del paciente.

Por tanto, existe la necesidad de identificar nuevos inhibidores de POP, que se adapten particularmente bien para administración oral y alcancen eficazmente el cerebro, que es el sitio de acción cuando se usan dichos inhibidores de POP en la terapia de trastornos cognitivos. Habitualmente se usan antagonistas del receptor de serotonina (receptor de 5-HT_{1A}) como fármacos antidepresores. Sin embargo, inducen una disfunción sexual significativa (Uphouse L, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2014;0:31-42), lo que limita su uso para la terapia crónica en la población adulta. Por este motivo, un inhibidor de POP con efectos positivos sobre la capacidad intelectual en trastornos del estado de ánimo y sin tal acontecimiento adverso tendrá un impacto significativo en la calidad de vida del paciente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores han hallado ahora satisfactoriamente que 1-[1-(4-benciloxi-3,5-difluoro-benzoil)-4-fluoro-pirrolidin-2-carbonil]-pirrolidin-2-carbonitrilo, sus estereoisómeros y sales del mismo no sólo pueden inhibir POP con una alta potencia, sino que también muestran una alta capacidad de penetración gastrointestinal, logran una alta exposición en el cerebro que les permite que sean especialmente eficaces cuando se administran por vía oral y tienen una unión deficiente al receptor de 5-HT_{1A} que previene efectos secundarios negativos tales como la disfunción sexual.

Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a 1-[1-(4-benciloxi-3,5-difluoro-benzoil)-4-fluoro-pirrolidin-2-carbonil]-pirrolidin-2-carbonitrilo que tiene la fórmula (I):



(en la que el asterisco en la fórmula indica la presencia de centros quirales), a estereoisómeros del mismo y a sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Otro aspecto de esta invención se refiere a procedimientos para la preparación de un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, estereoisómeros del mismo y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Otro aspecto de esta invención se refiere a un medicamento o a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, estereoisómeros del mismo y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de esta invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, estereoisómeros del mismo y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para usarse como medicamento, particularmente para la prevención y/o el tratamiento de trastornos cognitivos y/o trastornos neurodegenerativos tales como sinucleinopatías (enfermedades debidas a la acumulación de sinucleína tales como enfermedad de Parkinson, trastorno de conducta durante el sueño REM, enfermedad de cuerpos de Lewy o atrofia multisistémica). En particular, los trastornos cognitivos pueden estar asociados con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esquizofrenia, trastorno depresivo mayor, trastorno afectivo bipolar, trastorno de conducta durante el sueño REM, enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal o esclerosis lateral amiotrófica.

Otro aspecto de la divulgación (no reivindicado) se refiere a un método para el tratamiento o la profilaxis de trastornos cognitivos en un mamífero, en el que se administra una cantidad terapéutica de un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, estereoisómeros del mismo y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, a un paciente que necesita dicho tratamiento. En una realización particular, el trastorno es un trastorno cognitivo asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esquizofrenia, trastorno depresivo mayor, trastorno afectivo bipolar, trastorno de conducta durante el sueño REM, enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal o esclerosis lateral amiotrófica.

Otro aspecto de esta invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, estereoisómeros del mismo y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para la preparación de un medicamento, particularmente para la prevención y/o el tratamiento de trastornos cognitivos y más particularmente un trastorno cognitivo asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esquizofrenia, trastorno depresivo mayor, trastorno afectivo bipolar, trastorno de conducta durante el sueño REM, enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal o esclerosis lateral amiotrófica. Estos aspectos y realizaciones preferidas de los mismos también se definen adicionalmente en las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra los resultados del ensayo de inhibición de POP para los compuestos del ejemplo 1, del ejemplo comparativo 3 y del ejemplo comparativo 4.

La figura 2 muestra los resultados del ensayo PAMPA para los compuestos del ejemplo 1, del ejemplo comparativo 3 y del ejemplo comparativo 4.

La figura 3 muestra los resultados del ensayo de Caco-2 para los compuestos del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 3.

La figura 4 muestra los resultados del ensayo de exposición en el cerebro *in vivo* para los compuestos del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 3.

Las figuras 5a y 5b muestran los resultados del ensayo de tareas de NOR para los compuestos del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 3.

La figura 6 muestra los resultados de la unión al receptor de 5-HT1A para los compuestos del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 3.

- 5 La figura 7 muestra el espectro de IR de (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo.

La figura 8 muestra el espectro de ^1H -RMN de (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo.

- 10 La figura 9 muestra el espectro de IR de (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo.

La figura 10 muestra el espectro de ^1H -RMN de (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

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

- 15 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 también incluye sales de amonio cuaternario y complejos de la molécula activa con otras moléculas e iones, particularmente, complejos formados a través de interacciones iónicas. La definición incluye, en particular, sales fisiológicamente aceptables; este término debe entenderse como equivalente a "sales farmacológicamente
20 aceptables" o "sales farmacéuticamente aceptables".

- 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, particularmente, como resultado del contraión) cuando se usa de manera apropiada para un tratamiento, aplicada o usada, particularmente, en seres humanos y/o mamíferos. Estas sales fisiológicamente aceptables pueden formarse con cationes o bases y, en el contexto de esta invención, se
25 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 usan en seres humanos y/o mamíferos. Estas sales fisiológicamente aceptables también pueden formarse con aniones o ácidos y, en el contexto de esta invención, se entiende que son sales formadas por al menos un compuesto usado según la invención, normalmente protonado, por ejemplo en el nitrógeno, tal como un catión, y al menos un anión fisiológicamente tolerado, particularmente cuando se
30 usan 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 usan 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
35 mandélico, ácido fumárico, ácido láctico o ácido cítrico.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) anteriormente descrita pueden incluir enantiómeros que surgen de la presencia de tres centros quirales en la molécula. Los enantiómeros individuales y cualquier mezcla de dos o más de los mismos se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

- A menos que se indique lo contrario, también se pretende que los compuestos de la invención incluyan formas isotópicamente marcadas, es decir compuestos que difieren únicamente en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por el
40 reemplazo de al menos un átomo de hidrógeno por un deuterio o tritio, o el reemplazo de al menos un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C , o el reemplazo de al menos un nitrógeno por un nitrógeno enriquecido en ^{15}N , se encuentran dentro del alcance de esta invención.

- 45 Los compuestos de fórmula (I), o sus sales, están preferiblemente en forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura. Por forma farmacéuticamente aceptable se entiende, entre otras cosas, que tiene un nivel farmacéuticamente aceptable de pureza excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo ningún material considerado como tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activos son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, lo
50 más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, es superior al 95% del compuesto de fórmula (I) o de sus sales.

- Tal como se indicó previamente, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sal 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 las sales farmacéuticamente no aceptables también se
55 encuentran dentro del alcance de la invención puesto que estas pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables, solvatos y profármacos. La preparación de sales puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “tratar”, “que trata” y “tratamiento” incluyen la erradicación, la eliminación, la reversión, el alivio, la modificación o el control de una enfermedad o afección, tal como un trastorno cognitivo.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “prevención”, “que previene”, “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 afección, tal como un trastorno cognitivo, antes de su aparición.

Por tanto, en su conjunto, por “que trata” o “tratamiento” y/o “que previene” o “prevención” se entiende al menos una supresión o una mejora de los síntomas asociados con la afección que padece el sujeto, donde supresión y mejora se usan en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, por ejemplo, un síntoma asociado con la afección que está tratándose, tal como un trastorno cognitivo. Como tal, el método de la presente invención también incluye situaciones en las que la afección se inhibe por completo, por ejemplo, se previene que ocurra, o se detiene, por ejemplo, se termina, de tal manera que el sujeto deja de experimentar la afección. Como tal, el presente método incluye tanto la prevención como la gestión de un trastorno cognitivo.

Los términos “trastorno cognitivo” y “deterioro cognitivo leve” se usan en el presente documento de manera intercambiable para designar cualquier afección caracterizada por una deficiencia en las actividades mentales asociadas con la actividad mental, 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 con frecuencia está) asociado con (es decir, estar provocado por o producirse en presencia de) otras afecciones caracterizadas por daño a, o pérdida de, neuronas u otras estructuras implicadas en la transmisión de señales entre neuronas. Por 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 normotensiva, síndrome orgánico cerebral crónico, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, demencia vascular, enfermedad de cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, parálisis supranuclear progresiva.

Los trastornos cognitivos también pueden estar asociados con otras afecciones 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 del aprendizaje y otros trastornos cognitivos.

Los ejemplos de demencias que pueden tratarse con los métodos de la invención incluyen complejo de demencia asociado al SIDA, enfermedad de Binswanger, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, demencia multiinfarto, enfermedad de Pick, demencia semántica y demencia vascular.

Los ejemplos de trastornos del aprendizaje que pueden tratarse con los métodos de la invención incluyen síndrome de Asperger, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, autismo, trastorno desintegrativo de la infancia, síndrome de Down y síndrome de Rett.

Los ejemplos de afasias que pueden tratarse con los métodos de la invención incluyen afasia no fluente progresiva.

Los compuestos descritos en el presente documento también pueden usarse para tratar a un paciente que tiene deficiencias en actividades mentales que son leves o que por lo demás no interfieren significativamente con la vida cotidiana. El deterioro cognitivo leve es un ejemplo de una afección de este tipo: un paciente con deterioro cognitivo leve muestra 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 deterioro cognitivo leve y otras formas similarmente menos graves de trastornos cognitivos.

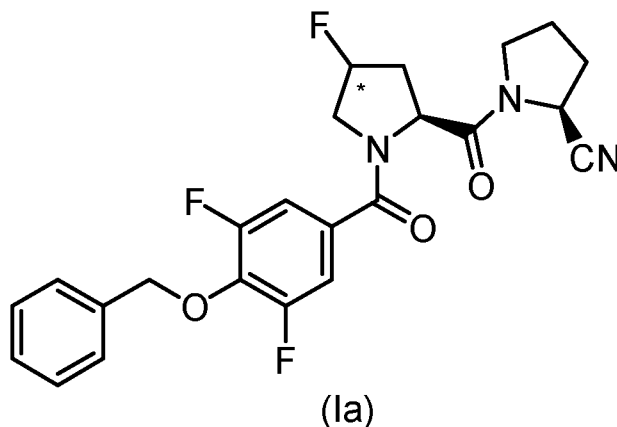
Por tanto, otro aspecto de la presente invención es un compuesto de la invención para su uso en un método para el tratamiento o la profilaxis de trastornos cognitivos en un mamífero, en el que se administra una cantidad terapéutica de un compuesto de la invención a un paciente que necesita dicho tratamiento.

En una realización particular, el método de tratamiento o profilaxis se lleva a cabo mediante la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento de una cantidad terapéutica de un compuesto de la invención por vía oral.

En una realización particular, los compuestos de la invención se administran por vía oral a una dosis diaria comprendida entre 0,01 y 1,90 mg/kg, por ejemplo 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,0, 1,05, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, 1,60, 1,65, 1,70, 1,75, 1,80, 1,85 o 1,90 mg/kg. Los compuestos de la invención pueden administrarse en cualquiera de las dosis orales diarias indicadas anteriormente mencionadas una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día o seis veces al día.

En una realización particular de la presente invención, los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar a 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, los compuestos tienen la siguiente fórmula (Ia):



5

Los compuestos individuales particulares de la invención que se encuentran bajo la fórmula (I) incluyen los compuestos enumerados a continuación:

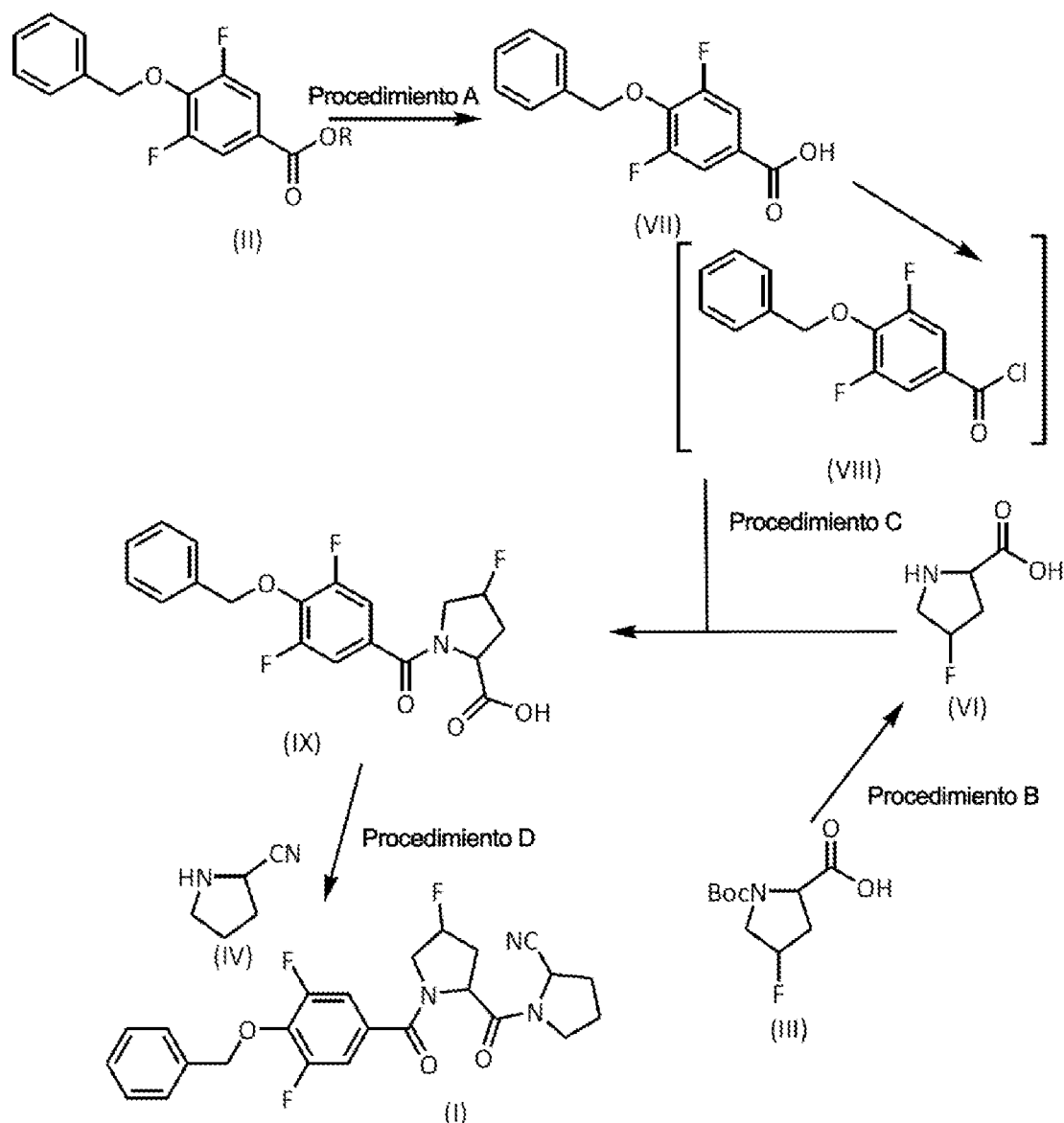
10

- (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benziloxy)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (R)-1-((2S,4R)-1-(4-(benziloxy)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2R,4R)-1-(4-(benziloxy)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (R)-1-((2R,4R)-1-(4-(benziloxy)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benziloxy)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (R)-1-((2S,4S)-1-(4-(benziloxy)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2R,4S)-1-(4-(benziloxy)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (R)-1-((2R,4S)-1-(4-(benziloxy)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo

15

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

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



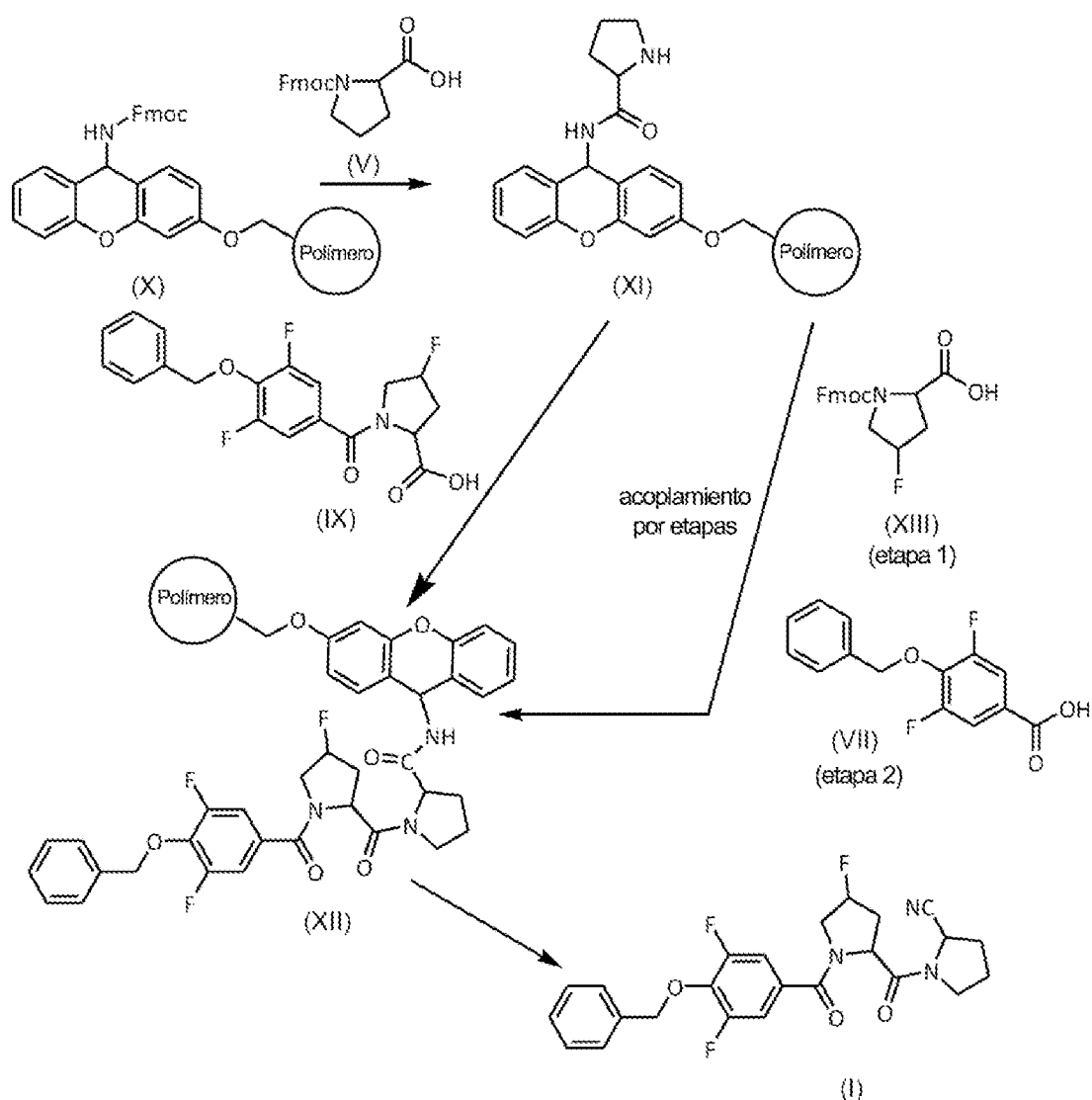
En una primera etapa, el éster de fórmula (II) se disuelve o suspende en un disolvente orgánico polar (preferiblemente un disolvente orgánico polar prótico) tal como etanol (EtOH) o metanol, o una mezcla de disolventes orgánicos polares. Se añade una disolución básica acuosa y se realiza la reacción hidrolítica manteniendo la mezcla, normalmente a reflujo, a una temperatura comprendida entre temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla de disolventes hasta completar la hidrólisis, normalmente durante un periodo de 0,5 a 4 horas, preferiblemente 1-2 horas. La disolución básica es preferiblemente de naturaleza inorgánica, tal como un álcali diluido, por ejemplo NaOH. Luego se permite que la mezcla de reacción alcance temperatura ambiente y, preferiblemente, se concentra hasta aproximadamente un quinto del volumen de reacción. Luego se añade lentamente la mezcla de reacción a una disolución ácida 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 logra en condiciones ácidas suaves, tales como la adición sobre una disolución de cloruro de hidrógeno en un disolvente orgánico tal como dioxano, o con una mezcla de TFA/DCM, a una baja temperatura que oscila entre 0°C y temperatura ambiente. Se agita la reacción a temperatura ambiente durante 1-3 horas. Luego se evapora el disolvente hasta sequedad, para dar la sal de clorhidrato o la sal de trifluoroacetato de la amina de fórmula (VI), dependiendo del ácido usado.

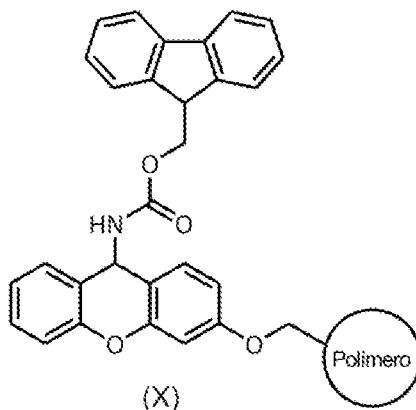
Se prepara el compuesto de fórmula (IX) a partir del ácido carboxílico de fórmula (VII) y la amina de fórmula (VI) en condiciones de Schotten-Baumann. Por tanto, se añade un agente de cloración tal como cloruro de oxalilo a una disolución del ácido carboxílico de fórmula (VII) en un disolvente orgánico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

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

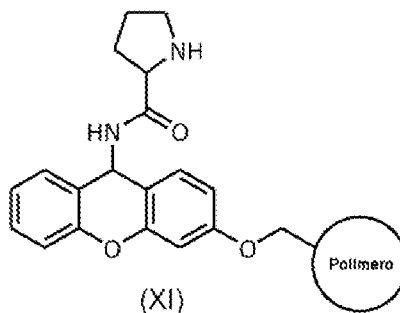
Alternativamente, los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse tal como se ilustra en el siguiente esquema y se describe a continuación:



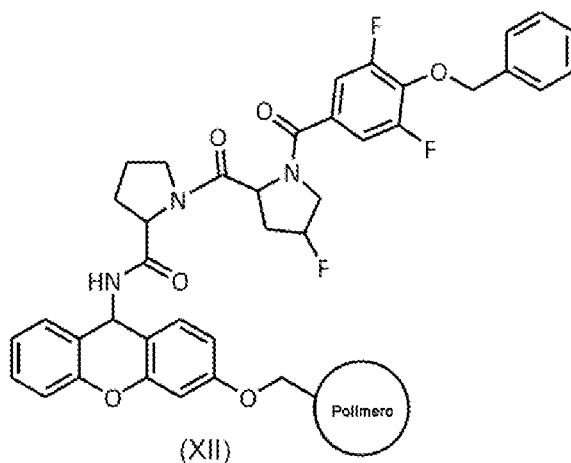
- 5 Se coloca una resina funcionalizada con amina, tal como la resina de amida de Sieber, de fórmula (X), en una jeringa equipada con un disco poroso de polietileno. Se hincha la resina mediante lavados con disolventes orgánicos apropiados tales como diclorometano (DCM) y dimetilformamida (DMF). Cuando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



- 10 Tras la retirada del grupo protector de la resina, se une la prolina protegida con Fmoc de fórmula (V) 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. Se agita la mezcla durante de 1 a 2 horas. Después de la filtración y del lavado, puede monitorizarse la extensión del acoplamiento usando la prueba de Kaiser, realizándose un nuevo acoplamiento cuando se requiera. Se retira el Fmoc para producir el producto de fórmula (XI) mediante un tratamiento con una disolución básica de amina tal como una disolución de piperidina en DMF y/o una mezcla de piperidina/DBU/tolueno/DMF. La retirada de Fmoc puede evaluarse usando la prueba NF31 de éster *p*-nitrofenílico.



- 15 Se acopla el producto de fórmula (XI) al producto de fórmula (IX) para producir 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 una base de amina tal como DIEA en un disolvente orgánico apropiado tal como DMF. Se agita la mezcla manualmente durante el tiempo de reacción total de 1 a 2 horas. Se realiza un nuevo acoplamiento sistemático usando las mismas cantidades y el mismo tiempo. Puede monitorizarse el grado del acoplamiento usando la prueba NF31 de éster *p*-nitrofenílico.
- 20



Alternativamente, el producto de fórmula (XII) también puede obtenerse mediante el acoplamiento por etapas del producto (XI) primero al compuesto de fórmula (XIII), seguido de la retirada del grupo protector Fmoc y luego el acoplamiento con el compuesto de fórmula (VII).

- 5 Se transfiere el producto de fórmula (XII), lavado a fondo con un disolvente orgánico apropiado tal como DCM y secado, a un matraz, al que se le añaden anhídrido trifluoroacético y piridina en una pequeña cantidad de un disolvente orgánico. Se mantiene la mezcla a una temperatura de 20 a 40°C durante de 8 a 16 horas. Luego, se filtra la mezcla de reacción y se lava la resina con el mismo disolvente orgánico. Se recogen los filtrados y se evapora el disolvente hasta sequedad. Se disuelve el producto en bruto resultante en un disolvente apropiado tal como acetato de etilo y se
10 lava con una disolución de NaHCO₃ saturado y una disolución ac. de KHSO₄ al 5%. Se seca la fase orgánica, se filtra y se evapora. Se lleva el producto en bruto a H₂O:CH₃CN y se liofiliza para producir el nitrilo peptídico de fórmula (I).

- Alternativamente, la peptidil-resina de fórmula (XII) puede tratarse con una mezcla de TFA/H₂O/TIS durante 1-2 horas. Luego, se filtra la resina y se lava con TFA, se recogen los filtrados y se evapora el disolvente hasta sequedad. Se resuspende el producto en bruto en una mezcla de H₂O:CH₃CN y se liofiliza. Se lleva la amida peptídica en bruto
15 resultante 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. Se mantiene la mezcla a temperatura ambiente durante de 8 a 16 horas, se evapora el disolvente y se lleva el residuo a acetato de etilo. Posteriormente se lava la disolución orgánica con disolución ac. de KHSO₄ y disolución ac. de NaHCO₃. El secado y la evaporación de la fase orgánica producen el
20 nitrilo peptídico de fórmula (I).

El producto en bruto se purifica mediante RP-HPLC.

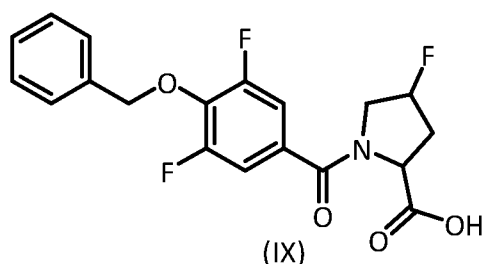
- Cuando los procedimientos anteriormente descritos para la preparación de compuestos de la invención dan lugar a mezclas de estereoisómeros, estos isómeros pueden separarse mediante técnicas convencionales tales como cromatografía preparativa. Si hay centros quirales, pueden prepararse los compuestos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

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

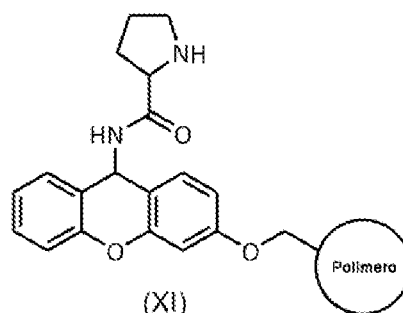
- Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para la preparación de un compuesto de
30 fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo.

En una realización, el procedimiento comprende las etapas de:

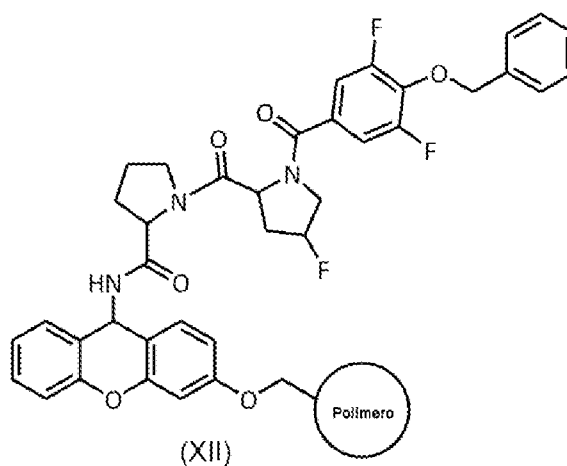
- a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IX):



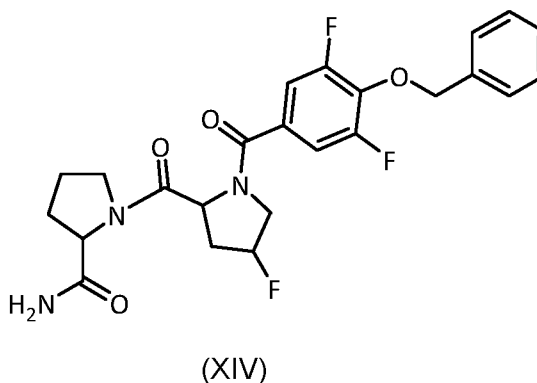
con un compuesto de fórmula (XI):



en el que el polímero representa un polímero que es inerte en las condiciones de reacción del método de síntesis dado a conocer en el presente documento e insoluble pero hinchable en los disolventes empleados en el presente documento, tal como 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):



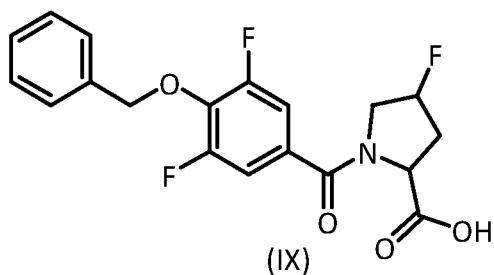
y

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

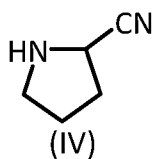
en el que las etapas b) y c) pueden realizarse por separado o en una reacción en un solo recipiente.

En otra realización de la presente invención, el procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo, comprende las etapas de:

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

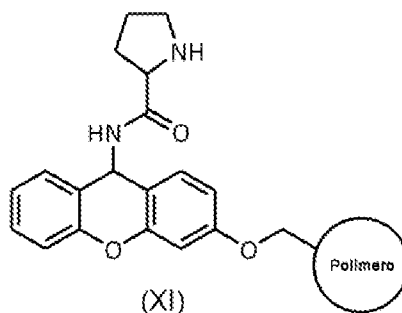


con un compuesto de fórmula (IV):

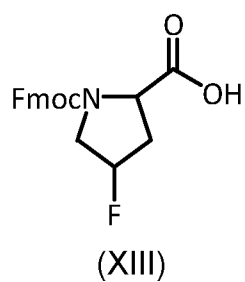


5 En todavía otra realización, el procedimiento comprende las etapas de:

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

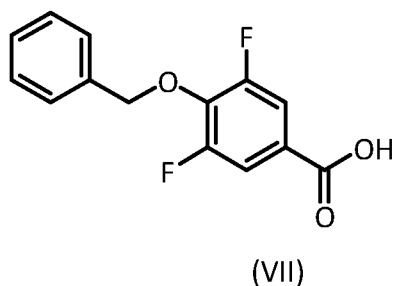


10 en el que el polímero representa un polímero que es inerte en las condiciones de reacción del método de síntesis dado a conocer en el presente documento e insoluble pero hinchable en los disolventes empleados en el presente documento, tal como poliestireno de baja reticulación y polímeros de poliestireno injertados con polietilenglicol, con un compuesto de fórmula (XIII):

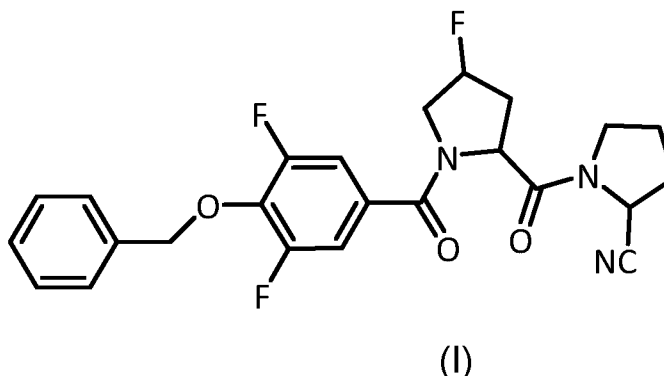


b) retirar el grupo protector Fmoc

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



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



Se ha hallado que los compuestos de fórmula general (I) son útiles en el tratamiento de trastornos cognitivos, en particular trastornos cognitivos asociados con otras enfermedades o afecciones 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 o un estereoisómero del mismo, junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para su administración a un paciente.

Los materiales auxiliares o aditivos de una composición farmacéutica según la presente invención pueden seleccionarse de entre portadores, excipientes, materiales de soporte, lubricantes, cargas, disolventes, diluyentes, colorantes, acondicionadores del aroma tales como azúcares, antioxidantes, agentes aglutinantes, adhesivos, disgregantes, antiadherentes, 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 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 la 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 adultos, y puede producirse mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por tanto, la formulación según la invención puede adaptarse para aplicación tópica o sistémica, particularmente para las vías dérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraarticular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intravesical, intraósea, intracavernosa, intranasal, pulmonar, bucal, sublingual, ocular, intravítrea, percutánea, rectal, vaginal, oral, epidural, intratecal, intraventricular, intracerebral, intracerebroventricular, intracisternal, intraespinal, periespinal, intracraneal, administración a través de agujas o catéteres con o sin dispositivos de bombeo, u otras vías de aplicación.

En una realización preferida de la presente invención, las composiciones farmacéuticas están en forma oral, ya sea sólida o líquida. Formas de dosis adecuadas para administración oral pueden ser comprimidos, pastillas, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina, chicles, 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, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para la preparación 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 laurilsulfato de sodio.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas están en forma de productos para administración intranasal no parenteral, preferiblemente en forma de productos para administración intranasal. Normalmente, la administración intranasal se lleva a cabo mediante el uso de pulverizadores nasales, frascos exprimibles y goteros de líquido como dispositivos de administración. Para su uso 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 mezclado, relleno o preparación de comprimidos. Pueden usarse operaciones repetidas de mezclado para distribuir el agente activo en la totalidad de esas composiciones empleando grandes cantidades de cargas. Tales operaciones son convencionales en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse comprimidos mediante granulación en húmedo o en seco y opcionalmente recubrirse según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal, en particular con un recubrimiento entérico.

Las composiciones farmacéuticas también pueden adaptarse para administración parenteral, tales como disoluciones, suspensiones o preparaciones secas reconstituibles estériles, aerosoles o pulverizaciones en la forma de dosificación

unitaria apropiada. Pueden usarse excipientes adecuados, tales como agentes espesantes, agentes tamponantes o tensioactivos.

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

- 5 Las aplicaciones cutáneas incluyen pomadas, geles, cremas, lociones, suspensiones o emulsiones.

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

Las formulaciones mencionadas se prepararán usando métodos convencionales tales como los descritos o a los que se hace referencia en la Farmacopeas de España y de EE.UU. y en textos de referencia similares.

- 10 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 variará con la forma de administración y el compuesto particular elegido, y además, variará con el paciente en tratamiento, la edad del paciente, el tipo de enfermedad o afección que esté tratándose. Cuando la composición se administra por vía oral, pueden requerirse mayores cantidades del agente activo para producir el mismo efecto que una cantidad más pequeña administrada por vía parenteral. Los compuestos son útiles de la misma manera que
- 15 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 o 4 veces al día, con dosis diarias totales típicas en el intervalo de desde 0,011 hasta 1,90 mg/kg/día.

- 20 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 proporcionarse como una composición independiente para su administración al mismo tiempo o en un momento diferente.

- Particularmente, la combinación de al menos un compuesto de fórmula (I) y al menos otro fármaco puede formularse para su administración simultánea, por separado o secuencial, con al menos un portador, aditivo, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Esto implica que la combinación del compuesto de fórmula (I) y el otro fármaco puede
- 25 administrarse:

a) Como una combinación que forma parte de la misma formulación de medicamento, administrándose siempre ambos simultáneamente.

- 30 b) Como una combinación de dos unidades, dando lugar con cada una de ellas a la posibilidad de administración simultánea, secuencial o por separado. En una realización particular, el compuesto de fórmula (I) se administra independientemente del otro fármaco (es decir, en dos unidades) pero al mismo tiempo. En otra realización particular, el compuesto de fórmula (I) se administra en primer lugar, y luego se administra el otro fármaco por separado o secuencialmente. En aún otra realización particular, el otro fármaco se administra en primer lugar, y luego se administra el compuesto de fórmula (I) por separado o secuencialmente, según se defina.

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

	AcOEt	acetato de etilo
	EA	enfermedad de Alzheimer
40	AUC	área bajo la curva
	BHE	barrera hematoencefálica
	Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
	BSA	albúmina sérica bovina
	DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
45	DCM	diclorometano
	DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
	ID	índice de discriminación
	DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
	DMF	dimetilformamida
50	DMSO	dimetilsulfóxido

	EtOH	etanol
	Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
	FPLC	cromatografía de líquidos de proteína rápida
	FTIR	espectrómetro de infrarrojos con transformada de Fourier
5	HBSS	solución salina equilibrada de Hanks
	HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
	hPOP	prolil oligopeptidasa humana
	i.p.	intraperitoneal
	IP3	Inositol-trifosfato
10	IPTG	isopropilo β -D-1-tiogalactopiranosido
	LB	caldo de lisogenia
	MALDI-TOF	desorción/ionización por láser asistida por matriz – tiempo de vuelo
	MK-801	dizocilpina
	EM	esclerosis múltiple
15	RMN	resonancia magnética nuclear
	NOR	reconocimiento de objeto novedoso
	DO	densidad óptica
	PAMPA	ensayo de permeabilidad de membrana artificial en paralelo
	PBS	solución salina tamponada con fosfato
20	PC	fosfatidilcolina
	PE	fosfatidiletanolamina
	pETM10	plásmido pETM10
	PI	fosfatidilinositol
	POP	prolil oligopeptidasa
25	PS	fosfatidilserina
	PyBOP	hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio
	RP-HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa
	DE	desviación estándar
	SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
30	TBTU	tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
	TEER	resistencia eléctrica transendotelial
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
	TIS	triisopropilsilano
35	Tris	tris(hidroximetil)aminometano
	T β 4	proteína timosina beta-4
	UPLC	cromatografía de líquido de ultraalta resolución
	Z-G-P-AMC	(<i>N</i> -benciloxycarbonil-Gly-Pro-metilcumarinil-7-amida)
40	Los siguientes ejemplos son simplemente ilustrativos de determinadas realizaciones de la invención y no pueden considerarse como que la restringen en modo alguno.	

EJEMPLOS

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)

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

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

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

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).

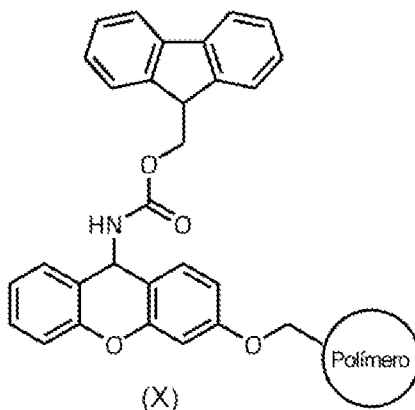
- 20 Se añade cloruro de oxalilo (1,5 mmol) a una disolución del ácido carboxílico de fórmula (VII) (1 mmol) en tolueno (5 ml). Se agita la reacción a 50°C durante 1,5 horas para permitir la formación del cloruro de ácido carboxílico de fórmula (VIII). Después de la evaporación del disolvente, se solubiliza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

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

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

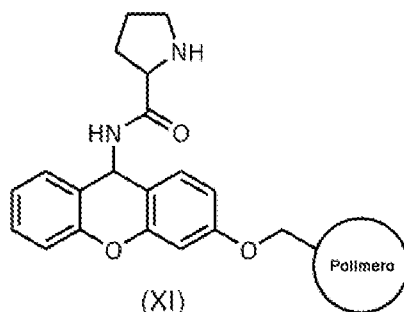
Procedimiento E: Procedimiento general para la síntesis en fase sólida.

- 35 Hinchamiento/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. Se hincha la resina mediante lavados con DCM y DMF. Se logra la retirada del grupo protector fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) mediante tratamientos con una disolución de piperidina al 20% en DMF.

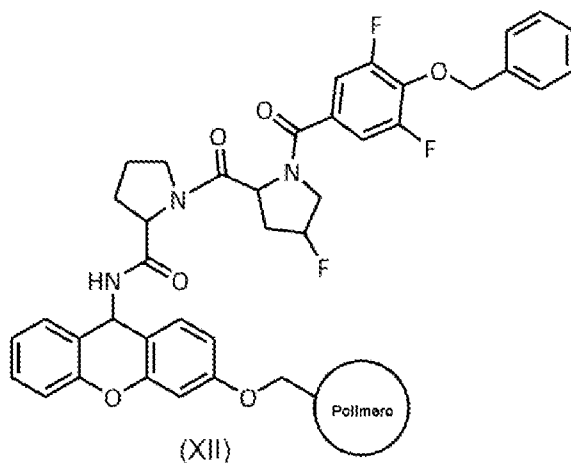


- 40 Luego, se une la prolina protegida con Fmoc de fórmula (V) (4 eq) a la resina usando TBTU (4 eq) y DIEA (8 eq) en DMF. Se agita intermitentemente la mezcla de manera manual durante 90 min. Después de la filtración y del lavado, se monitoriza el grado del acoplamiento usando la prueba de Kaiser, realizándose un nuevo acoplamiento cuando se requiera. Se retira el Fmoc para producir 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). Se evalúa la retirada de Fmoc usando la prueba NF31 de éster *p*-nitrofenílico (descrita en Madder, A. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* 1999;(11):2787-91).



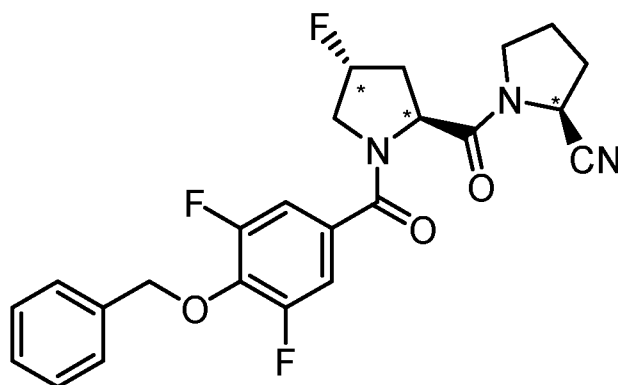
- 5 Se acopla el producto de fórmula (IX) (2 eq) al producto de fórmula (XI) para producir el producto de fórmula (XII) usando PyBOP (2 eq), HOAt (6 eq) y DIEA (6 eq) en DMF. Se agita intermitentemente la mezcla de manera manual durante el tiempo de reacción total, 90 min. Se realiza un nuevo acoplamiento sistemático usando las mismas cantidades y el mismo tiempo. Se monitoriza el grado del acoplamiento usando la prueba NF31 de éster *p*-nitrofenílico.
- 10 Alternativamente, se acopla el producto de fórmula (XIII) (4 eq) al producto de fórmula (XI) usando PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) y DIEA (12 eq) en DMF. Se agita intermitentemente la mezcla de manera manual durante el tiempo de reacción total, 90 min. Se monitoriza el grado del acoplamiento usando la prueba NF31 de éster *p*-nitrofenílico, y se realiza un nuevo acoplamiento si es necesario. Se retira el grupo Fmoc 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, se incorpora el producto de fórmula (VII) (4 eq) usando PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) y DIEA (12 eq)
- 15 en DMF para obtener el producto de fórmula (XII). Se agita intermitentemente la mezcla de manera manual durante el tiempo de reacción total, 90 min. Se monitoriza el grado del acoplamiento usando la prueba NF31 de éster *p*-nitrofenílico, y se realiza un nuevo acoplamiento si es necesario.



- 20 Se transfiere el producto de fórmula (XII), lavado a fondo con DCM y secado, a un matraz de fondo redondo, y se añaden anhídrido trifluoroacético (5 eq) y piridina (10 eq) en DCM (aproximadamente 2 ml/100 mg). Se mantiene la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Luego, se filtra la mezcla de reacción y se lava la resina con DCM. Se recogen los filtrados y se evapora el disolvente hasta sequedad. Se disuelve el producto en bruto resultante en AcOEt y se lava con disolución saturada de NaHCO₃ y una disolución ac. de KHSO₄ al 5%. Se seca la fase orgánica, se filtra y se evapora. Se lleva el producto en bruto a H₂O:CH₃CN (1:1) y se liofiliza para producir el nitrilo peptídico de fórmula (I).
- 25

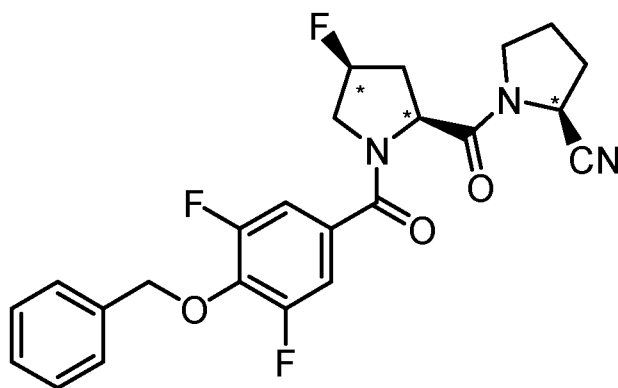
- Alternativamente, puede tratarse la peptidil-resina de fórmula (XII) con una mezcla de TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5, aproximadamente 2-5 ml/100 mg) durante 1-2 horas. Luego, se filtra la resina y se lava con TFA, se recogen los filtrados y se evapora el disolvente hasta sequedad. Se resuspende el producto en bruto en una mezcla de H₂O:CH₃CN (1:1) y se liofiliza. Se lleva la amida peptídica en bruto resultante a DCM y se añaden anhídrido trifluoroacético (5 eq)
- 30 y piridina (10 eq). Se mantiene la mezcla a temperatura ambiente durante la noche, se evapora el disolvente y se lleva el residuo a AcOEt. Posteriormente se lava la disolución orgánica con disolución ac. de KHSO₄ al 5% y disolución ac. de NaHCO₃ al 10%. El secado y la evaporación de la fase orgánica producen el nitrilo peptídico de fórmula (I).

Se purifica el producto en bruto mediante RP-HPLC.

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

Se acoplan secuencialmente L-prolina protegida con Fmoc disponible comercialmente (Fmoc-L-Pro-OH) de fórmula (V) (249,7 mg, 0,7 mmol), ácido (2S,4R)-4-fluoro-1-Fmoc-pirrolidin-2-carboxílico (533 mg, 1,5 mmol) de fórmula (III) y ácido 4-benciloxi-3,5-difluoro-benzoico (271 mg, 1 mmol) de fórmula (VII) sobre resina de amida de Sieber disponible comercialmente (333,3 mg, 0,2 mmol, 1 eq), a través de acoplamiento por etapas tal como se describe en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 156 mg (0,341 mmol) del producto final.

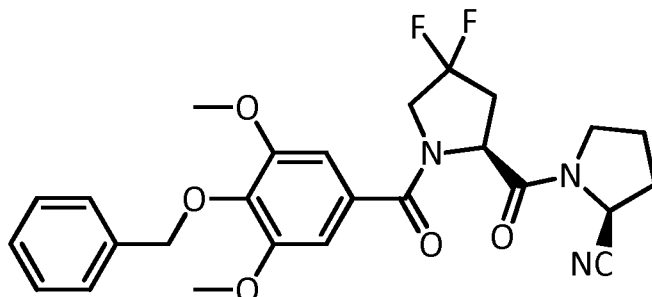
pf 137,6-139,1°C. FTIR: 1642, 1582, 1517, 1414, 1381, 1317, 1230, 1203, 1172, 1064, 1036 cm⁻¹. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm): 7,42 (2H, m), 7,35 (3H, m), 7,12 (2H, m), 5,30 (1H, m), 5,23 (1H, m), 4,93 (1H, dd), 4,82 (1H, m), 3,87 (2H, m), 4,08/3,69 (2H, m), 2,58/2,36 (2H, m), 2,26 (2H, m), 2,24 (2H, m).

Ejemplo 2**(S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**

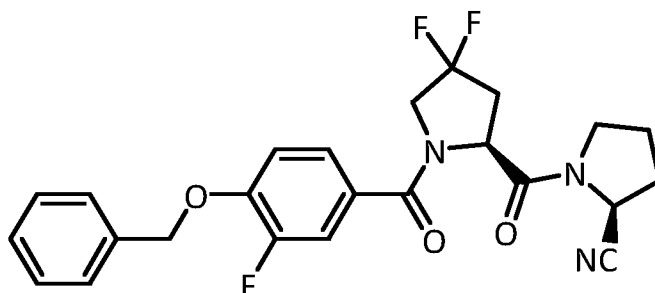
Se preparó este compuesto siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1 pero reemplazando ácido (2S,4R)-4-fluoro-1-Fmoc-pirrolodin-2-carboxílico por ácido (2S,4S)-4-fluoro-1-Fmoc-pirrolodin-2-carboxílico. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 138 mg (0,302 mmol) del producto final.

pf 135-137°C. FTIR: 3483, 2954, 1653, 1581, 1518, 1437, 1417, 1383, 1356, 1321, 1234, 1203, 1172, 1065, 1039, 1005, 960, 901, 856, 762, 737, 696 cm⁻¹.

Ejemplo comparativo 3:

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

Partiendo 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 ácido ((S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-dimetoxibenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carboxílico) (161 mg, 0,38 mmol), se prepara el producto siguiendo el procedimiento E descrito anteriormente. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 18 mg (0,036 mmol) del producto final.

Ejemplo comparativo 4:**(S)-1-((S)-1-(4-(benciloxi)-3-fluorobenzoil)-4,4-difluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo**

Se acoplan secuencialmente 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-benciloxi-3-fluorobenzoico (109 mg, 0,45 mmol) sobre resina de amida de Sieber disponible comercialmente (200 mg, 0,15 mmol, 1 eq), a través de acoplamiento por etapas tal como se describe en el procedimiento E anterior. La purificación mediante RP-HPLC proporciona 14 mg (0,030 mmol) del producto final.

DATOS FARMACOLÓGICOS**DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBIDOR DE NOVEDOSOS COMPUESTOS SOBRE LA ACTIVIDAD 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 de cola de His según un procedimiento de la bibliografía (Tarragó T *et al.*, *ChemBioChem* 2006;7:827-33) resumido a continuación:

Expresión de hPOP: se transformaron células competentes BL21 de *E. coli* con pETM10-hPOP. Para inducir la expresión, se inoculó con una colonia un cultivo previo de medio LB (50 ml) que contenía kanamicina (50 µg/ml) y se hizo crecer durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se inocularon dos cultivos de medio LB (500 ml) con el cultivo durante la noche (10 ml). Se hicieron crecer los cultivos inoculados a 37°C y 220 rpm hasta que la DO₅₉₅ fue de 1,2 (2,5-3 horas). Luego se añadió IPTG (concentración final de 1 mM) y se realizó la inducción durante la noche a 25°C. Se recogieron las células (3500 g, 15 min, 4°C) y se suspendió el sedimento 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 (que consistían, cada uno, en 15 s de sonicación y 15 s de reposo) a una intensidad del 50% y 0,5 pulsos, manteniéndose la muestra sobre hielo. Después de la sonicación, se centrifugó la muestra (40.000 g, 30 min, 4°C) y se usó el sobrenadante inmediatamente para la purificación de POP. Se usó un sistema de FPLC ÄKTA explorer para la purificación. Se aplicó el sobrenadante a una velocidad de flujo de 1 ml/min a una columna HiTrapQuelating (5 ml) previamente equilibrada con 5 volúmenes de columna de tampón de suspensión. Se lavó la columna con tampón de suspensión hasta que la absorbancia a 280 nm volvió al nivel inicial. Luego se enjuagó la columna con 5 volúmenes de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM). Se realizó la elución con 4 volúmenes de tampón de elución (Tris-HCl 50 mM, pH 8,

NaCl 300 mM, imidazol 500 mM). Se recogieron fracciones (4 ml) durante toda la elución. Se comprobó la actividad POP en todas las fracciones y se analizaron las positivas mediante SDS-PAGE y se tiñeron con Biosafe Comassie Stain G-250. Se recogieron las fracciones positivas y se desalaron mediante el uso de una columna de desalación HiPrep 26/10 con Tris-HCl (50 mM, pH 8) como tampón. Se cuantificó la hPOP recombinante con el ensayo de proteínas de Bio-Rad con BSA como patrón. Se prepararon alícuotas de la enzima recombinante y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C .

Ensayos de inhibición de POP

Se determinó la actividad POP 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*-benciloxycarbonyl-Gly-Pro-metilcumarinil-7-amida) como sustrato de POP.

Se realizaron las reacciones en placas de microtitulación de 96 pocillos, que permitieron la monitorización simultánea de múltiples reacciones. Para cada reacción, se incubó previamente tampón de actividad (134 μl , tampón fosfato de Na/K 100 mM, pH 8,0) 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 nuevo compuesto correspondiente (3 μl). Se preparó una disolución madre de nuevo compuesto en DMSO (100 mM), y se prepararon diluciones a partir de esta disolución madre con DMSO.

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

Se midieron varios puntos de concentración (que oscilaban desde 25 pM hasta 400 μM) para cada compuesto. Se calculó la actividad inhibidora sobre prolil oligopeptidasa según la ecuación 1. Para cada nuevo compuesto, se midió la fluorescencia en presencia (a) y en ausencia (b) de hPOP. Se obtuvo la fluorescencia máxima (0% de actividad inhibidora) a partir de una muestra de hPOP en ausencia de compuestos inhibidores. Para estimar la potencia inhibidora del novedoso compuesto, se representaron gráficamente las actividades frente al logaritmo de la concentración del compuesto, ajustando a una curva sigmoidea usando el software GraphPad Prism, y se determinó el valor de CI_{50} , definido como la concentración de compuesto requerida para inhibir el 50% de la actividad POP, a partir de la curva resultante.

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

en la que:

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

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

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

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

Los nuevos compuestos presentan 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 (n.º de ejemplo)	CI_{50} (nM)	DE
Ej. 1	45,0	7,01
Ej. comp. 3	48,7	20,3
Ej. comp. 4	365,3	103,6

Los datos de la tabla 1 se representan en la figura 1. En dicha figura, las barras representan el valor medio $\pm$ la desviación estándar (DE).

DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE PERMEABILIDAD DE LOS COMPUESTOS

Ensayo de permeabilidad de membrana artificial en paralelo (PAMPA)

Se usó el ensayo de permeabilidad de membrana artificial en paralelo (PAMPA) descrito en Kansy M *et al.*, *J. Med. Chem.* 1998;41(7):1007-10 para determinar la capacidad de los compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) mediante difusión pasiva (Di L *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* 2003;38(3):223-32). Se midió la

permeabilidad efectiva (P_e) de los compuestos a una concentración inicial de 200 μM . Se preparó la disolución tampón a partir de una disolución 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 nuevo compuesto en DMSO y se diluyó con disolución tampón hasta una concentración final de 200 μM (0,5% de contenido de DMSO). Se separó el sándwich de PAMPA y se llenó cada pocillo donante con 200 μl de la disolución de compuesto. Se colocó la placa aceptora en la placa donante, asegurando que el lado inferior de la membrana estuviera 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 a cada pocillo aceptor. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente en una atmósfera de humedad saturada durante 4 horas bajo agitación orbital a 100 rpm. Después de 4 horas, se analizó el contenido de los compartimentos aceptor y donante mediante HPLC: se transfirieron 150 μl de cada pocillo de la placa donante y 150 μl de cada pocillo de la placa aceptora 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 Å) (100 μl /inyección de los pocillos aceptores, 10 μl /inyección de los pocillos donantes y para referencias a t_0). También se confirmó el transporte mediante espectrometría de 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 fosfatídico y el 30,9% de otros compuestos.

Se calculó la permeabilidad efectiva (P_e) después de 4 horas usando la ecuación 2, se calculó el porcentaje de transporte (% de T) usando la ecuación 3 y se calculó la retención del compuesto (% de R) de la membrana fosfolipídica usando la ecuación 4:

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

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

$$\% \text{ de } R = \left(1 - \frac{C_D(t) + C_A(t)}{C_D(t_0)} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

en las que:

t es el tiempo (h)

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

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

Basándose en los valores indicativos de P_e mostrados en la tabla 2, los novedosos compuestos muestran una buena permeabilidad a través de la BHE (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
$P_e < 2 \cdot 10^{-6}$	Deficiente

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

Compuesto (n.º de ejemplo)	P_e ($\times 10^{-6}$ cm/s)	DE	% de T	DE	% de R	DE
1	4,7	0,1	18,1	0,4	24	3,5
Ej. comp. 3	22,14	5,86	29,92	4,80	10,93	1,60
Ej. comp. 4	-	-	10,43	2,06	-	-

Los datos de la tabla 3 se representan en la figura 2. En dicha figura, las barras representan el valor medio $\pm$ la desviación estándar (DE).

Ensayo de Caco-2

Las células Caco-2 se usan ampliamente como modelo *in vitro* para predecir la absorción farmacológica en seres humanos. La línea de células Caco-2 se deriva de carcinoma colorrectal humano, y cuando se cultiva, las células se diferencian espontáneamente en monocapas de enterocitos polarizados.

- 5 Se ha demostrado que la permeabilidad de fármacos a través de monocapas de células Caco-2 se correlaciona bien con la absorción *in vivo* en seres humanos (Zhao YH *et al.*, 2001, *J. Pharmaceut. Sci.* 90:749-784) y se ha convertido en un método *in vitro* bien establecido para la predicción de la absorción intestinal (Kansy M *et al.*, 2001, *Pharmacokinetic optimization in drug research*, Ed. Testa B *et al.*, 447-646).

Se realizaron los experimentos usando el kit de permeabilidad CacoReay (ReadyCell, Barcelona, España).

- 10 La misma semana de la recepción del kit, se licuó el medio de envío de las células según el manual de usuario proporcionado con el kit, tras lo cual se reemplazó el medio de envío por medio de Eagle modificado por Dulbecco nuevo (DMEM, bajo contenido en glucosa).

- 15 Tres días después, equivalentes al día 20 de cultivo celular, se comprobaron la calidad del sistema de barrera y la presencia de uniones estrechas entre las células midiendo la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) de la barrera celular. Un valor de TEER de $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (o mayor) indica que el sistema de barrera es aceptable para un ensayo de absorción. Se esterilizaron los electrodos sumergiéndolos en etanol (70%) durante 30 min bajo luz UV. Después de eso, se equilibró el electrodo durante 30 min en medio DMEM, precalentado a temperatura ambiente. Se realizaron las medidas de TEER a temperatura ambiente obteniendo un valor medio de $1357 \pm 168 \Omega \cdot \text{cm}^2$, confirmando la integridad de la barrera celular.

- 20 Antes del ensayo de permeabilidad, se preparó el tampón de transporte (HBSS (1x)- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) y se calentó hasta 37°C con el fin de evitar el estrés por temperatura de las células durante el experimento. En paralelo, se disolvieron los compuestos que van a someterse a prueba hasta una concentración final de $50 \mu\text{M}$ en tampón de transporte (HBSS (1x)- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$), que contenía un 0,5% de DMSO, una cantidad que toleran bien las células y que no afecta a la integridad de barrera. Se sometieron a prueba los compuestos a una concentración de $50 \mu\text{M}$.

- 25 Antes del ensayo de permeabilidad, se retiró el DMEM de los compartimentos apical y basal mediante succión. Se dejó un volumen de $10 \mu\text{l}$ de medio en cada compartimento con el fin de prevenir el secado de las células y el daño a sus propiedades de barrera. Se aclararon ambos compartimentos con tampón de transporte, se llenó el compartimento basal (inferior) con $300 \mu\text{l}$ y el compartimento apical (superior) con $75 \mu\text{l}$ de tampón de transporte.

- 30 Se retiró por completo el contenido del compartimento basal mediante succión y se llenó de nuevo con $250 \mu\text{l}$ del tampón de transporte. También se retiró el contenido del compartimento apical mediante succión, dejando $10 \mu\text{l}$ del tampón de transporte con el fin de evitar el secado de las células. A cada pocillo se le añadieron $65 \mu\text{l}$ de la disolución de compuesto que va a someterse a prueba.

- 35 Para los experimentos de transporte (de apical a basal), se incubaron las células con las disoluciones que contenían los compuestos durante 2 horas a 37°C . Después de eso, se recuperó el contenido de los compartimentos y se analizó mediante HPLC (columna C18 Sunfire $100 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, $100 \text{ \AA}$, Waters; velocidad de flujo de 1 ml/min ; gradiente del 0-100% de B en 8 min; A = ácido trifluoroacético al 0,045% en H_2O y B = ácido trifluoroacético al 0,036% en acetonitrilo, detección a 220 nm). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

- 40 Después de retirar las muestras de los compartimentos, con el fin de comprobar la integridad de las barreras celulares durante los ensayos, se llenaron de nuevo los compartimentos basales con $250 \mu\text{l}$ de tampón de transporte y los compartimentos apicales con $65 \mu\text{l}$ de una disolución de amarillo Lucifer (LY) a una concentración de $20 \mu\text{M}$ en tampón de transporte. Se incubó la barrera celular durante 1 hora a 37°C con la disolución de LY. El LY se usa como marcador de integridad de barrera para ensayos de permeabilidad. Después de la incubación, se recogió el contenido de los compartimentos y se analizó usando un fluorímetro.

- 45 Para una barrera de Caco-2 completamente funcional, la permeabilidad de LY debe ser menor del 0,7% después de 1 hora. Después del ensayo, la permeabilidad de LY era inferior a este promedio de transporte, lo que indica la integridad de barrera de la barrera durante la evaluación de los compuestos.

En el ensayo de permeabilidad de Caco-2, se calculó el porcentaje de transporte (% de T) para los compuestos según la siguiente ecuación:

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

- 50 en la que t es el tiempo (horas), $C_A(t)$ es la concentración de compuesto en el compartimento basal (aceptor) a tiempo t, $C_D(t_0)$ es la concentración de compuesto en el compartimento apical (donante) a tiempo 0.

Tabla 4: Permeabilidad (ensayo de Caco-2)

Compuesto (n.º de ejemplo)	% de T	DE
1	45	3
Ej. comp. 3	5,7	1

Tal como se muestra anteriormente, la permeabilidad a través del estómago del compuesto del ejemplo 1 es mucho mayor que la del ejemplo comparativo 3. En dicha figura, las barras representan el valor medio $\pm$ la desviación estándar (DE).

Los datos de la tabla 4 se representan en la figura 3.

Exposición en el cerebro *in vivo*

Para cada compuesto, se usaron para el estudio veinticuatro ratones macho adultos, de 7-8 semanas de edad el día del experimento, y se asignaron aleatoriamente entre los grupos. Se realizaron los experimentos en 3 grupos de animales tal como se describe en la tabla a continuación:

Grupo	Tratamiento, vía/dosis, volumen de administración	Ratones por grupo	Tiempos de muestras de plasma y cerebro
1	Sin tratamiento (grupo de control)	N=3	Antes de la dosis
2	Ej. comp. 3, i.p., 5 mg/kg, 10 ml/kg	N=21 (3 animales para cada tiempo de muestreo)	T0+5 min, T0+30 min, T0+1 h, T0+2 h, T0+4 h, T0+7 h, T0+24 h
3	Ej. 1, v.o., 5 mg/kg, 10 ml/kg	N=21 (3 animales para cada tiempo de muestreo)	T0+5 min, T0+30 min, T0+1 h, T0+2 h, T0+4 h, T0+7 h, T0+24 h
mg, miligramo; ml, mililitro; h, hora; kg, kilogramo; min, minuto; N, número de animales; i.p., intraperitoneal; v.o., vía oral; T, tiempo; min, minuto			

Después de la administración de compuesto, se realizó sangre terminal en varios puntos de tiempo después de la administración intraperitoneal (ej. comp. 3) u oral (ej. 1).

Después de la perfusión transcardiaca con solución salina tamponada con fosfato, también se recogieron los cerebros. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta su bioanálisis.

Se descongelaron las muestras de plasma a temperatura ambiente (TA), y se precipitaron con proteínas las muestras con el doble de volumen de acetonitrilo, que contenía 20 ng/ml de fenacetina como patrón interno. Se mezclaron a fondo las muestras, seguido de centrifugación durante 20 min a 2.200 x g. Se diluyeron 1:1 los sobrenadantes con solución salina tamponada con fosfato 150 mM (pH 7,4) y se pipetearon sobre placas de UPLC de 96 pocillos para esperar su análisis.

Se pesaron las muestras de cerebro, se descongelaron a TA y se prepararon para su análisis mediante la homogeneización del tejido en un homogeneizador de perlas con el cuádruple de volumen de solución salina tamponada con fosfato. Se trató el homogeneizado de manera similar a las muestras de plasma.

Se prepararon muestras de referencia (calibración) de manera similar a las muestras del estudio actual, después de realizar adiciones conocidas de plasma de blanco y homogeneizado de cerebro hasta concentraciones de 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ng/ml del ejemplo 1 y del ej. comp. 3. Se prepararon muestras de control de calidad de manera similar a las muestras del estudio actual, después de realizar adiciones conocidas de plasma de blanco y homogeneizado de cerebro hasta 20, 200 y 2000 ng/ml del ejemplo 1 o del ej. comp. 3.

Se cuantificaron los niveles de los compuestos del ej. comp. 3 y del ejemplo 1 a partir de plasma y cerebro de ratón. Se analizaron las muestras usando un método bioanalítico ajustado a propósito usando un dispositivo de UPLC/QE-Orbitrap-espectroscopía de masas.

- 5 Se representó gráficamente la concentración (ng/ml) de los compuestos a lo largo del tiempo y se calculó el área bajo la curva (AUC) en plasma y tejido cerebral usando Graphpad Prism™ 5.0. Se calculó la razón de plasma con respecto a cerebro de la siguiente manera:

$$\% \text{ de paso a través de la BHE} = \frac{AUC_{\text{cerebro}}}{AUC_{\text{plasma}}} \times 100$$

Tabla 5: Exposición en el cerebro

Compuesto (n.º de ejemplo)	% de BHE
1	25,3
Ej. comp. 3	21

- 10 Los datos de la tabla 5 se representan en la figura 4.

Tal como se muestra anteriormente, cuando se usa el compuesto del ejemplo 1 mediante administración oral, es posible lograr una mayor exposición en el cerebro que la lograda por otros compuestos incluso cuando dichos compuestos se administran por vía intraperitoneal.

Estabilidad microsómica (en ratas)

- 15 La estabilidad microsómica es útil para predecir si un compuesto superará el metabolismo de primer paso y logrará una exposición sistémica después de la administración oral. También es útil para predecir la semivida del compuesto una vez que se encuentra en el torrente circulatorio.

- 20 Se investigó la estabilidad de los compuestos en microsomas hepáticos agrupados de rata (Sprague-Dawley) (número de catálogo 452501) según las instrucciones proporcionadas por el proveedor (BD Biosciences). Se preparó una disolución madre (500 µM) del compuesto que va a someterse a prueba en DMSO. Se incubaron 2 µl de los compuestos a una concentración final de 1 µM en una mezcla de:

- 713 µl de H₂O

- 200 µl de fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,4)

- 50 µl de disolución A del sistema de regeneración de NADPH (BD Biosciences, número de catálogo 451220)

- 25 - 10 µl de disolución B del sistema de regeneración de NADPH (BD Biosciences, número de catálogo 451200)

- 30 Se calentó la mezcla resultante hasta 37°C durante 5 min. Después de eso, se añadieron 25 µl de microsomas hepáticos a una concentración final de 0,5 mg/ml. Se incubó la mezcla a 37°C con agitación orbital (100 rpm). En puntos de tiempo seleccionados, se extrajeron alícuotas de 100 µl y se mezclaron con 100 µl de acetonitrilo. Se agitó el precipitado obtenido en un vórtex durante 1 minuto. Se mantuvieron las muestras a 4°C durante 30 min, tras lo cual se centrifugaron las muestras a 20.000 x g a 4°C durante 30 min. Se eliminó por filtración el sobrenadante y posteriormente se analizó mediante UPLC-EM. Todas las pruebas de estabilidad se realizaron por duplicado.

Tabla 6: Estabilidad microsómica (en ratas)

Compuesto (n.º de ejemplo)	Semivida (min)
Ej. 1	12
Ej. comp. 3	<5
Ej. comp. 4	<5

- 35 Estos datos sugieren que el ejemplo comparativo 3 y el ejemplo comparativo 4 no superarán el metabolismo de primer paso después de la administración oral. Por tanto, no alcanzarán la circulación sistémica después de la administración oral. De hecho, el ejemplo comparativo 3 no mostró eficacia después de la administración oral, siendo los niveles plasmáticos detectados del fármaco muy bajos.

PK en ratones

La farmacocinética de los compuestos tras la administración de bolo intravenoso se llevó a cabo en ratones Swiss Albino macho. El estudio se llevó a cabo según las directrices del Comité Institucional de Ética Animal (IAEC) y según los requisitos del Comité con el Propósito de Control y Supervisión de Experimentos con Animales (CPCSEA), India.

- 5 El estudio se llevó a cabo en 12 ratones por compuesto usando un diseño de muestreo disperso ($n=3$ /punto de tiempo) para producir un perfil compuesto. Se disolvieron los compuestos en Tween80® al 2% en solución salina (NaCl al 0,9%) a una concentración de 0,5 mg/ml. A los ratones se les administró una dosis única de 1 mg/kg de la disolución de compuesto mediante bolo intravenoso a través de la vena lateral de la cola usando una jeringa de BD de 1 ml guiada con una aguja de 26G a un volumen de dosis de 2 ml/kg.
- 10 Se extrajeron muestras de sangre ($n=3$ por punto de tiempo) a las 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 h tras la dosis. En cada punto de tiempo, se extrajeron 120 μ l de sangre mediante punción del plexo retroorbital y se transfirieron a un tubo de centrifuga etiquetado que contenía disolución de K_2EDTA 200 mM (20 μ l por ml de sangre). Se centrifugaron las muestras de sangre a 5000 $\times g$ durante 5 min a $4\pm2^\circ C$. Se almacenaron las muestras de plasma por debajo de $-60^\circ C$ hasta su bioanálisis.
- 15 Se analizaron las muestras de plasma usando un método de CL-EM/EM con un LLOQ de 1,06 ng/ml. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos en plasma usando la herramienta de análisis no compartimental del software validado WinNonlin® de Phoenix (versión 6.3). Se calculó el área bajo la curva de concentración-tiempo ($AUC_{\text{último}}$) mediante la regla trapezoidal lineal. La concentración máxima en plasma ($C_{\text{máx}}$) y el tiempo hasta alcanzar la concentración máxima en plasma ($T_{\text{máx}}$) fueron los valores observados. El aclaramiento (CL) y el volumen de distribución (Vss) fueron los valores predichos.
- 20

Tabla 7: Farmacocinética (en ratones)

Compuesto (n.º de ejemplo)	$AUC_{\text{último}}$ (ng·h/ml)	CL (ml/min/kg)	Vss (l/kg)
1	127	99,6	1,19
Ej. comp. 3	131	126	0,64
Ej. comp. 4	22,7	697	9,06

- El ejemplo comparativo 4 muestra un aclaramiento muy alto después de la administración intravenosa (i.v.) en ratones, que indica que el compuesto experimenta un alto metabolismo de primer paso (de acuerdo con los datos de estabilidad microsómica), lo que sugiere que el compuesto no alcanzará la circulación sistémica después de la administración oral.
- 25

EFFECTO DE LOS NUEVOS COMPUESTOS SOBRE EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA EN UN MODELO ANIMAL DE DETERIORO DE LA CAPACIDAD INTELECTUAL

- Se evaluó la eficacia de los nuevos compuestos como potenciadores de la capacidad intelectual en un modelo farmacológico de deterioro cognitivo. Se evaluaron los efectos de los nuevos new compuestos en roedores (ratones o ratas) no tratados y tratados con MK-801. MK-801 es un antagonista no competitivo del receptor de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) que perjudica el rendimiento de los animales 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 deficiencias en el procesamiento sensorial, la hipermotilidad, la estereotipia y la ataxia. El fenotipo conductual inducido por el tratamiento con MK-801 se ha usado ampliamente como modelo animal de deficiencias cognitivas (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).
- 30
- Con el fin de determinar si los compuestos sometidos a prueba actúan como potenciador cognitivo, se sometió a prueba su capacidad para restablecer el comportamiento cognitivo normal a través de pruebas ampliamente usadas tales como la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (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 acuático de Morris (D'Hooge R *et al.*, *Brain Res. Rev.* 2001;36:60–90); y la tarea de alternación del laberinto en forma de T (Boess FG *et al.*, *Neuropharmacology* 2004;47:1081–92; Spowart-Manning L *et al.*, *Behav. Brain Res.* 2004;151:37–46).
- 35
- 40
- 45

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

Tarea de reconocimiento de objeto novedoso

- 5 La **tarea de reconocimiento de objeto novedoso (NOR)** se basa en la preferencia natural de los roedores para explorar objetos novedosos (Ennaceur A *et al.*, *Behav. Brain Res.* 1988;31:47–59). Es una prueba sin recompensa relevante para estudiar deficiencias en la memoria y en el aprendizaje visuales. Brevemente, el procedimiento de la tarea de NOR consistió en tres ensayos: habituación, entrenamiento y retención. Cada animal se habituó a un recinto circular de 40 cm de diámetro durante 10 min en ausencia de objetos (sesión de habituación). Al día siguiente, se colocó el animal durante 10 min en el recinto circular para el ensayo de entrenamiento, y se colocaron dos objetos idénticos en una posición simétrica. Esta etapa se realizó durante dos días consecutivos. Al tercer día, se reemplazó uno de los objetos por un objeto diferente. Se usó el objeto no usado en el ensayo de entrenamiento como objeto novedoso en el ensayo de retención. Luego se permitió que los animales exploraran libremente durante 10 min, y se registró el tiempo empleado en explorar cada objeto. Se espera que el animal emplee más tiempo explorando el objeto novedoso, que es un signo de memoria de reconocimiento intacta. Se calculó un índice de discriminación de la siguiente manera: tiempo empleado explorando el nuevo objeto *menos* tiempo empleado explorando el antiguo objeto, dividido entre el tiempo total empleado explorando ambos objetos, y multiplicado por 100. Se consideró que un mayor índice de discriminación reflejaba una mayor retención de memoria.

Compuestos administrados por vía oral

- 20 Se realizó el experimento usando ratones C57/Bl6 macho de 8-9 semanas de edad (n = 7-9 animales por grupo). Se disolvieron los compuestos con una mezcla de Tween80® al 5% en solución salina (NaCl al 0,9%) para obtener una concentración de disolución de 0,5 mg/ml.

- La prueba se dividió en tres partes: habituación, entrenamiento y prueba. El primer día, se habituaron los animales al recinto (circular, 40 cm de diámetro) durante 10 minutos. En los dos días siguientes, se permitió que los animales exploraran libremente dos objetos idénticos colocados en el recinto durante 10 minutos. En las sesiones de prueba (cuarto día), se reemplazó uno de los objetos por uno novedoso. Antes de esta sesión, treinta y cinco minutos antes de la prueba, a los animales se les administraron por vía oral (v.o.) los compuestos en estudio (Tween80® al 5% en solución salina, 5 mg/kg) o vehículo (Tween80® al 5% en solución salina, 1 ml por 100 g de peso corporal). Para inducir deficiencias cognitivas, se administró dizocilpina (MK-801) por vía subcutánea a una dosis de 0,2 mg/kg en solución salina 20 min antes de la prueba al grupo de control negativo o a los grupos de análisis de fármaco. Al grupo de control de nivel inicial se le inyectó solución salina.

Después de la administración de fármaco, se permitió que cada ratón explorara libremente los objetos durante 10 minutos. Se definió el índice de discriminación (ID) como parámetro para la evaluación:

$$\% \text{ de ID} = \left(\frac{\text{tiempo dedicado al nuevo objeto menos tiempo dedicado al objeto familiar}}{\text{tiempo dedicado al nuevo objeto más tiempo dedicado al objeto familiar}} \right) \times 100$$

- 35 Se grabó el experimento usando una cámara web colocada 1,5 m por encima del recinto. Se analizó la distancia recorrida por los ratones como porcentaje de tiempo empleado en las zonas del recinto circular usando el software Panlab SMART 2.0.

Compuestos administrados por vía intraperitoneal

- 40 Se realizó el experimento usando ratones C57/Bl6 macho de 8-9 semanas de edad (n = 7-9 animales por grupo). Se disolvieron los compuestos con una mezcla de Tween80® al 5% en solución salina (NaCl al 0,9%) para obtener una concentración de disolución de 0,5 mg/ml.

- La prueba se dividió en tres partes: habituación, entrenamiento y prueba. El primer día, se habituaron los animales al recinto (circular, 40 cm de diámetro) durante 10 minutos. En los dos días siguientes, se permitió que los animales exploraran libremente dos objetos idénticos colocados en el recinto durante 10 minutos. En las sesiones de prueba (cuarto día), se reemplazó uno de los objetos por uno novedoso. Antes de esta sesión, treinta y cinco minutos antes de la prueba, a los animales se les administraron por vía intraperitoneal los compuestos en estudio (Tween80® al 5% en solución salina, 5 mg/kg) o vehículo (Tween80® al 5% en solución salina, 1 ml por 100 g de peso corporal). Para inducir deficiencias cognitivas, se administró dizocilpina (MK-801) por vía subcutánea a una dosis de 0,2 mg/kg en solución salina 20 min antes de la prueba al grupo de control negativo o a los grupos de análisis de fármaco. Al grupo de control de nivel inicial se le inyectó solución salina.

Después de la administración de fármaco, se permitió que cada ratón explorara libremente los objetos durante 10 minutos. Se definió el índice de discriminación (ID) como parámetro para la evaluación:

$$\% \text{ de ID} = \left(\frac{\text{tiempo dedicado al nuevo objeto menos tiempo dedicado al objeto familiar}}{\text{tiempo dedicado al nuevo objeto más tiempo dedicado al objeto familiar}} \right) \times 100$$

Se grabó el experimento usando una cámara web colocada 1,5 m por encima del recinto. Se analizó la distancia recorrida por los ratones como porcentaje de tiempo empleado en las zonas del recinto circular usando el software Panlab SMART 2.0.

- 5 Los resultados obtenidos cuando se administra el compuesto del ejemplo 1 y el del ejemplo comparativo 3 se proporcionan en la tabla a continuación.

Tabla 8: Ensayo de tarea de NOR

	Compuesto	Índice de discriminación, %
Intraperitoneal	Control	39,5 ± 3,9**
	MK-801 (s.c.)	21 ± 4,7
	MK-801 (s.c.) + ej. 1 (i.p.)	30,3 ± 3,9
	MK-801 (s.c.) + ej. comp. 3 (i.p.)	42,7 ± 3,3***
Oral	Control	53,3 ± 2,7***
	MK-801 (s.c.)	16,6 ± 5,9
	MK-801 (s.c.) + ej. 1 (v.o.)	42,1 ± 5,1**
	MK-801 (s.c.) + ej. comp. 3 (v.o.)	20,1 ± 2,9

- 10 Los datos de la tabla 8 se representan en la figura 5a (administración intraperitoneal) y en la figura 5b (administración oral). En dichas figuras, las barras representan la media ± el e.e.m. de n animales. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 frente a las condiciones iniciales (MK-801 inicial) de deficiencia cognitiva (prueba de ANOVA unilateral seguida de prueba *a posteriori* de Dunnett).

- 15 Tal como se muestra anteriormente, el compuesto del ejemplo 1 es superior al del ejemplo comparativo 3 cuando se administra por vía oral, lo que hace que sea particularmente adecuado para administración oral.

Perfil de selectividad (unión a 5-HT1A)

Se realizó el experimento usando el panel SafetyScreen44® de Cerep/Eurofins. Se sometieron a prueba los compuestos a una concentración de 100 µM (en DMSO al 1%).

- 20 Se calculó la unión de compuesto como porcentaje de inhibición de la unión de un ligando marcado radiactivamente específico para cada diana.

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de unión específica de control

$$100 - \left(\frac{\text{unión específica medida}}{\text{unión específica de control}} \times 100 \right)$$

obtenida en presencia de los compuestos sometidos a prueba.

- 25 Se consideró que los resultados que mostraban una inhibición mayor del 50% representaban efectos significativos de los compuestos de prueba.

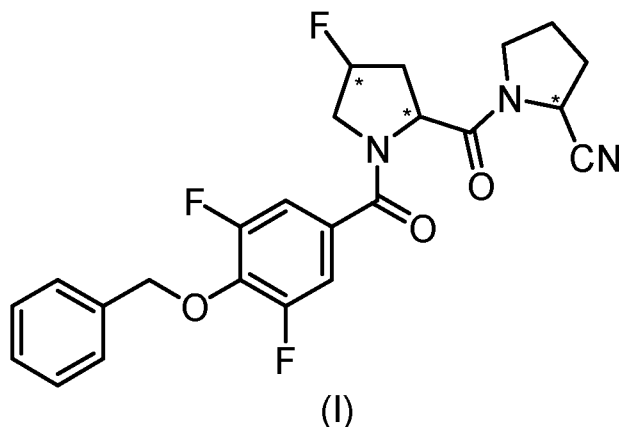
Tabla 9: Unión al receptor de 5-HT1A

Compuesto	% de inhibición de unión específica de control	DE
Ej. 1	-6,3	1,2
Ej. comp. 3	64,6	5,6

Los datos de la tabla 9 se representan en la figura 6.

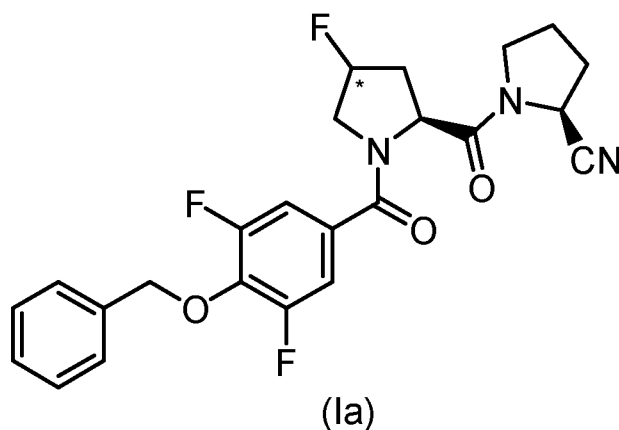
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula (I)



(en la que los asteriscos indican centros quirales), sus estereoisómeros y sales del mismo.

- 5 2. Compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula (Ia):



sus estereoisómeros y sales del mismo.

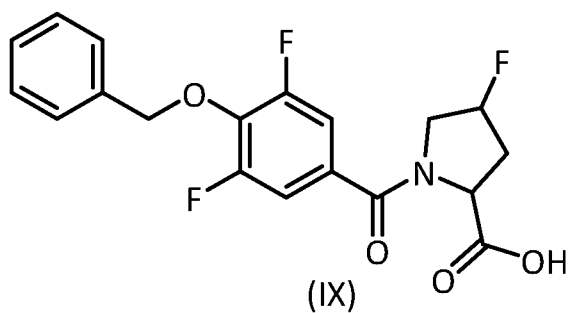
3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona de:

- (S)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- 10 • (R)-1-((2S,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2R,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (R)-1-((2R,4R)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (S)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (R)-1-((2S,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- 15 • (S)-1-((2R,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo
- (R)-1-((2R,4S)-1-(4-(benciloxi)-3,5-difluorobenzoyl)-4-fluoropirrolidin-2-carbonil)pirrolidin-2-carbonitrilo,

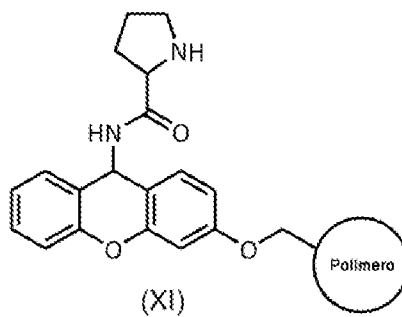
y sales de los mismos.

4. Procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende

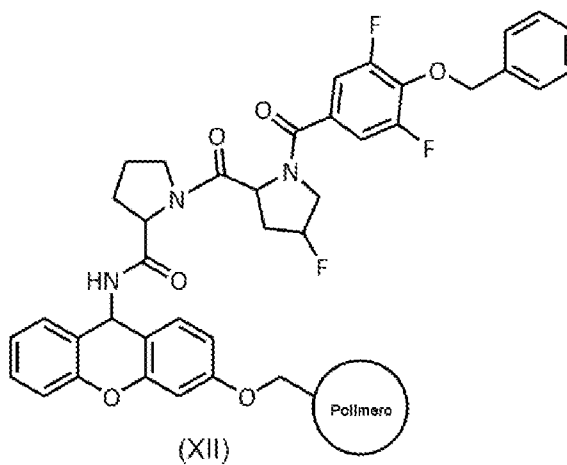
- 20 a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IX):



con un compuesto de fórmula (XI):

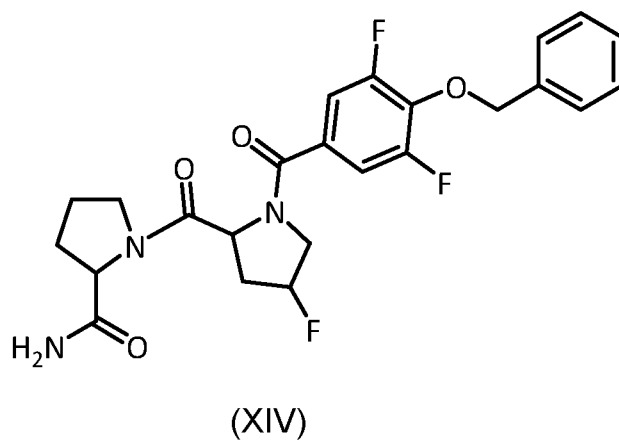


para producir un compuesto de fórmula (XII):



5

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

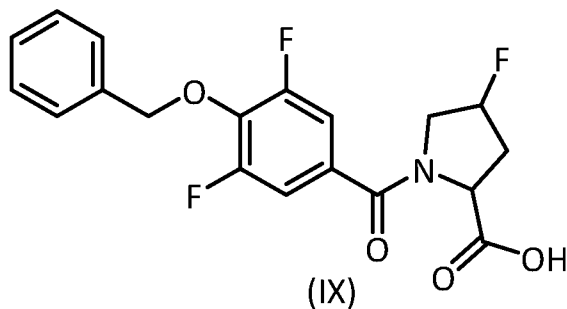


y

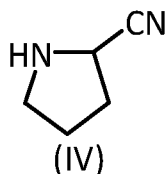
c) someter el compuesto de fórmula (XIV) a condiciones que pueden transformar un grupo carboxamida en un grupo nitrilo para producir el compuesto de fórmula (I):

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

5. Procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, sus estereoisómeros y sales del mismo, que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IX):



con un compuesto de fórmula (IV):



- 10
6. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, sus estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso como medicamento.
- 15 8. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno cognitivo.
9. Compuesto para su uso según la reivindicación 8, en el que el trastorno cognitivo es un trastorno cognitivo asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esquizofrenia, trastorno depresivo mayor, trastorno afectivo bipolar, trastorno de conducta durante el sueño REM, enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal o esclerosis lateral amiotrófica.
- 20

FIGURA 1

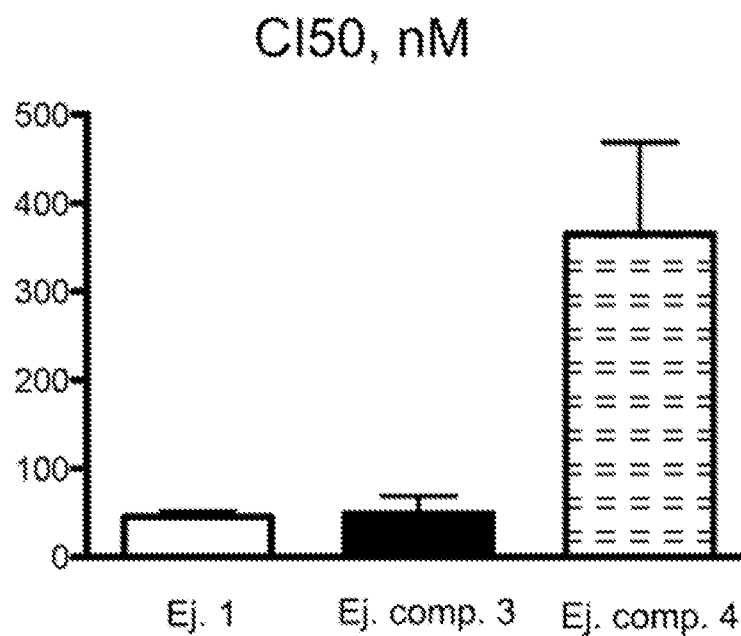


FIGURA 2

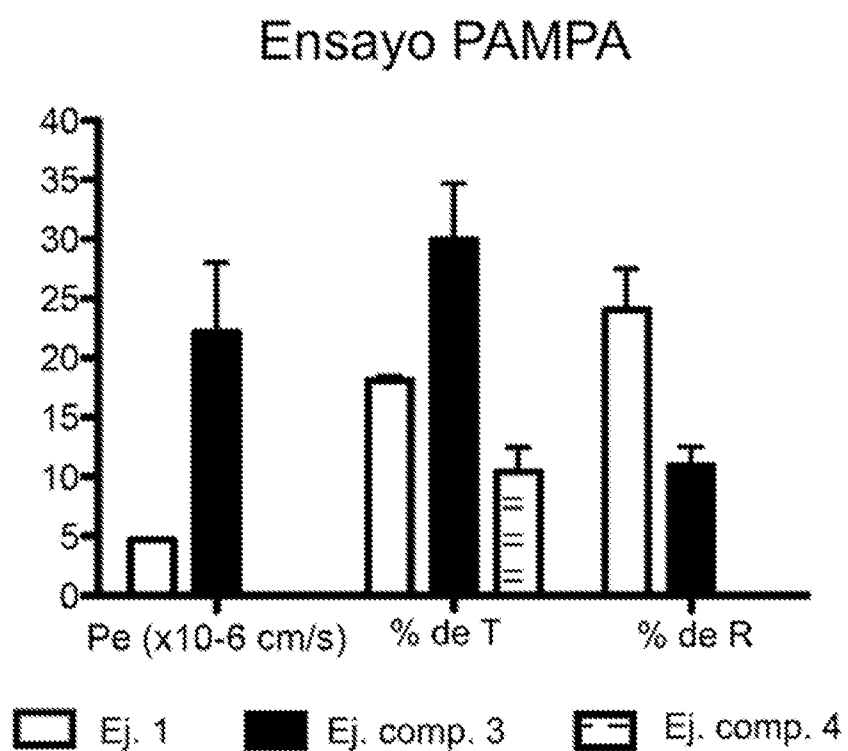


FIGURA 3

% de T

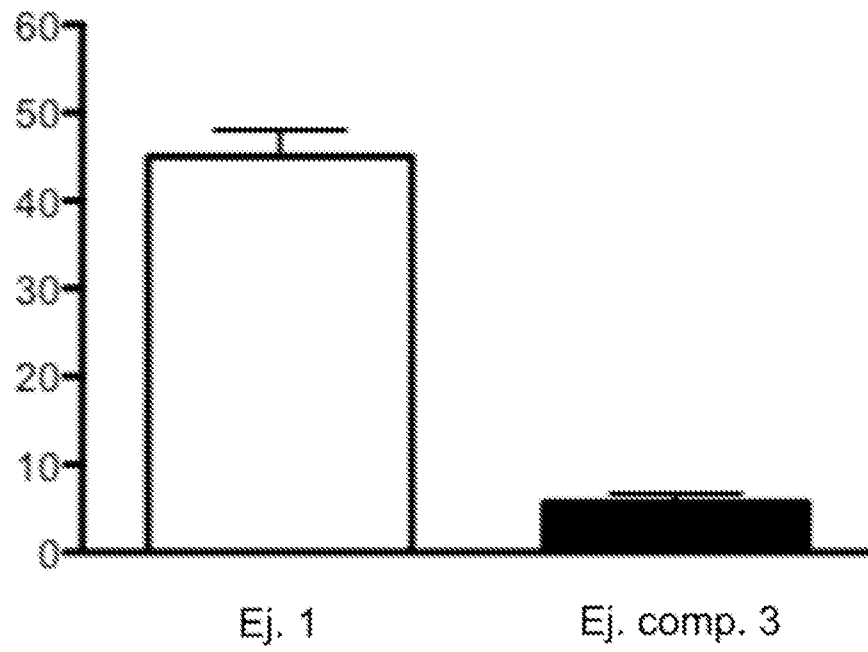


FIGURA 4

% de BHE

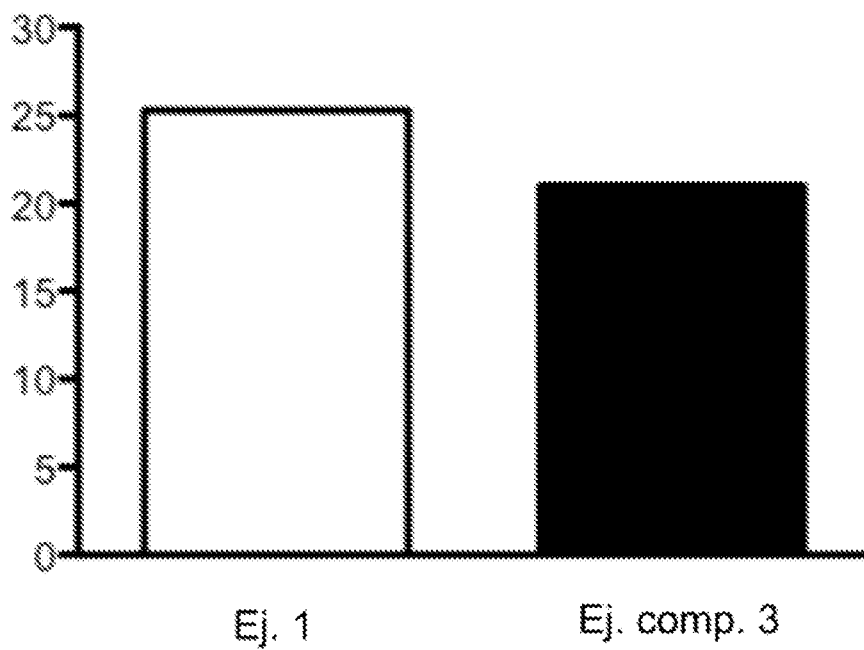


FIGURA 5a

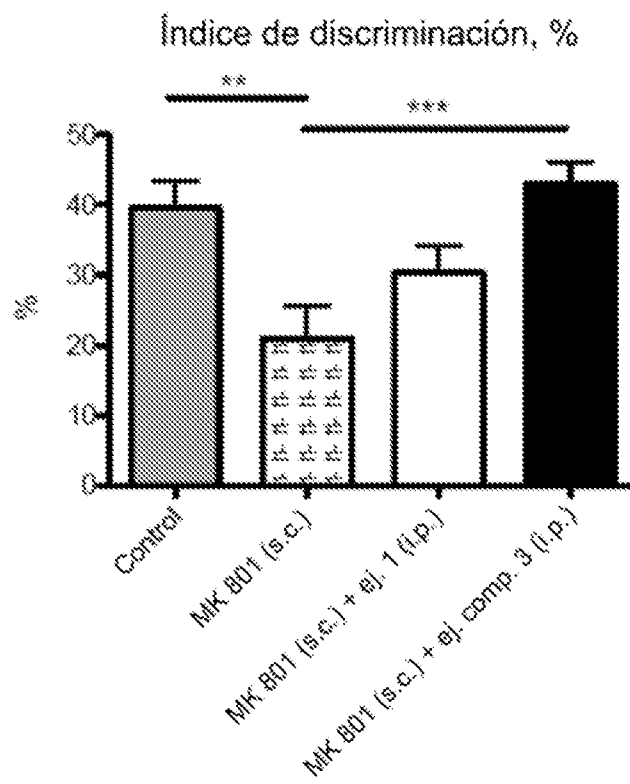


FIGURA 5b

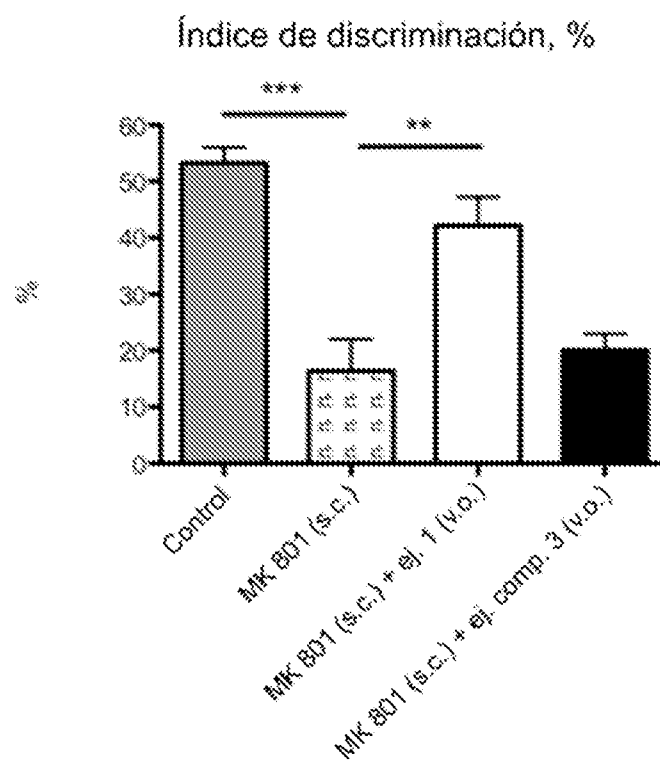


FIGURA 6

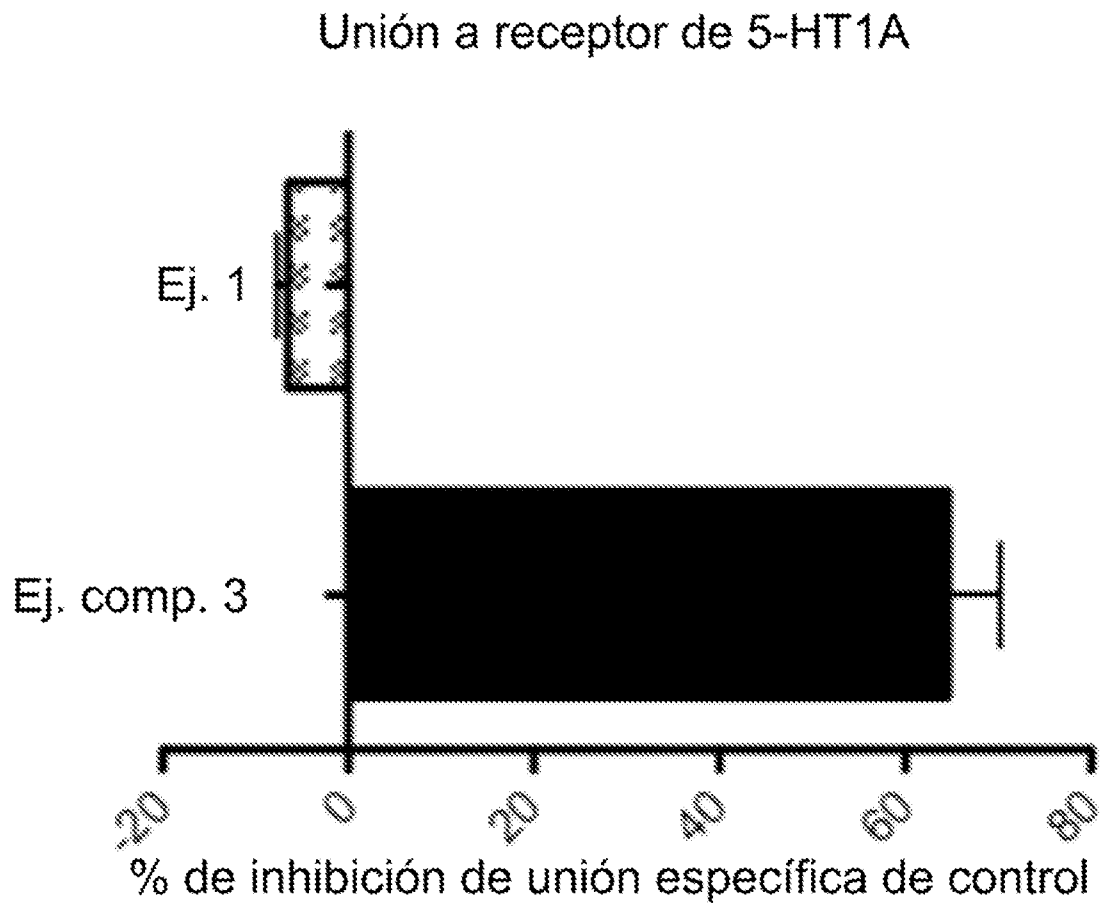


FIGURA 7

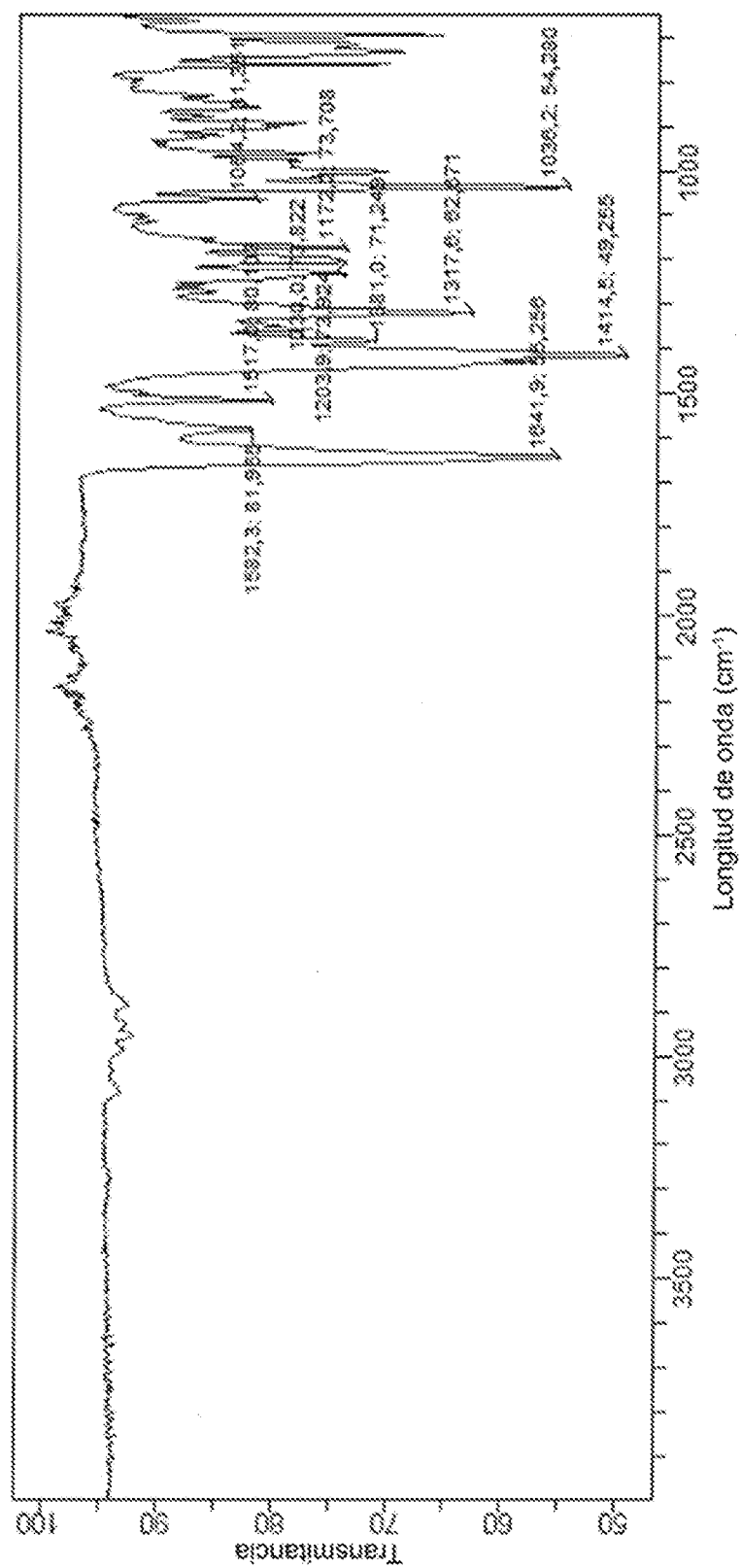


FIGURA 8

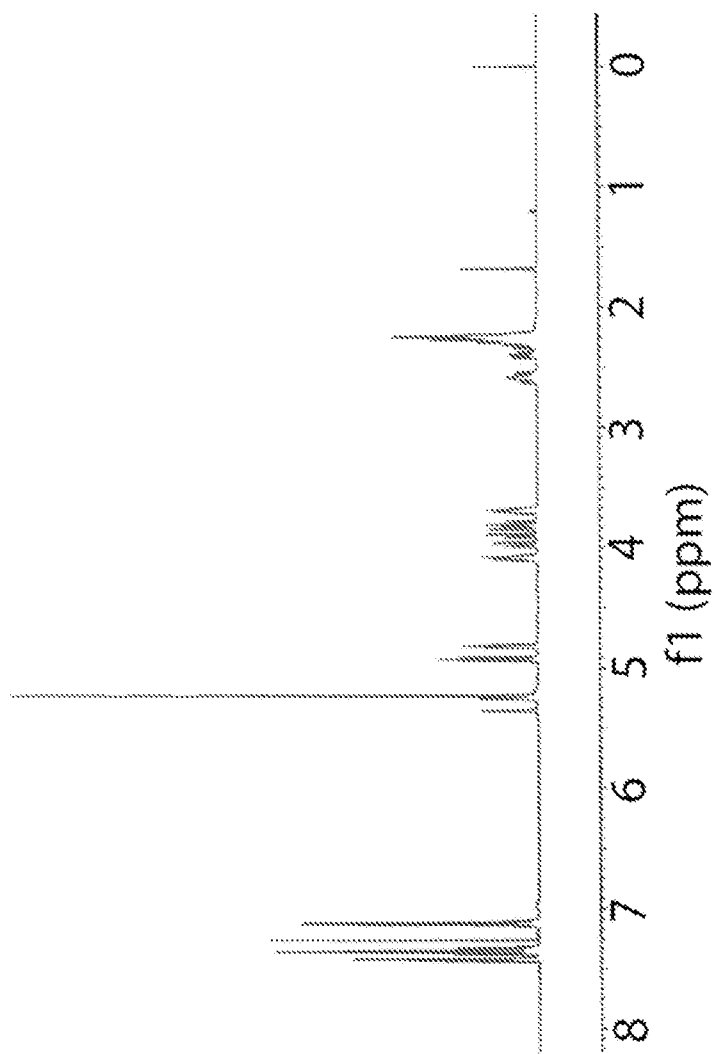


FIGURA 9

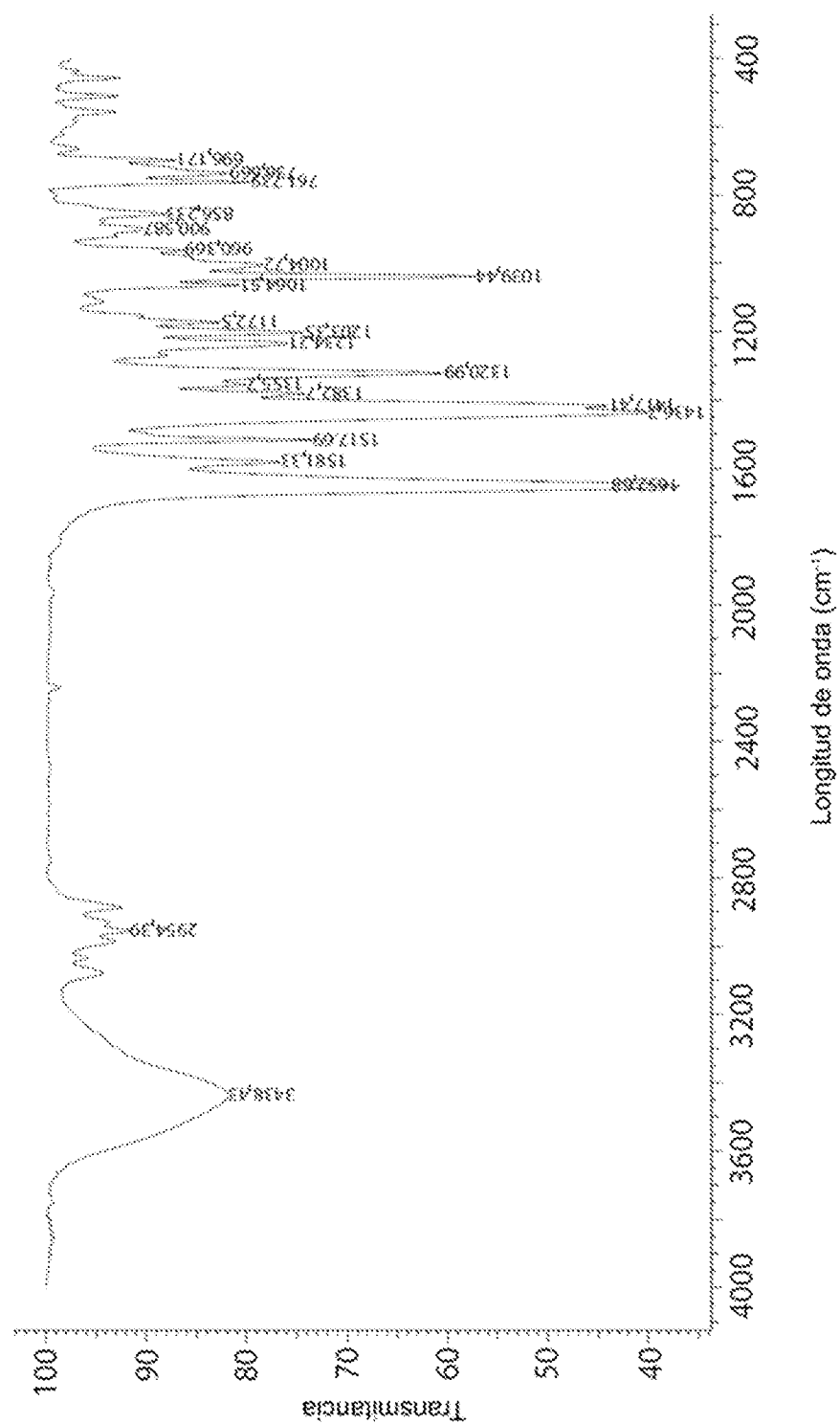


FIGURA 10

