

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2490533

DAL TITOLO:

“NUOVE COMPOSIZIONI PER PREVENIRE E/O TRATTARE
DISTURBI DA ACCUMULO LISOSOMIALE”

*** **

Descrizione

CAMPO DELL'INVENZIONE

[0001] La presente invenzione fornisce nuovi composti, noti come chaperon farmacologici, così come metodi che utilizzano gli stessi per la prevenzione e/o il trattamento di disturbi da accumulo lisosomiale. In particolare, la presente invenzione fornisce metodi per la prevenzione e/o il trattamento della malattia di Gaucher.

STATO DELL'ARTE DELL'INVENZIONE

[0002] I disturbi da accumulo lisosomiale sono causati da un deficit nella funzione lisosomiale che determina l'accumulo di sostanze all'interno del lisosoma delle cellule. Questo deficit è solitamente una conseguenza della carenza di un singolo enzima necessario per il metabolismo di lipide, glicogeno, glicoproteina o mucopolisaccaride. La malattia di Gaucher include milza e fegato ingrossati, disfunzione del fegato, disturbi scheletrici e lesioni ossee che possono essere dolorose, complicazioni neurologiche gravi, rigonfiamento dei linfonodi e (occasionalmente) di articolazioni adiacenti, addome dilatato, un colore bruno della pelle, anemia, basse piastrine nel sangue e depositi gialli di grasso sulla sclera. Inoltre, le persone affette dalla malattia di

Gaucher possono essere anche più suscettibili ad infezioni. Vi è una necessità di metodi per prevenire e/o trattare disturbi da accumulo lisosomiale che forniscano ai pazienti una qualità di vita più elevata e che ottengano un migliore esito clinico. In particolare, vi è una necessità di metodi per prevenire

[0003] e/o trattare la malattia di Gaucher che forniscano ai pazienti una qualità di vita più elevata e ottengano un migliore esito clinico.

[0004] Faugerox *et al*, *Organic and Biomolecular Chemistry*, **4(24)**, 4437-4439 (2006) riguarda composti che sono detti essere inibitori della glucosilceramide sintasi e in particolare divulga la *N*-butil-1-deossinojirimicina (Miglustat).

[0005] US2004/082641 divulga derivati della piperidina che sono detti essere per l'uso nel trattamento di malattie cardiache e cardiovascolari precoci.

[0006] US2008/009516 e EP1860101 insegnano entrambi l'uso di isofagomina e di suoi derivati per il trattamento di disturbi da accumulo lisosomiale.

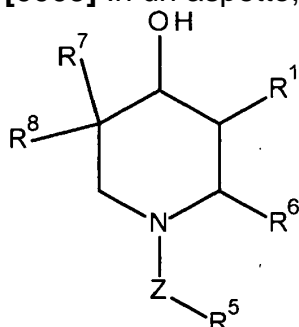
SOMMARIO DELL'INVENZIONE

[0007] La presente invenzione fornisce nuovi composti così come composizioni e metodi che utilizzano gli stessi per prevenire e/o trattare un disturbo da accumulo lisosomiale in un paziente a rischio di sviluppare o a cui è stato diagnosticato lo stesso, che includono la

somministrazione al paziente che ne necessiti di una quantità efficace di un composto descritto qui.

[0008] Si comprende da parte di un tecnico del ramo che R^2 , R^3 e R^4 nelle Formule II e III sotto non verranno selezionati in modo che ne risulti una molecola instabile.

[0009] In un aspetto, viene fornito un composto di Formula II



in cui:

R^1 è $C(R^2)(R^3)(R^4)$;

R^2 è idrogeno, -OH o alogeno;

R^3 è idrogeno, -OH, alogeno o -CH₃;

R^4 è alogeno, -CH₃, fenile, fluorofenile, metilfenile, cicloesilmetile, in cui quando R^4 è un alogeno R^2 e R^3 non possono essere entrambi idrogeno;

R^3 e R^4 possono unirsi all'atomo di carbonio a cui sono attaccati per formare un anello cicloalchilico, il quale può essere facoltativamente sostituito con uno o più atomi di alogeno;

R^6 è idrogeno o fenilalchile;

Z è facoltativo, quando presente Z è $-(\text{CH}_2)-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}-$, $-\text{S}(=\text{O})_2-$, $-\text{S}(=\text{O})_2-\text{CH}_2-$, $\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{S}(=\text{O})_2-\text{NR}^9-$, $-\text{C}(=\text{S})\text{NH}-$ o $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2-$;

R^9 è idrogeno o CH_3 ;

R^5 è idrogeno o amminofenilalchile;

R^7 è $-\text{OH}$ o alogeno; e

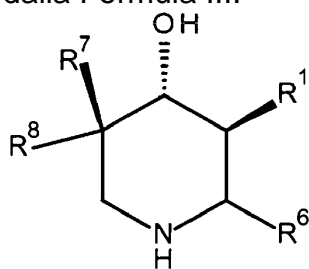
R^8 è idrogeno, alogeno o $-\text{CH}_3$,

a condizione che R^2 e R^3 non possano essere entrambi idrogeno quando R^4 è alogeno, Z non è presente, R^7 è $-\text{OH}$, R^5 , R^6 e R^8 sono idrogeno;

o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile;

per uso nella prevenzione e/o nel trattamento di un disturbo da accumulo lisosomiale in un paziente a rischio di sviluppare o a cui è stato diagnosticato lo stesso.

[0010] In ancora un altro aspetto, viene fornito un composto definito dalla Formula III:



in cui

R^1 è $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)(\text{R}^4)$;

R^2 è idrogeno, $-\text{OH}$ o alogeno;

R^3 è idrogeno, $-\text{OH}$, alogeno o $-\text{CH}_3$;

R^4 è alogeno, $-CH_3$, fenile, fluorofenile, metilfenile, cicloesilmetile, in cui quando R^4 è un alogeno R^2 e R^3 non possono essere entrambi idrogeno;

R^3 e R^4 possono unirsi all'atomo di carbonio a cui sono attaccati per formare un anello cicloalchilico, il quale può essere facoltativamente sostituito con uno o più atomi di alogeno;

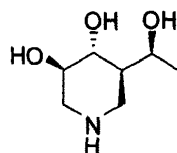
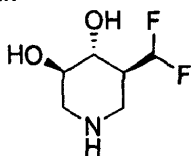
R^7 è $-OH$ o alogeno; e

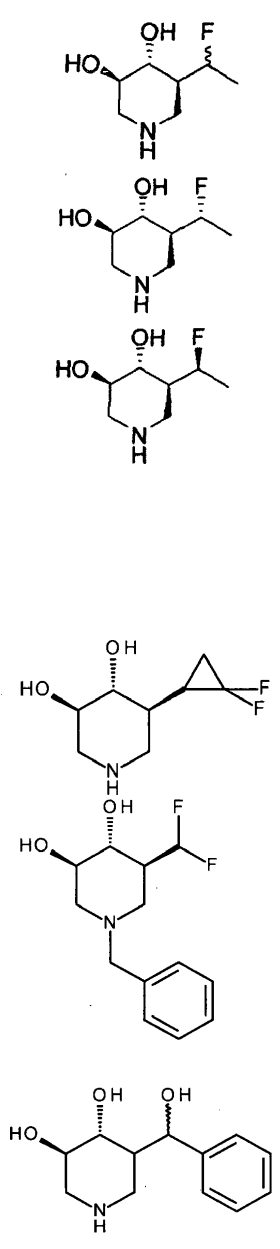
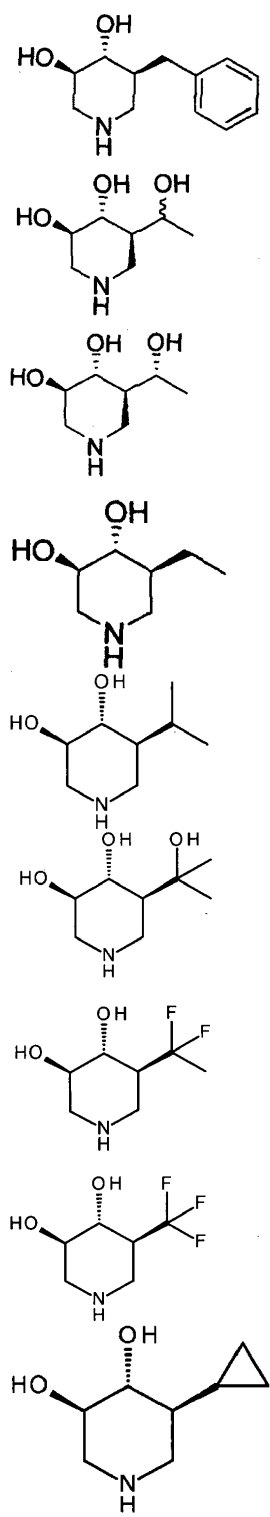
R^8 è idrogeno, alogeno o $-CH_3$,

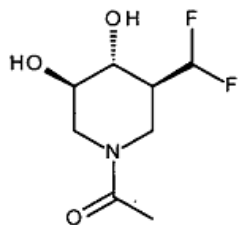
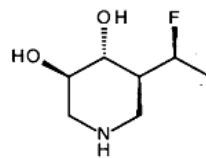
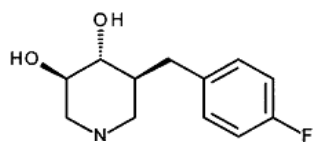
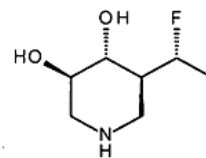
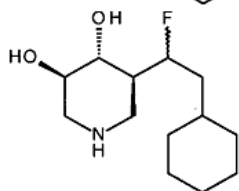
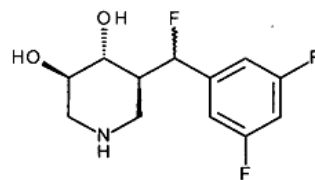
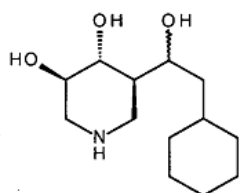
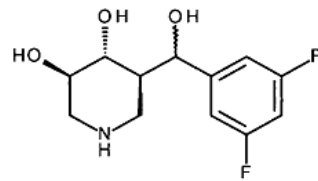
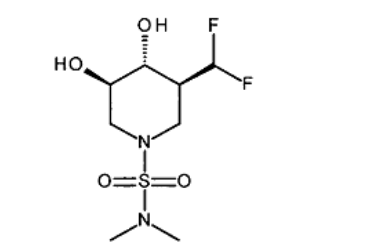
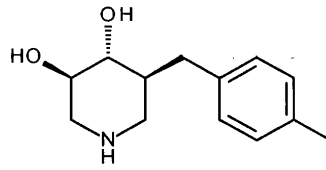
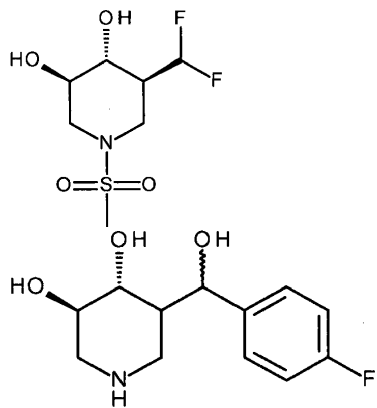
a condizione che R^2 e R^3 non possano essere entrambi idrogeno quando R^4 è alogeno R^7 è $-OH$, R^5 , R^6 e R^8 sono idrogeno;

per uso nella prevenzione e/o nel trattamento di un disturbo da accumulo lisosomiale in un paziente a rischio di sviluppare o a cui è stato diagnosticato lo stesso.

[0011] Opportunamente, il composto viene selezionato dai seguenti:







o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o qualsiasi combinazione di due o più di loro.

[0012] In una forma di realizzazione, il composto è (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile. In una forma di realizzazione, il composto è (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile. In una forma di realizzazione, il composto è (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

[0013] In una forma di realizzazione, il disturbo da accumulo lisosomiale è associato ad accumulo di almeno un glicolipide. In una forma di realizzazione, il disturbo da accumulo lisosomiale è associato ad accumulo di almeno un glicosfingolipide. In una forma di realizzazione, il disturbo da accumulo lisosomiale è associato ad accumulo di glucocerebroside. In una forma di realizzazione, il disturbo da accumulo lisosomiale è associato ad una carenza di glucocerebrosidasi. In una forma di realizzazione, il disturbo da accumulo lisosomiale è associato ad una mutazione nella glucocerebrosidasi. In una forma di realizzazione, la malattia da accumulo lisosomiale è la malattia di Niemann-Pick. In una forma di realizzazione, la malattia da accumulo lisosomiale è la malattia di Gaucher. In una forma di realizzazione, il composto può essere somministrato con una quantità efficace di almeno un altro agente terapeutico. In una forma di realizzazione, l' almeno un altro agente terapeutico è imiglucerasi o 1,5-(butilimmino)-1,5-dideossi-D-glucitolo.

[0014] La presente invenzione fornisce anche composti come definiti sopra o un loro sale o solvato farmaceuticamente accettabile per la prevenzione e/o il trattamento della malattia di Gaucher in un paziente a rischio di sviluppare o a cui è stata diagnosticata la stessa.

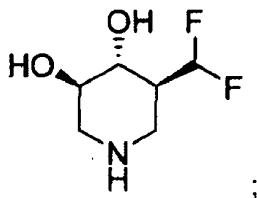
[0015] In una forma di realizzazione, il composto è (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile. In una forma di realizzazione, il composto è (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile. In una forma di realizzazione, il composto è (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

[0016] In una forma di realizzazione, il composto viene somministrato con una quantità efficace di almeno un altro agente terapeutico. In una forma di realizzazione, almeno un altro agente terapeutico è imiglucerasi o 1,5-(butilimmino)-1,5-dideossi-D-glucitolo.

[0017] La presente invenzione fornisce anche kit comprendenti:

- un contenitore avente una quantità efficace di un composto di

formula:



o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile; e

- istruzioni per utilizzare lo stesso per prevenire e/o trattare un disturbo da accumulo lisosomiale.

[0018] In una forma di realizzazione, il disturbo da accumulo lisosomiale è la malattia di Gaucher.

[0019] La presente invenzione fornisce anche 5-(fluorometil)piperidin-3,4-diolo, 5-(clorometil)piperidin-3,4-diolo, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o qualsiasi combinazione di due o più di loro per uso in un metodo per incrementare l'attività della glucocerebrosidasi in una cellula ex vivo.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

[0021] Come utilizzati qui i seguenti termini avranno le definizioni presentate sotto.

[0022] Come utilizzato qui, il termine "trattare" significa migliorare uno o più sintomi associati alla malattia a cui si fa riferimento.

[0023] Come utilizzato qui, il termine "prevenire" significa alleviare un sintomo della malattia a cui si fa riferimento.

[0024] Come utilizzata qui, la frase "una quantità efficace" significa una quantità efficace per prevenire e/o trattare un paziente a rischio di sviluppare o a cui è stata diagnosticata la malattia a cui si fa riferimento, e producendo così l'effetto terapeutico desiderato.

[0025] Come utilizzato qui, il termine "paziente" significa un mammifero (per esempio, un essere umano).

[0026] Come utilizzata qui, la frase "disturbo da accumulo lisosomiale" si riferisce a qualsiasi di un gruppo di malattie che derivano

da metabolismo anormale che determina l'accumulo di un substrato nel lisosoma. La Tabella 1 contiene un elenco non limitante di disturbi da accumulo lisosomiale esemplari e del loro enzima deficitario associato.

TABELLA 1 Disturbi da accumulo lisosomiale

<u>Disturbi da accumulo lisosomiale</u>	<u>Enzima alterato</u>
Malattia di Pompe	α -Glucosidasi acida
Malattia di Gaucher	β -Glucosidasi acida o glucocerebrosidasi
Malattia di Fabry	α -Galattosidasi A
G _{M1} -gangliosidosi	β -Galattosidasi acida
Malattia di Tay-Sachs	β -Esosaminidasi A
Malattia di Sandhoff	β -Esosaminidasi B
Malattia di Niemann-Pick	Sfingomielinasi acida
Malattia di Krabbe	Galattocerebrosidasi
Malattia di Farber	Ceramidasi acida
Leucodistrofia metacromatica	Arilsulfatasi A
Sindrome di Hurler-Scheie	α -L-Iduronidasi
Sindrome di Hunter	Iduronato-2-solfatasi
Sindrome di Sanfilippo A	Eparan N-solfatasi
Sindrome di Sanfilippo B	α -N-Acetilglucosaminidasi
Sindrome di Sanfilippo C	Acetil-CoA: α -glucosaminide N-acetiltransferasi
Sindrome di Sanfilippo D	N-Acetilglucosammmina-6- solfato solfatasi

Sindrome di Morquio A	N-Acetilgalattosammina-6-solfato solfatasi
Sindrome di Morquio B	β -Galattosidasi acida
Sindrome di Maroteaux-Lamy	Arilsolfatasi B
Malattia di Sly	β -Glucuronidasi
Alfa-mannosidosi	α -Mannosidasi acida
Beta-mannosidosi acida	β -Mannosidasi
Fucosidosi	α -L-Fucosidasi acida
Sialidosi	Sialidasi
Malattia di Schindler-Kanzaki	α -N-acetilgalattosaminidasi

[0027] Il disturbo da accumulo lisosomiale più comune, la malattia di Gaucher, è caratterizzato dall'accumulo del glicolipide glucocerebroside (noto anche come glucosilceramide). Sono stati descritti tre fenotipi per la malattia di Gaucher che sono caratterizzati dall'assenza (tipo 1) o dalla presenza di implicazioni neurologiche durante l'infanzia (tipo 2) o l'adolescenza (tipo 3). Per esempio, si veda Grabowski, Gaucher's disease. *Adv Hum Genet* 1993; 21:377-441.

[0028] I tre tipi di malattia di Gaucher sono ereditari in modo autosomico recessivo. Affinché che un bambino risulti affetto, entrambi i genitori devono essere portatori. Se entrambi i genitori sono portatori, vi è una possibilità di un bambino affetto di una su quattro, o del 25%, per ciascuna gravidanza. Si raccomandano consulenze genetiche ed esami genetici per le famiglie che possono essere portatrici di mutazioni. Ciascun tipo è stato collegato a mutazioni particolari. In tutto, vi sono

circa 80 mutazioni note che determinano la malattia di Gaucher (si veda, per esempio, McKusick, V.A.: Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Baltimora: Johns Hopkins University Press, 1998 (12^a edizione)).

[0029] La malattia di Gaucher di Tipo 1 è pan-etnica, ma è specialmente prevalente tra persone di discendenza ebrea askenazita, con una frequenza di portatori di 1 su 17 ebrei askenaziti. Le mutazioni N370S e 84GG sono le mutazioni più frequenti nel gene della glucocerebrosidasi tra gli ebrei askenaziti, con tassi di 1 su 17,5 per N370S e di 1 su 400 per 84GG nella popolazione generale askenazita sana, ed esse sono rispettivamente associate a malattia di Gaucher lieve e grave. La mutazione 84GG si presenta quasi esclusivamente tra gli ebrei askenaziti. Altre varianti rare del gene della glucocerebrosidasi identificate in pazienti di discendenza askenazita con malattia di Gaucher includono L444P, IVS2+1G→A, V394L e R496H. Diversamente dal quadro clinico della malattia di Gaucher di Tipo 1 negli ebrei askenaziti, la malattia di Gaucher di tipo 1 tende ad essere grave e progressiva nei pazienti giapponesi (si veda Ida et al., Type 1 Gaucher Disease Patients: Phenotypic Expression and Natural History in Japanese Patients, Blood Cells, Molecules and Diseases, 1984, 24(5):73-81). Inoltre, la malattia di Gaucher di Tipo 3, associata ad una o due copie della variante L444P del gene della glucocerebrosidasi è prevalente in pazienti svedesi dalla regione Norrbotten.

[0030] Una diagnosi definitiva di malattia di Gaucher viene realizzata mediante test genetici. Poiché vi sono numerose diverse mutazioni, talvolta è necessario il sequenziamento del gene glucocerebrosidasi per confermare la diagnosi. È disponibile la diagnosi prenatale, ed essa è utile quando vi è un fattore di rischio genetico noto. Tuttavia, una diagnosi di malattia di Gaucher può risultare anche da anomalie biochimiche, come livelli elevati di fosfatasi alcalina, di enzima per la conversione dell'angiotensina (ACE) e di immunoglobuline, o da analisi di cellule che mostrano citoplasma "a carta raggrinzita" e macrofagi carichi di glicolipidi. Da notare, la malattia di Niemann-Pick è simile per il fatto da essere caratterizzata da un accumulo di G_{M2}-gangliosidi e G_{M1}-gangliosidi oltre che di glucocerebrosidi (Vanier et al., Brain Pathology. 1998; 8: 163-74).

[0031] I sintomi della malattia di Gaucher includono i seguenti:

- Epatomegalia e splenomegalia indolore (la dimensione della milza può essere di 1500-3000 ml, contro la dimensione normale di 50-200 ml)
- Ipersplenismo: rapida e prematura distruzione delle cellule del sangue, che determina anemia, neutropenia e trombocitopenia (con un aumento del rischio di infezione ed emorragia)
- Cirrosi del fegato, sebbene rara
- I sintomi neurologici avvengono solamente in alcuni tipi di malattia di Gaucher (si veda sotto):
 - Tipo II: convulsioni gravi, ipertonia, ritardo mentale, apnea.

- Tipo III: spasmi muscolari noti come mioclono, convulsioni, demenza, aprassia del muscolo oculare.

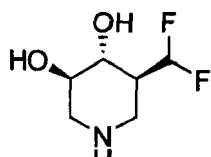
- Osteoporosi: il 75% sviluppa anomalità ossee visibili dovute alla glucosilceramide accumulata. Viene comunemente scritta una deformità nel femore distale dalla forma di fiasca Erlenmeyer.

- Pigmentazione della pelle giallastra-bruna.

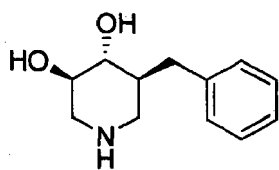
Composti

[0032] Vengono forniti sotto i nuovi composti della presente

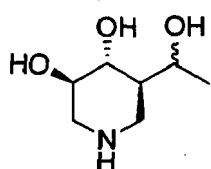
invenzione:



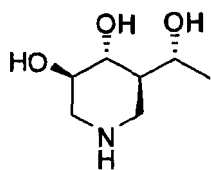
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo



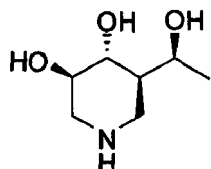
(3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo



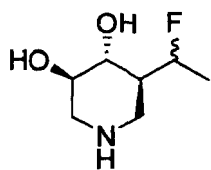
(3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)piperidin-3,4-diolo



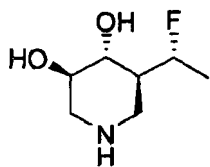
(3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)piperidin-3,4-diolo (stereoisomero A)



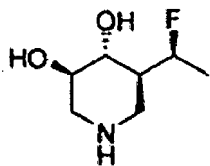
(3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)piperidin-3,4-diolo (stereoisomero B)



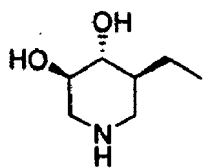
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo



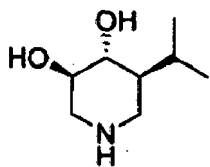
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diol (stereoisomero A)



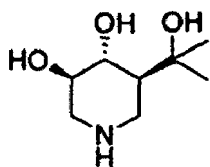
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diol (stereoisomero B)



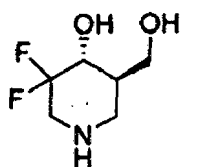
(3R,4R,5S)-5-etilpiperidin-3,4-diolo



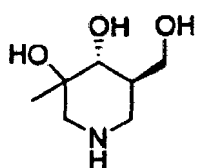
(3R,4R,5S)-5-isopropilpiperidin-3,4-diolo



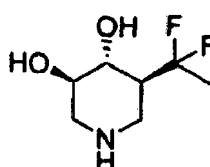
(3R,4R,5S)-5-(2-idrossipropan-2-il)piperidin-3,4-diolo



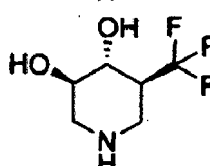
(4R,5R)-3,3-difluoro-5-(idrossimetil)piperidin-4-olo



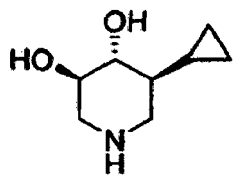
(4R,5R)-5-(idrossimetil)-3-metilpiperidin-3,4-diolo



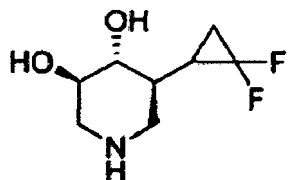
(3R,4R,5S)-5-(1,1-difluoroetil)piperidin-3,4-diolo



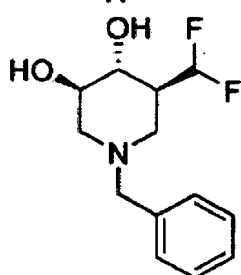
(3R,4R,5S)-5-(trifluorometil)piperidin-3,4-diolo



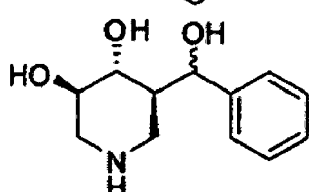
(3R,4R,5S)-5-ciclopropilpiperidin-3,4-diolo



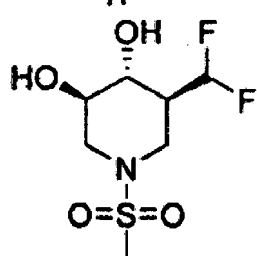
(3R,4R,5S)-5-(2,2-difluorociclopropil)piperidin-3,4-diolo



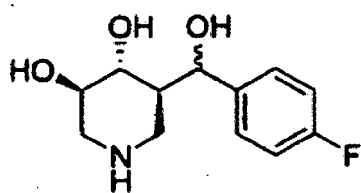
(3R,4R,5S)-1-benzil-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo



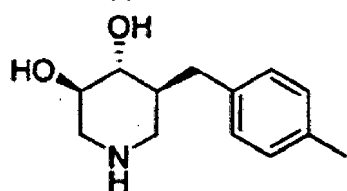
(3R,4R,5R)-5-((S)-idrossi(fenil)metil)piperidin-3,4-diolo



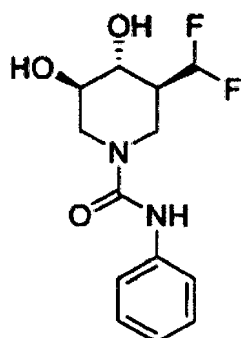
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-1-(metilsolfonil)piperidin-3,4-diolo



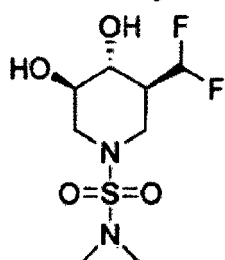
(3R,4R,5R)-5-((4-fluorofenil)(idrossi)metil)piperidin-3,4-diolo



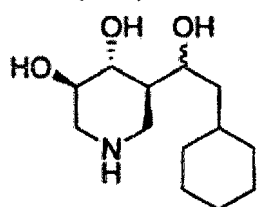
(3R,4R,5S)-5-(4-metilbenzil)piperidin-3,4-diolo



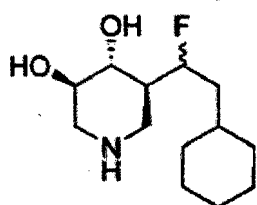
(3S,4R,5R)-3-(difluorometil)-4,5-diidrossi-N-fenilpiperidin-1-carbossammide



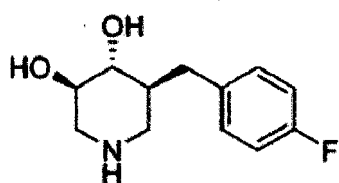
(3S,4R,5R)-3-(difluorometil)-4,5-diidrossi-N,N-dimetilpiperidin-1-solfonammide



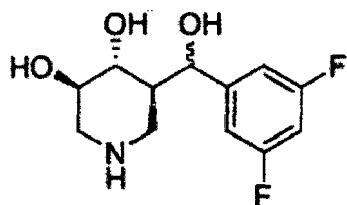
(3R,4R,5R)-5-(2-cicloesil-1-idrossietil)piperidin-3,4-diolo



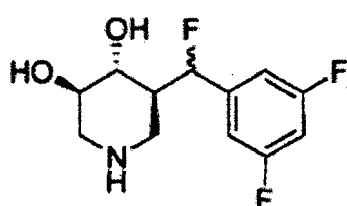
(3R,4R,5S)-5-(2-cicloesil-1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo



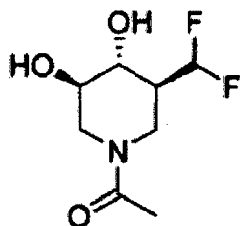
(3R,4R,5S)-5-(4-fluorobenzil)piperidin-3,4-diolo



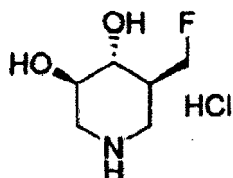
(3R,4R,5R)-5-((3,5-difluorofenil)(idrossi)metil)piperidin-3,4-diolo



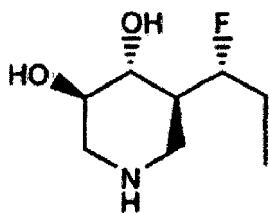
(3R,4R,5S)-5-((3,5-difluorofenil)fluorometil)piperidin-3,4-diolo



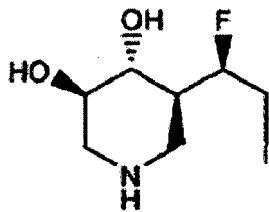
1-((3S,4R,5R)-3-(difluorometil)-4,5-diidrossipiperidin-1-il)etanone



(3R,4R,5S)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diolo cloridrato



(3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato

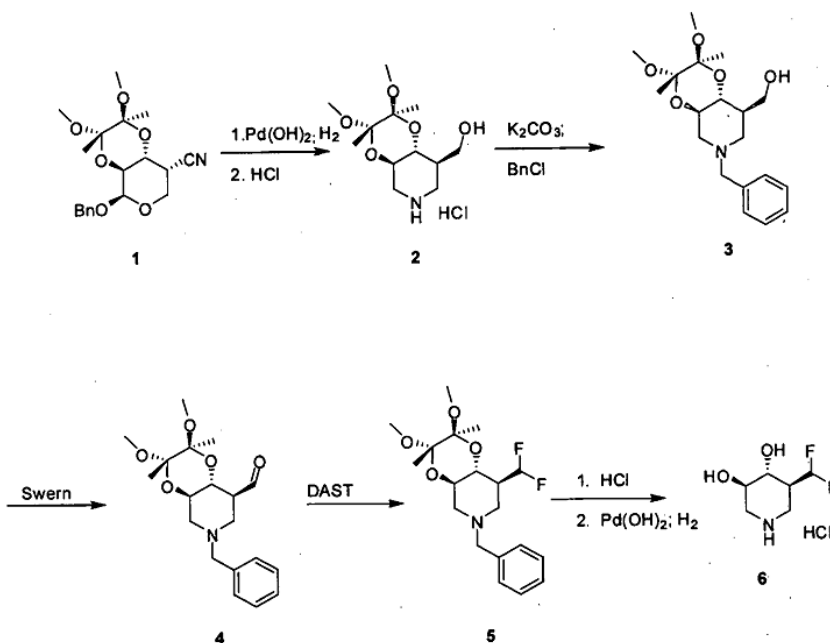


(3R,4R,5S)-5-((S)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato

Processo chimico

[0033] Le composizioni della presente invenzione possono essere realizzate in accordo con uno o più dei seguenti schemi:

Schema di processo 1



[0034] ((2S,3S,4aR,8R,8aR)-2,3-Dimetossi-2,3-

dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridin-8-il)metanolo cloridrato

(2). Una soluzione di 1 (20,0 g, 55,0 mmol) in MeOH (500 mL) è stata combinata con Pd(OH)₂ (4-6 g) e formato di ammonio (14 g, 220 mmol) e la miscela è stata riscaldata a 50-55° C. Ulteriori quantità (3x100,0 mmol) di formato di ammonio sono state aggiunte nelle successive 8 h. Dopo l'aggiunta finale, la miscela di reazione è stata ulteriormente agitata e riscaldata per altre 16 h a 50-55° C. Il catalizzatore è stato eliminato per filtrazione e il filtrato è stato evaporato sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato disciolto in acetone (150 mL), filtrato, ed è stato aggiunto HCl in 2-PrOH. Dopo semina e quindi raffreddamento in un bagnetto ghiacciato, il prodotto è stato raccolto come solido bianco cristallino (11,0 g, 71%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 9.45 (s, 2H), 4.80 (t, 1H,

ex), 3.85 (m, 1H), 3.0-3.75 (m, 11 H), 2.8 (q, 2H), 1.95 (m, 1H), 1.2 (2, 6H).

[0035] ((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Benzil-2,3-dimetossi-2,3-dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridin-8-il)metanolo (3). Ad una soluzione di **2** (14,85 g, 50,0 mmol) in DMF (200 mL) è stato aggiunto K_2CO_3 (17,25 g, 125 mmol) e la miscela è stata agitata a 40° C per circa 4 h. A questo punto, è stato aggiunto BnCl (5,7 mL, 50,0 mmol) in una porzione e la reazione è stata agitata a 40° C per una notte. Il solvente è stato evaporato sotto vuoto e il residuo è stato sospeso in acqua (600 mL) ed è stato aggiunto HCl per disciogliere il residuo. La soluzione è stata lavata con Et_2O e quindi basificata con Na_2CO_3 . La soluzione è stata estratta con EtOAc (2x) e gli estratti combinati sono stati lavati con acqua e quindi salamoia e sono stati quindi essiccati su $MgSO_4$. La soluzione è stata filtrata e il filtrato è stato evaporato sotto vuoto a dare il composto del titolo (17,2 g, >95%) come olio viscoso da incolore a giallo molto pallido che è stato utilizzato senza ulteriore purificazione. 1H NMR ($CDCl_3$) 7.3 (m, 5H), 3.6-3.8 (m, 2H), 3.5 (s, 3H), 3.4 (t, 1 H), 3.26 (s, 3H), 3.268 (s, 3H), 2.9 (m, 2H), 2.2 (br s, 1 H), 2.05 (m, 1 H), 1.85 (t, 1H), 1.28 (s, 3H), 1.26 (s, 3H).

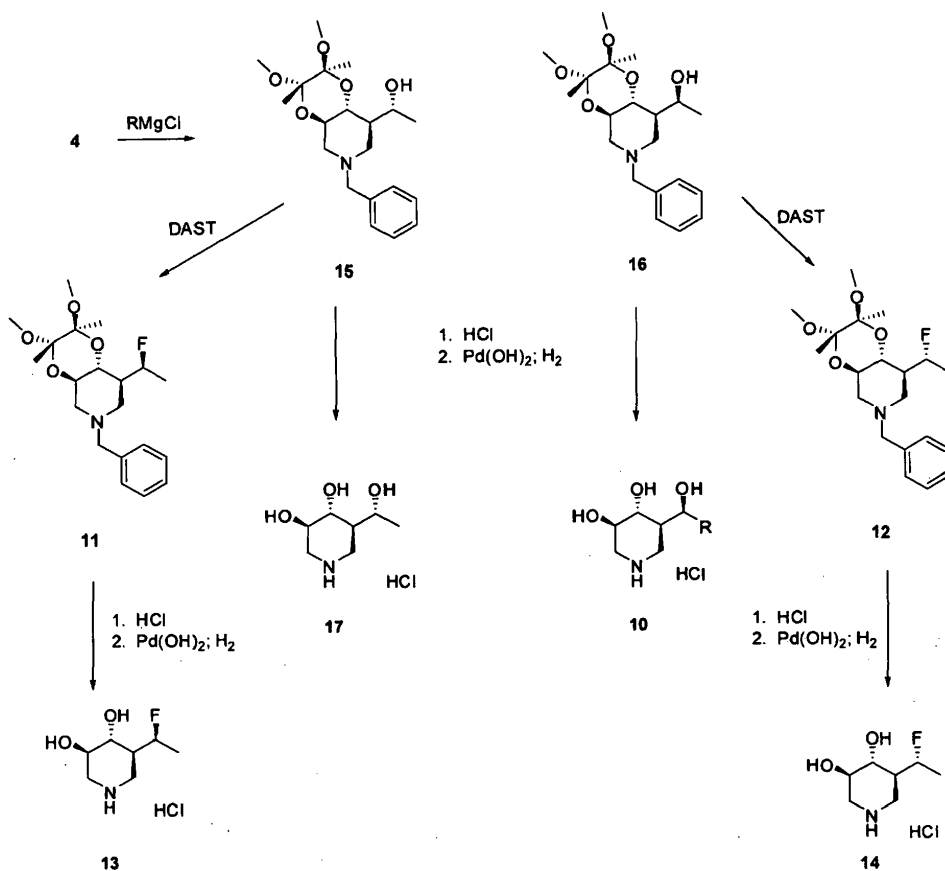
[0036] ((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Benzil-2,3-dimetossi-2,3-dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridin-8-il)carbossaldeide (Procedura Generale A) (4). Ad una soluzione di DMSO (7,3 g, 96,9 mmol) in CH_2Cl_2 (150 mL) raffreddata a -78° C è stata aggiunta una soluzione di ossalil cloruro (6,1 mL, 72,8 mmol) in CH_2Cl_2 goccia a

goccia. Dopo aver completato l'aggiunta, la miscela di reazione è stata agitata per altri 30 min e a quel punto è stata aggiunta una soluzione di 3 (17,0 g, 48,4 mmol) in CH₂Cl₂ goccia a goccia. Dopo che l'aggiunta è stata completata, la reazione è stata agitata per 1 h a -78° C e quindi è stata aggiunta diisopropiletilammina (34,4 mL, 193 mmol) goccia a goccia. Dopo aver completato questa aggiunta, il bagnetto di raffreddamento è stato rimosso e la miscela di reazione è stata lasciata riscaldare fino a 0° C quando è stato aggiunto NaHCO₃ saturo. La miscela è stata diluita con una quantità di CH₂Cl₂ e quindi lo strato organico è stato separato ed essiccato su MgSO₄. In seguito a filtrazione, il solvente è stato evaporato sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (Es/EtOAc) a dare il composto del titolo (12,7 g, 75%) come olio viscoso. ¹H NMR (CDCl₃) 9.73 (s, 1H), 7.2 (m, 5H), 3.75 (m, 2H), 3.5 (q, 2H), 3.2 (2s, 6H), 2.7-3.0 (m, 3H), 2.05 (m, 2H), 1.25 (2s, 6H).

[0037] ((2S,3S,4aR,8S,8aR)-6-Benzil-8,8-difluorometil-2,3-dimetossi-2,3-dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridina cloridrato (Procedura Generale B) (5). Ad una soluzione di DAST (1,4 mL, 10,3 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) raffreddata a -15° C è stata aggiunta una soluzione di 4 (2,4 g, 6,9 mmol) goccia a goccia. Dopo 10 minuti, il bagnetto ghiacciato è stato rimosso e la reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. A questo punto la miscela di reazione è stata nuovamente raffreddata in un bagnetto ghiacciato e la reazione è stata spenta con aggiunta di NaHCO₃ saturo (inizialmente

goccia a goccia poiché questo produce un composto leggermente esotermico). Lo strato organico è stato separato ed essiccato su Na_2SO_4 , filtrato, e il solvente è stato evaporato sotto vuoto a dare un olio giallo. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (Es/EtOAc) a dare il composto del titolo (1,6 g, 62%) come olio incolore. ^1H NMR (CDCl_3) 7.2 (m, 5H), 6.0 (dt, 1H), 3.75 (m, 1 H), 3.55 (m, 3H), 3.2 (2s, 6H), 2.95 (m, 1 H), 2.85 (m, 1 H), 2.3 (m, 2H), 1.5 (br s, 1 H), 1.2 (2s, 6H).

[0038] (3R,4R, 5S)-5-(Difluorometil)piperidin 3,4-diolo Cloridrato (Procedura Generale C) (6). Il composto 5 (1,6 g, 4,3 mmol) è stato riscaldato a refluxo in una miscela di EtOH/ H_2O /HCl (40 mL/40 mL/5 mL) e la reazione è stata monitorata mediante HPLC finché non si potesse più rilevare il materiale di partenza. Il solvente è stato evaporato sotto vuoto e quindi co-evaporato 2x con EtOH. Il residuo è stato disciolto in MeOH e idrogenato su $\text{Pd}(\text{OH})_2$. Quando completo, il catalizzatore è stato eliminato per filtrazione e il filtrato è stato evaporato sotto vuoto. Il residuo è stato ricristallizzato da EtOH (50 mL) al composto del titolo (0,55 g, 66%) come solido bianco (pf 168-170° C). ^1H NMR (D_2O) 6.15 (dt, 1 H), 4.3-4.8 (m, 2H), 3.0 (t, 1 H), 2.85 (t, 1 H), 2.3 (m, 1 H).



[0039] (R)e(S)-1-((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Benzil-2,3-

dimetossi-2,3-dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridin-8-il)etanolo

Procedura Generale D(15/16). Ad una soluzione di 4 (7,0 g, 20,0 mmol) in THF anidro (100 mL) è stato aggiunto MeMgBr (20,0 mL, 1,4 M in THF/toluene 3:1) e la reazione è stata agitata per una notte a temperatura ambiente. La reazione è stata spenta con NH₄Cl saturo e la miscela è stata estratta con EtOAc (2x). Gli estratti combinati sono stati lavati con salamoia, essiccati su Na₂SO₄ e il filtrato è stato evaporato sotto vuoto. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (esano/2-PrOH) a dare l'isomero principale (15) (1,6 g, 24,6%).¹H NMR (CDCl₃) 7.3 (m, 5H), 4.15 (m,

1H), 3.5-3.9 (m, 3H), 3.3 (2s, 6H), 2.85 (m, 2H), 2.0 (2m, 4H), 1.3 (2s, 6H), 1.2 (d, 3H). È stato isolato anche l'isomero specchio (16) (0,55 g, 7,5%) 7.3 (m, 5H), 3.75 (m, 2H), 3.5 (m, 2H), 3.2 (2s, 6H), 2.8 (m, 2H), 2.0 (t, 1 H), 1.75 (m, 2H), 1.2 (2s, 6H), 1.0 (d, 3H).

[0040] (3R,4R,5R)-5((R)-1-Idrossietil)piperidin 3,4-diolo (17).

Il composto 15 (0,55 g, 1,5 mmol) è stato agitato in una miscela di TFA:H₂O 9/1 (20 mL) finché non si potesse più rilevare il materiale di partenza mediante HPLC. I volatili sono stati eliminati e il residuo è stato co-evaporato 2-3x con EtOH e quindi disciolto in EtOH e trattato con K₂CO₃ solido. In seguito a filtrazione del solido, il filtrato è stato evaporato sotto vuoto, e il residuo è stato convertito in un sale HCl e idrogenato su Pd(OH)₂. Il catalizzatore è stato filtrato e il filtrato è stato evaporato sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato utilizzando una resina a scambio ionico (Dowex 50WX8-200) eluendo con NH₄OH 0,1 N. Le frazioni appropriate sono state combinate e liofilizzate a dare il composto del titolo (0,12 g, 50%). ¹H NMR (D₂O) 4.2 (q, 1 H), 3.65 (m, 1 H), 3.45 (m, 3H), 2.8 (m, 2H), 1.65 (m, 1H), 1.15 (d, 3H).

[0041] (3R,4R, 5R)-5((S)-1-Idrossietil)piperidin 3,4-diolo (10).

Il composto 16 (0,34 g, 0,93 mmol) è stato deprotetto come descritto sopra a dare il composto del titolo (0,11 g, 75%). ¹H NMR (D₂O) 4.15 (m, 2H), 3.5 (m, 1 H), 3.35 (t, 1 H), 3.15 (m, 2H), 1.8 (m, 1 H), 1.1 (d, 3H).

[0042] ((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Benzil-8(S)-(1fluoroetil)-2,3-dimetossi-2,3-dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridina (11). Il

composto 15 (1,8 g, 5,0 mmol) è stato fluorurato utilizzando la Procedura Generale B. La cromatografia su gel di silice (Es/EtOAc) ha dato il composto del titolo (0,42 g, 23%). ¹H NMR (CDCl₃) 7.25 (m, 5H), 4.7-4.9 (dq, 1H), 3.75 (m, 2H), 3.4 (m, 2H), 3.2 (2s, 6H), 2.8 (m, 2H), 2.0 (m, 3H), 1.35 (dd, 3H), 1.2 (2s, 6H).

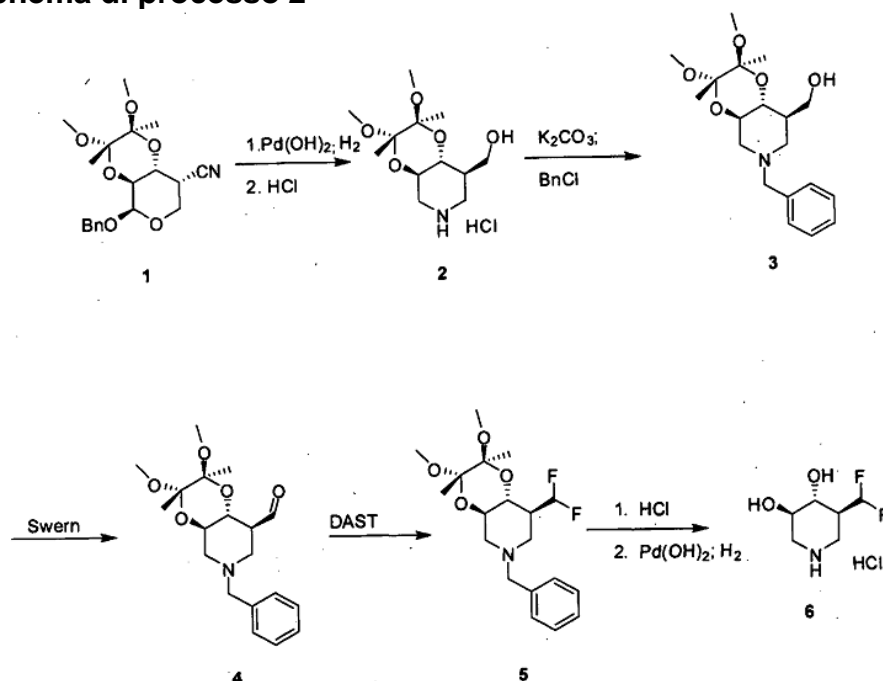
[0043] (3R,4R, 5R)-5((S)-1-Fluoroetil)piperidin 3,4-diolo Cloridrato (13). Il composto 11 (0,42 g, 1,14 mmol) è stato deprotetto come descritto nella Procedura Generale C. Dopo che il catalizzatore è stato rimosso, il filtrato è stato evaporato sotto vuoto e quindi co-evaporato con EtOH (2x). Il residuo risultante è stato triturato con acetone a dare il composto del titolo (0,20 g, 88%) come solido bianco. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 9.0 (br s, 2H), 5.6 (d, 1H, ex), 5.4 (d, 1 H, ex), 5.0-5.2 (dq, 1 H), 3.55 (m, 1 H), 3.2 (m, 2H), 2.9 (t, 1 H), 2.7 (t, 1 H), 2.2 (m, 1 H), 1.3 (dd, 3H).

[0044] ((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Benzil-8(R)-(1fluoroetil)-2,3-dimetossi-2,3-dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridina (12). Il composto 16 (0,55 g, 1,5 mmol) è stato fluorurato utilizzando la Procedura Generale B a dare il composto del titolo (0,22 g, 40%). ¹H NMR (CDCl₃) 7.3 (m, 5H), 5.0 (dq, 1 H), 3.8 (m, 1 H), 3.5-3.75 (m, 3H), 3.3 (2s, 6H), 3.0 (d, 1 H), 2.9 (m, 1 H), 2.1 (m, 2H), 1.85 (m, 1H), 1.3 (2s, 6H).

[0045] (3R,4R,5R)-5((R)-(1-Fluoroetil)piperidin 3,4-diolo Cloridrato (14). Il composto 12 (0,22 g, 0,6 mmol) è stato deprotetto come descritto nella Procedura Generale C. Dopo che il catalizzatore è

stato rimosso, il filtrato è stato evaporato sotto vuoto e quindi co-evaporato con EtOH (2x). Il residuo risultante è stato triturato con acetone a dare il composto del titolo (0,08 g, 67%) come solido bianco. $^1\text{H NMR}$ (D_2O) 5.1 (dq, 1 H), 3.5 (m, 4H), 2.8 (m, 2H), 1.8 (m, 1H), 1.3 (dd, 3H).

Schema di processo 2



[0046]

((2S,3S,4aR,8R,8aR)-2,3-Dimetossi-2,3-

dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridin-8-il)metanolo

cloridrato(2). Una soluzione di 1 (20,0 g, 55,0 mmol) in MeOH (500 mL) è stata combinata con $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (4-6 g) e formato di ammonio (14 g, 220 mmol) e la miscela è stata riscaldata a 50-55° C. Ulteriori quantità (3x100,0 mmol) di formato di ammonio sono state aggiunte nelle successive 8 h. Dopo l'aggiunta finale, la miscela di reazione è stata ulteriormente agitata e riscaldata per altre 16 h a 50-55° C. Il

catalizzatore è stato eliminato per filtrazione e il filtrato è stato evaporato sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato disciolto in acetone (150 mL), filtrato, ed è stato aggiunto HCl in 2-PrOH. Dopo semina e quindi raffreddamento in un bagnetto ghiacciato, il prodotto è stato raccolto come solido bianco cristallino (11,0 g, 71%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 9.45 (s, 2H), 4.80 (t, 1 H, ex), 3.85 (m, 1 H), 3.0-3.75 (m, 11 H), 2.8 (q, 2H), 1.95 (m, 1 H), 1.2 (2, 6H).

[0047] ((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Benzil-2,3-dimetossi-2,3-dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridin-8-il)metanolo (3). Ad una soluzione di **2** (14,85 g, 50,0 mmol) in DMF (200 mL) è stato aggiunto K₂CO₃ (17,25 g, 125 mmol) e la miscela è stata agitata a 40° C per circa 4 h. A questo punto, è stato aggiunto BnCl (5,7 mL, 50,0 mmol) in una porzione e la reazione è stata agitata a 40° C per una notte. Il solvente è stato evaporato sotto vuoto e il residuo è stato sospeso in acqua (600 mL) ed è stato aggiunto HCl per disciogliere il residuo. La soluzione è stata lavata con Et₂O e quindi basificata con Na₂CO₃. La soluzione è stata estratta con EtOAc (2x) e gli estratti combinati sono stati lavati con acqua e quindi salamoia e sono stati quindi essiccati su MgSO₄. La soluzione è stata filtrata e il filtrato è stato evaporato sotto vuoto a dare il composto del titolo (17,2 g, >95%) come olio viscoso da incolore a giallo molto pallido che è stato utilizzato senza ulteriore purificazione. ¹H NMR (CDCl₃) 7.3 (m, 5H), 3.6-3.8 (m, 2H), 3.5 (s, 3H), 3.4 (t, 1 H), 3.26 (s, 3H), 3.268 (s, 3H), 2.9 (m, 2H), 2.2 (br s, 1 H), 2.05 (m, 1 H), 1.85 (t, 1 H), 1.28 (s, 3H), 1.26 (s, 3H).

[0048] ((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Benzil-2,3-dimetossi-2,3-dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridin-8-il)carbossaldeide

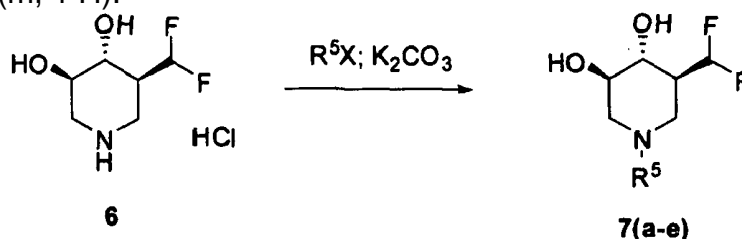
(Procedura Generale A) (4). Ad una soluzione di DMSO (7,3 g, 96,9 mmol) in CH₂Cl₂ (150 mL) raffreddata a -78° C è stata aggiunta una soluzione di ossalil cloruro (6,1 mL, 72,8 mmol) in CH₂Cl₂ goccia a goccia. Dopo aver completato l'aggiunta, la miscela di reazione è stata agitata per altri 30 min e a quel punto è stata aggiunta una soluzione di **3** (17,0 g, 48,4 mmol) in CH₂Cl₂ goccia a goccia. Dopo che l'aggiunta è stata completata, la reazione è stata agitata per 1 h a -78° C e quindi è stata aggiunta diisopropiltilammina (34,4 mL, 193 mmol) goccia a goccia. Dopo che questa aggiunta è stata completata, il bagnetto di raffreddamento è stato rimosso e la miscela di reazione è stata lasciata riscaldare fino a 0° C, quando è stato aggiunto NaHCO₃ saturo. La miscela è stata diluita con una quantità di CH₂Cl₂ e quindi lo strato organico è stato separato ed essiccato su MgSO₄. In seguito a filtrazione, il solvente è stato evaporato sotto vuoto e il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (Es/EtOAc) a dare il composto del titolo (12,7 g, 75%) come olio viscoso. ¹H NMR (CDCl₃) 9.73 (s, 1 H), 7.2 (m, 5H), 3.75 (m, 2H), 3.5 (q, 2H), 3.2 (2s, 6H), 2.7-3.0 (m, 3H), 2.05 (m, 2H), 1.25 (2s, 6H).

[0049] ((2S,3S,4aR,8S,8aR)-6-Benzil-8,8-difluorometil-2,3-dimetossi-2,3-dimetilottaidro-[1,4]diossino[2,3-c]piridina cloridrato
(Procedura Generale B) (5). Ad una soluzione di DAST (1,4 mL, 10,3 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) raffreddata a -15° C è stata aggiunta goccia a

goccia una soluzione di **4** (2,4 g, 6,9 mmol). Dopo 10 minuti, il bagnetto ghiacciato è stato rimosso e la reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. A questo punto la miscela di reazione è stata nuovamente raffreddata in un bagnetto ghiacciato e la reazione è stata spenta con l'aggiunta di NaHCO₃ saturo (goccia a goccia inizialmente poiché questo produce un composto leggermente esotermico). Lo strato organico è stato separato ed essiccato su Na₂SO₄, filtrato e il solvente è stato evaporato sotto vuoto a dare un olio giallo. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (Es/EtOAc) a dare il composto del titolo (1,6 g, 62%) come olio incolore. ¹H NMR (CDCl₃) 7.2 (m, 5H), 6.0 (dt, 1H), 3.75 (m, 1 H), 3.55 (m, 3H), 3.2 (2s, 6H), 2.95 (m, 1H), 2.85 (m, 1 H), 2.3 (m, 2H), 1.5 (br s, 1 H), 1.2 (2s, 6H).

[0050] (3R,4R,5S)-5-(Difluorometil)piperidin 3,4-diolo cloridrato (Procedura Generale C) (6). Il composto **5** (1,6 g, 4,3 mmol) è stato riscaldato a refluxo in una miscela di EtOH/H₂O/HCl (40 mL/40 mL/5 mL) e la reazione è stata monitorata mediante HPLC finché non si potesse più rilevare il materiale di partenza. Il solvente è stato evaporato sotto vuoto e quindi co-evaporato 2x con EtOH. Il residuo è stato disciolto in MeOH e idrogenato su Pd(OH)₂. Quando completo, il catalizzatore è stato eliminato per filtrazione e il filtrato è stato evaporato sotto vuoto. Il residuo è stato ricristallizzato da EtOH (50 mL) al composto del titolo (0,55 g, 66%) come solido bianco (pf 168-170°

C). ^1H NMR (D_2O) 6.15 (dt, 1 H), 4.3-4.8 (m, 2H), 3.0 (t, 1 H), 2.85 (t, 1 H), 2.3 (m, 1 H).



[0051] (3R,4R,5S)-1-Butil-5-(difluorometil)piperidin 3,4-diolo (Procedura Generale D) (7a; $\text{R}^5 = \text{Bu}$). Una miscela di **6** (0,30 g, 1,4 mmol), K_2CO_3 (0,48 g, 3,5 mmol) e BuBr (0,20 g, 1,4 mmol) è stata combinata in DMF (10 mL) e riscaldata per una notte a 60°C . Il solvente è stato evaporato sotto vuoto e il residuo è stato disciolto in EtOAc, lavato con acqua e quindi salamoia e essiccati su Na_2SO_4 . In seguito a filtrazione, il filtrato è stato evaporato sotto vuoto a dare il prodotto grezzo che è stato purificato mediante cromatografia ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/(9:1) \text{ MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$) a dare il composto del titolo (0,25 g, 80%) come sciroppo incolore. $\text{MH}^+ = 224$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 6.2 (t, 1H, $J = 57 \text{ Hz}$), 5.13 (d, 1H, ex), 4.91 (d, 1 H, ex), 3.3 (m, 1 H), 3.1 (m, 1 H), 2.9 (m, 2H), 2.3 (m, 2H), 1.95 (m, 2H), 1.75 (t, 1H), 1.2-1.5 (2m, 4H), 0.9 (t, 3H).

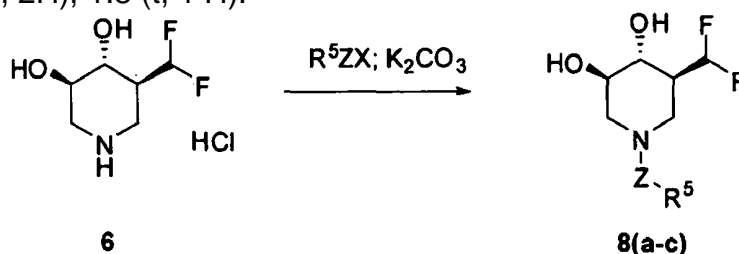
[0052] (3R,4R,5S)-1-Allil-5-(difluorometil)piperidin 3,4-diolo (7b; $\text{R}^5 = \text{allile}$). Seguendo la Procedura Generale D utilizzando allil bromuro (0,17 g, 1,4 mmol) il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco (0,22 g, 76%). $\text{MH}^+ = 208$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 6.2 (t, 1H, $J = 57 \text{ Hz}$), 5.8 (m, 1 H), 5.2 (m, 3H), 4.92 (d, 1 H), 3.3 (m, 1 H), 3.1 (1 H), 2.95 (d, 2H), 2.85 (d, 2H), 1.9 (br m, 2H), 1.75 (t, 1H).

[0053] (3R,4R,5S)-5-(Difluorometil)-1-(4-fluorobenzil)piperidin 3,4-diolo (7c; R⁵ = 4-fluorobenzile). Seguendo la Procedura Generale D con l'eccezione che la reazione è stata eseguita a temperatura ambiente ed utilizzando 4-fluorobenzil bromuro (0,26 g, 1,4 mmol) il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco (0,22 g, 56%). MH⁺ = 276. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 7.4 (m, 2H), 7.15 (m, 2H), 6.2 (t, 1H, *J* = 57 Hz), 5.2 (d, 1 H, ex), 4.9 (d, 1 H, ex), 3.5 (q, 2H), 3.3 (m, 1 H), 3.1 (m, 1 H), 2.8 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 1.8 (t, 1 H).

[0054] (3R,4R, 5S)-5-(Difluorometil)-1-(4-metilbenzil)piperidin 3,4-diolo (7d; R⁵ = 4-metilbenzile). Seguendo la Procedura Generale D con l'eccezione che la reazione è stata eseguita a temperatura ambiente ed utilizzando 4-metilbenzil bromuro (0,26 g, 1,4 mmol) il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco (0,30, 81%). MH⁺ = 272. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 7.2 (m, 4H), 6.2 (t, 1H, *J* = 57 Hz), 5.2 (d, 1 H, ex), 4.9 (d, 1 H, ex), 3.5 (q, 2H), 3.3 (1 H), 3.05 (m, 1 H), 2.8 (m, 2H), 2.5 (s, 3H), 1.95 (m, 2H), 1.8 (t, 1H).

[0055] (3R,4R,5S)-5-(Difluorometil)-1-(4-metossilbenzil)piperidin 3,4-diolo (7e; R⁵ = 4-metossilbenzile). Seguendo la Procedura Generale D con l'eccezione che la reazione è stata eseguita a temperatura ambiente ed utilizzando 4-metossilbenzil cloruro (0,26 g, 1,4 mmol) il composto del titolo è stato ottenuto come sciroppo incolore (0,19 g, 49%). MH⁺ = 288. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 7.3 (m, 1 H), 6.85 (m, 3H) 6.2 (t, 1 H, *J* = 57 Hz), 5.2 (d, 1H, ex), 4.9 (d, 1H,

ex), 3.75 (s, 3H), 3.5 (q, 2H), 3.4 (m, 1H), 3.1 (m, 1 H), 2.85(m, 2H), 1.95 (m, 2H), 1.8 (t, 1 H).



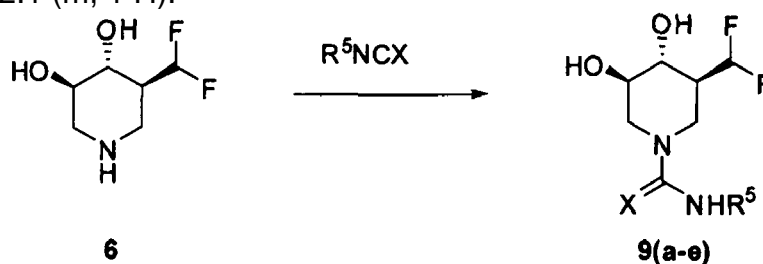
[0056] 1-((3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-diidrossipiperidin-1-il)pentan-1-one (8a; Z = CO; R⁵ = butile).

Seguendo la Procedura Generale D, con l'eccezione che la reazione è stata eseguita a temperatura ambiente ed utilizzando pentanoil cloruro (0,17 g, 1,4 mmol), il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco (0,26 g, 71%). MH⁺ = 252. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 5.9-6.5 (dt, 1 H), 5.35 (m, 1 H, ex), 5.25 (m, 1 H), ex), 4.2 (dd, 1 H), 3.75 (dd, 1 H), 3.35 (m, 2H), 3.1 (m, 1H), 2.85 (m, 1H), 2.3 (t, 2H), 1.9 br m, 1H), 1.4 (m, 2H), 1.25 (m, 2H), 0.85 (t, 3H).

[0057] (3R,4R,5S)-5-(Difluorometil)-1-(metansolfonil)piperidin 3,4-diolo (8b; Z = SO₂; R⁵ = Me)

Seguendo la Procedura Generale D con l'eccezione che la reazione è stata eseguita a temperatura ambiente ed utilizzando metansolfonil cloruro (0,16 g, 1,4 mmol), il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco (0,17 g, 51%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 6.2 (t, 1 H, *J* = 53 Hz), 5.43 (d, 1 H, ex), 5.38 (d, 1H, ex), 3.2-3.7 (m, 4H), 2.95 (s, 3H), 2.85 (m, 1 H), 2.7 (t, 1H), 2.1 (br s, 1H). **(3R,4R, 5S)-5-(Difluorometil)-1-tosilpiperidin 3,4-diolo (8b; Z = SO₂; R⁵ = Ph)**

Generale D con l'eccezione che la reazione è stata eseguita a temperatura ambiente ed utilizzando toluensolfonil cloruro (0,26, 1,4 mmol), il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco (0,35 g, 67%). ^1H NMR (DMSO- d_6) 7.6 (d, 2H), 7.45 (d, 2H), 6.25 (t, 1 H, $J = 53$ Hz), 5.4 (2d, 2H, ex), 3.3-3.55 (m, 4H), 3.2 (m, 1H), 2.5 (m, 3H), 2.4 (t, 1H), 2.1 (m, 1 H).



[0058] (3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-diidrossi-N-propilpiperidin-1-carbossammide (Procedura Generale E) (9a; X = O; R⁵ = propile). Ad una soluzione di **6** (base libera) (0,29 g, 1,2 mmol) in DMF anidro (5 mL), è stato aggiunto propil isocianato (0,10 g, 1,2 mmol) e la reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. Il solvente è stato evaporato sotto vuoto e il residuo è stato purificato mediante cromatografia (CH₂Cl₂/ MeOH) a dare il composto del titolo come solido bianco (0,14 g, 48%). $\text{MH}^+ = 253$. ^1H NMR (DMSO- d_6) 6.7 (t, 1 H), 6.22 (t, 1H, $J = 53$ Hz), 5.25 (d, 1 H, ex), 5.15 (d, 1H, ex), 4.05 (d, 1 H), 3.9 (d, 1 H), 3.3 (m, 2H), 3.0 (q, 2H), 2.5 (m, 1 H), 1.8 (br d, 1 H), 1.4 (m, 2H), 0.85 (t, 3H).

[0059] (3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-diidrossi-N-fenilpiperidin-1-carbossammide (9b; X = O; R⁵ = fenile). Seguendo la Procedura Generale E ed utilizzando fenil isocianato (0,14 g, 1,2

mmol) il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco (0,21 g, 62%). $MH^+ = 287$. 1H NMR (DMSO- d_6) 8.7 (s, 1 H), 7.45 (d, 2H), 7.3 (t, 2H), 6.95 (t, 1H), 6.3 (t, 1H, $J = 53$ Hz), 5.35 (d, 1 H), 5.25 (d, 1 H), 4.1 (t, 2H), 3.3 (m, 2H), 2.85 (t, 1 H), 2.75 (t, 1 H), 1.95 (br d, 1H).

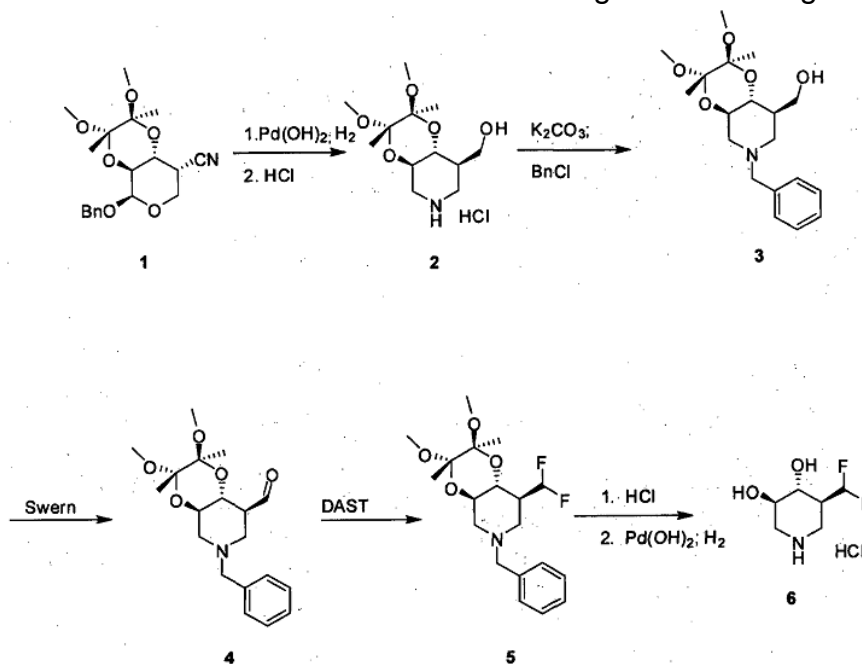
[0060] (3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-diidrossi-N-butilpiperidin-1-carbossammide (9c; X = O; R⁵ = butile). Seguendo la Procedura Generale E ed utilizzando butil isocianato (0,12 g, 1,2 mmol) il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco (0,24 g, 76%). $MH^+ = 267$. 1H NMR (DMSO- d_6) 6.6 (t, 1H), 6.2 (t, 1H, $J = 53$ Hz), 5.25 (d, 1 H), 5.1 (d, 1 H), 4.05 (d, 1 H), 3.9 (d, 1 H), 3.35 (m, 2H), 3.05 (q, 2H), 2.65 (t, 1H), 2.45 (m, 1H), 1.8 (brd, 1H), 1.2-1.4 (2m, 4H), 0.85 (t, 3H).

[0061] (3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-diidrossi-N-butilpiperidin-1-carbotioammide (9d; X = S; R⁵ = butile). Seguendo la Procedura Generale E ed utilizzando butil isotiocianato (0,14 g, 1,2 mmol) il composto del titolo è stato ottenuto come sciroppo incolore (0,21 g, 63%). $MH^+ = 283$. 1H NMR (DMSO- d_6) 7.85 (t, 1H), 6.25 (t, 1 H), 5.35 (2d, 2H), 4.8 (d, 1 H), 4.45 (d, 1 H), 3.45 (m, 2H), 3.25 (m, 1H), 3.05 (t, 1 H), 2.8 (t, 1 H), 1.85 (br d, 1 H), 1.4 (m, 2H), 1.35 (m, 2H), 1.1 (m, 1 H), 0.95 (t, 3H).

[0062] (3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-diidrossi-N-fenilpiperidin-1-carbotioammide (9e; X = S; R⁵ = fenile). Seguendo la Procedura Generale E ed utilizzando fenil isotiocianato (0,16 g, 1,2 mmol) il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco (0,31 g,

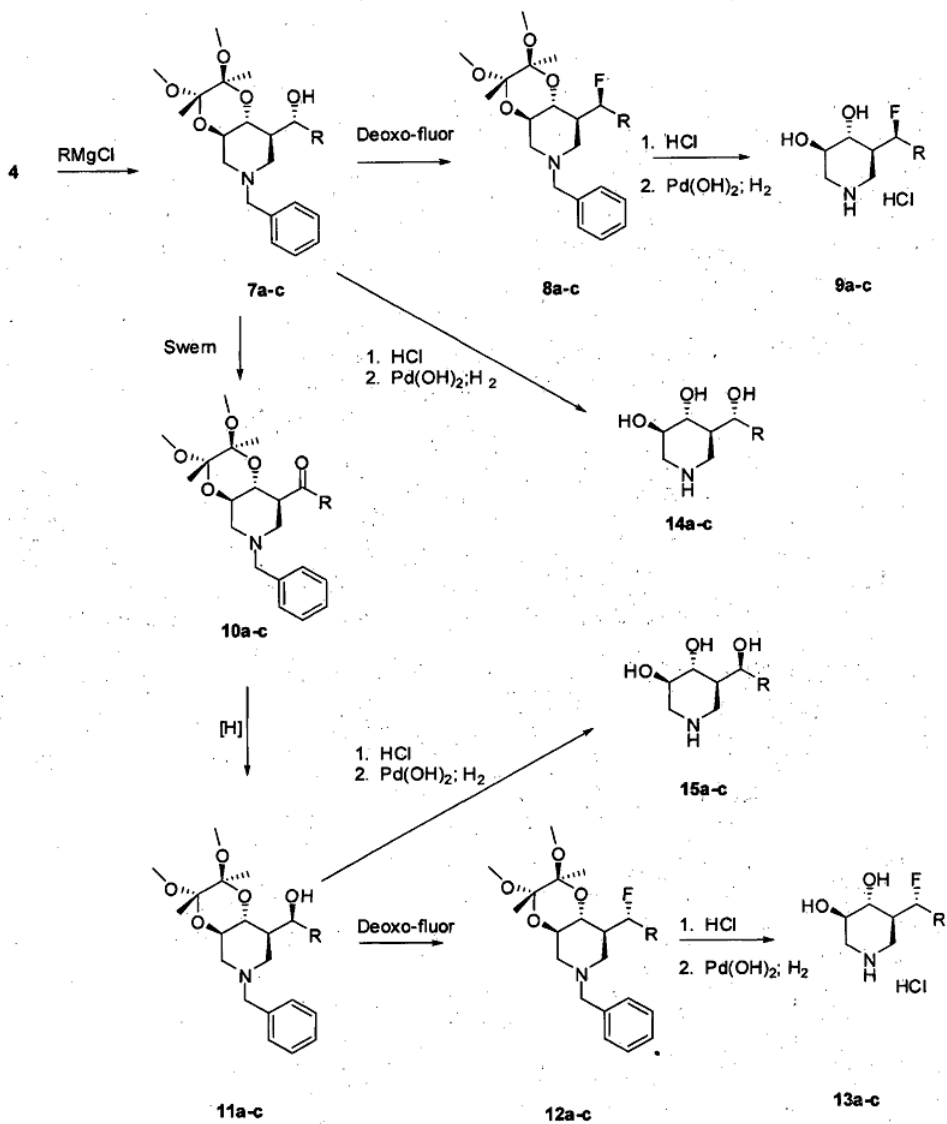
86%). $MH^+ = 303$. 1H NMR (DMSO- d_6) 9.5 (s, 1 H), 7.3 (m, 4H), 7.1 (t, 1 H), 6.35 (t, 1 H), 5.35 (2d, 2H), 4.85 (d, 1H), 4.55 (d, 1H), 3.45 (m, 2H), 3.2 (t, 1H), 3.0 (t, 1H), 2.05 (br d, 1 H).

[0063] I composti della presente invenzione possono essere prodotti da un tecnico del ramo utilizzando i seguenti schemi generali:



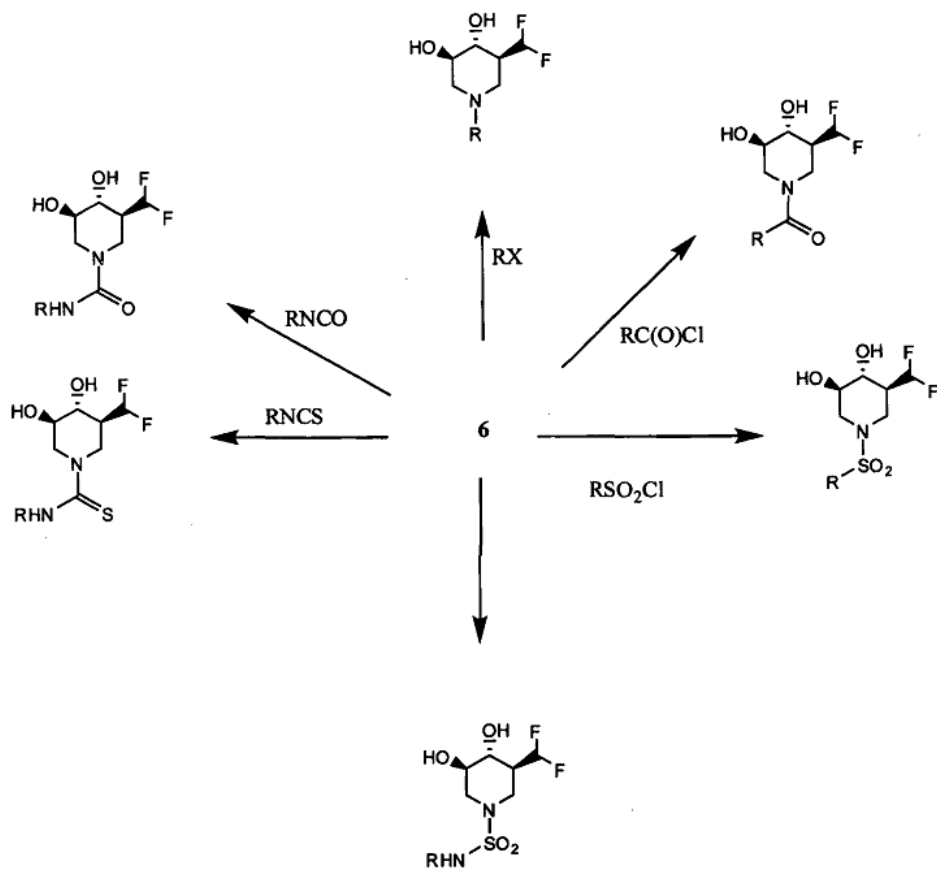
Scheme 3

[Scheme = Schema]



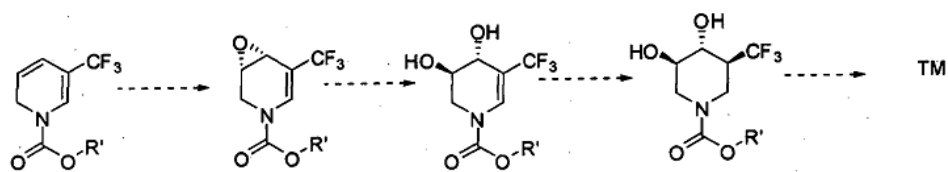
Scheme 4

[Deoxo-fluor = Deosso-fluoro; Scheme = Schema]



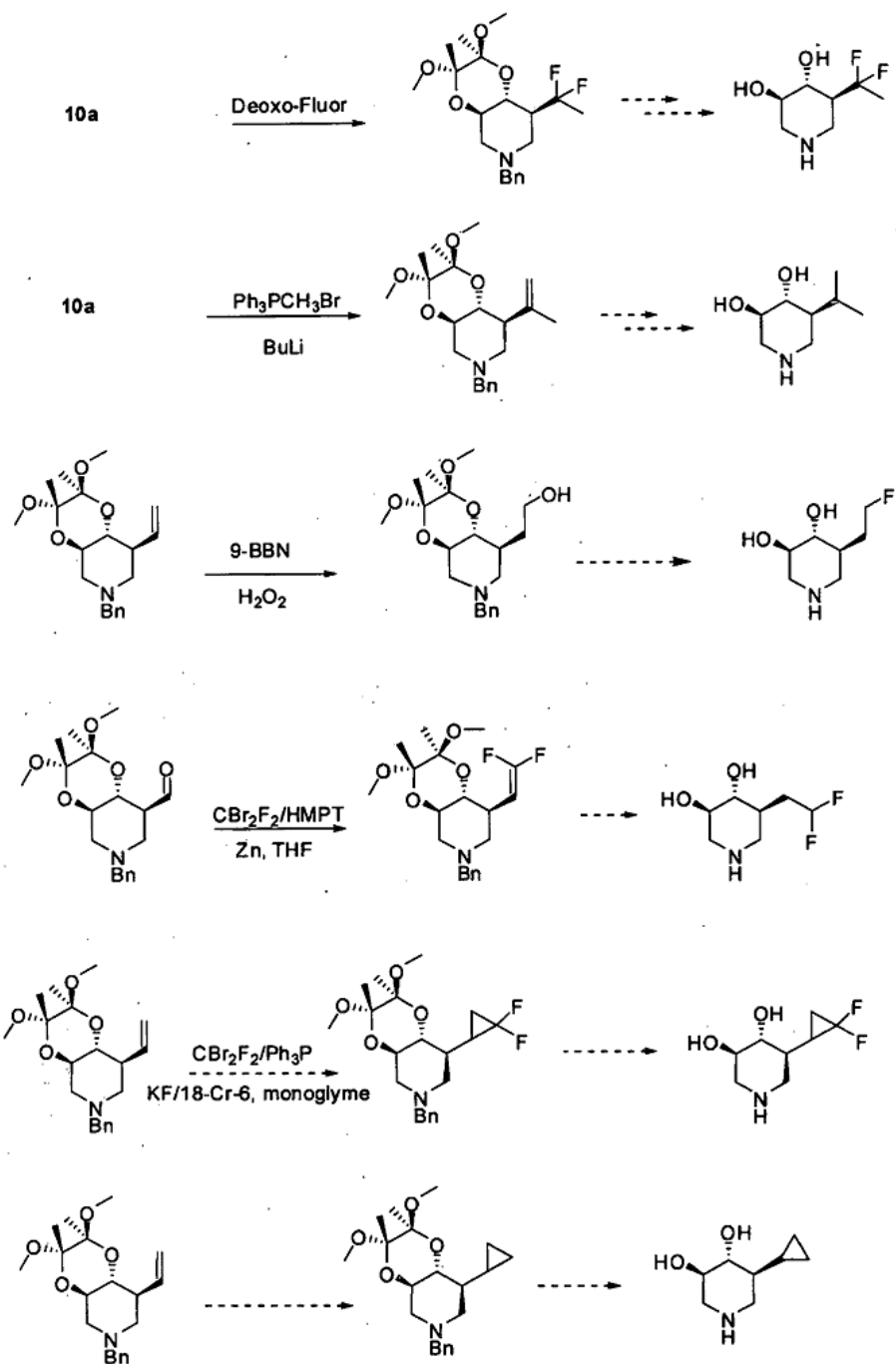
Scheme 5

[Scheme = Schema]



Scheme 6

[Scheme = Schema]



Scheme 7

[Deoxo-fluor = Deosso-fluoro; Monoglyme = Monoglisma; Scheme = Schema]

Sali, solvati e profarmaci

[0064] I composti della presente invenzione includono sali, solvati farmaceuticamente accettabili dei composti qui divulgati. I sali farmaceuticamente accettabili includono sali derivati da basi inorganiche come Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn; sali derivati da basi organiche come [Nu],[Nu']-diacetiletilendiammina, glucammina, trietilammina, colina, idrossido, dicicloesilammina, metformina, benzilammina, trialchilammina, tiammina; basi chirali come alchilfenilammina, glicinolo, fenil glicinolo, sali di amminoacidi naturali come glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, norleucina, tirosina, cistina, cisteina, metionina, prolina, idrossi prolina, istidina, ornitina, lisina, arginina, serina; amminoacidi non naturali come D-isomeri o amminoacidi sostituiti; guanidina, guanidina sostituita in cui i sostituenti sono selezionati da nitro, ammino, alchile, alchenile, alchinile, ammonio o sali di ammonio e sali di alluminio sostituiti. I sali possono includere sali da addizione di acidi dove appropriato, che sono cloridrati, solfati, nitrati, fosfati, perclorati, borati, idroalogenuri, acetati, tartrati, maleati, citrati, succinati, palmoati, metansolfonati, benzoati, salicilati, benzensolfonati, ascorbati, glicerofosfati, chetoglutarati. In una forma di realizzazione, il sale farmaceuticamente accettabile dei composti qui divulgati è il sale cloridrato.

[0065] “Solvato” indica una associazione fisica di un composto con una o più molecole di solvente. L’associazione fisica implica gradi variabili di legame ionico e covalente, incluso legame idrogeno. In

determinati casi, il solvato sarà capace di isolamento, per esempio quando una o più molecole di solvente sono incorporate nel reticolo cristallino del solido cristallino. “Solvato” comprende sia solvati in fase di soluzione che isolabili. “Idrato” è un solvato in cui la molecola di solvente è H₂O. Altri esempi non limitanti di solvati adatti includono alcoli (per esempio, etanolati, metanolati, e simili).

[0068] Tutti gli stereoisomeri (per esempio, isomeri geometrici, isomeri ottici e simili) dei composti qui divulgati (includi quelli dei sali, dei solvati e dei profarmaci di questi composti, così come i sali e solvati dei profarmaci), come quelli che possono esistere a causa di carboni asimmetrici su vari sostituenti, incluse forme enantiomeriche (che possono esistere anche in assenza di carboni asimmetrici), forme rotameriche, atropisomeri e forme diastereomeriche, sono contemplati all'interno della portata di questa invenzione. Gli stereoisomeri singoli di questi composti possono, per esempio, essere sostanzialmente privi di altri isomeri, o possono essere miscelati, per esempio, come racemati, o con tutti gli altri stereoisomeri, o con altri stereoisomeri selezionati. I centri chirali dei composti sopra citati possono avere la configurazione S o R come definita dalle Istruzioni IUPAC 1974. L'uso dei termini “sale”, “solvato” “profarmaco” e simili, è inteso applicarsi allo stesso modo al sale, solvato e profarmaco di enantiometri, stereoisomeri, rotameri, tautomeri, racemati o profarmaci dei composti della presente invenzione divulgati qui.

Formulazioni

[0069] L'uno o più agenti terapeutici possono essere formulati per essere adatti per qualsiasi via di somministrazione, inclusa, per esempio, la via orale, sotto forma di compresse o capsule o liquido, o in soluzione sterile acquosa per iniezione. Quanto l'uno o più agenti terapeutici vengono formulati per la somministrazione orale, le compresse o le capsule possono essere preparate mediante modalità convenzionali con eccipienti farmaceuticamente accettabili come agenti leganti (per esempio, amido di mais pregelatinizzato, polivinilpirrolidone o idrossipropil metilcellulosa); riempitivi (per esempio, lattosio, cellulosa microcristallina o calcio idrogeno fosfato); lubrificanti (per esempio, stearato di magnesio, talco o silice); disintegranti (per esempio, amido di patata o sodio amido glicolato); o agenti bagnanti (per esempio, sodio lauril solfato). Le compresse possono essere rivestite mediante metodi ben noti nell'arte. Le preparazioni liquide per la somministrazione orale possono prendere la forma di, per esempio, soluzioni, sciroppi o sospensioni, o possono essere presentate come prodotto anidro per la costituzione con acqua o con un altro veicolo adatto prima dell'uso. Tali preparazioni liquide possono essere preparate mediante modalità convenzionali con additivi farmaceuticamente accettabili come agenti sospendenti (per esempio, sciroppo di sorbitolo, derivati della cellulosa o grassi idrogenati edibili); agenti emulsionanti (per esempio, lecitina o acacia); veicoli non acquosi (per esempio, olio di mandorla, esteri oleosi, alcol etilico o oli vegetali frazionati); o conservanti (per esempio, metil o propil-p-idrossibenzoati

o acid sorbico). Le preparazioni liquide possono contenere anche sali tampone, agenti aromatizzanti, coloranti o dolcificanti come appropriato. Le preparazioni per la somministrazione orale possono essere formulate opportunamente per fornire un rilascio controllato o prolungato dell'uno o più agenti terapeutici.

[0070] In determinate forme di realizzazione della presente invenzione, l'uno o più agenti terapeutici vengono somministrati in una forma di dosaggio che consente l'assorbimento sistemico, in modo che l'uno o più agenti terapeutici possano attraversare la barriera ematoencefalica in modo da provocare effetti sulle cellule neuronali. Per esempio, le formulazioni farmaceutiche dell'uno o più agenti terapeutici adatte per l'uso parenterale/iniettabile includono generalmente soluzioni sterili acquose (dove solubili in acqua), o dispersioni e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni o dispersioni iniettabili sterili. In ogni caso, la forma deve essere sterile e deve essere fluida nella misura in cui vi sia una facile siringabilità. Essa deve essere stabile nelle condizioni di produzione e conservazione e deve essere protetta dall'azione contaminante di microorganismi come batteri e funghi. Il trasportatore può essere un solvente o un mezzo di dispersione contenente, per esempio, acqua, etanolo, poliolo (per esempio, glicerolo, propilen glicole, polietilen glicole, e simili), loro miscele adatte, o oli vegetali. La corretta fluidità può essere mantenuta, per esempio, con l'utilizzo di un rivestimento come di lecitina, con il mantenimento della dimensione di particelle

richiesta nel caso di dispersione e con l'uso di surfattanti. La prevenzione dell'azione di microorganismi può essere realizzata mediante vari agenti antibatterici e antifungini, per esempio, parabeni, clorobutanolo, fenolo, alcol benzilico, acido sorbico, e simili. In molti casi, sarà ragionevole includere agenti isotonici, per esempio, zuccheri o cloruro di sodio. L'assorbimento prolungato delle composizioni iniettabili può essere realizzato mediante l'uso nelle composizioni di agenti ritardanti l'assorbimento, per esempio, monostearato di alluminio o gelatina.

[0071] Le soluzioni iniettabili sterili vengono preparate incorporando l'uno o più agenti terapeutici nella quantità necessaria nel solvente appropriato con vari degli altri componenti elencati sopra, secondo necessità, il che è seguito da sterilizzazione per filtrazione o terminale. In generale, le dispersioni vengono preparate incorporando i vari principi attivi sterilizzati in un veicolo sterile che contiene il mezzo di dispersione di base e gli altri componenti necessari tra quelli elencati sopra. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i metodi di preparazione preferiti sono essiccamento sotto vuoto e la tecnica di liofilizzazione che fornisce una polvere del principio attivo più qualsiasi componente aggiuntivo desiderato dalla loro soluzione precedentemente sterilizzata per filtrazione.

[0072] La formulazione può contenere un eccipiente. Eccipienti farmaceuticamente accettabili che possono essere inclusi nella formulazione sono tamponi come tampone citrato, tampone fosfato,

tampone acetato e tampone bicarbonato, amminoacidi, urea, alcoli, acido ascorbico, fosfolipidi; proteine, come albumina sierica, collagene, e gelatina; sali come EDTA o EGTA, e cloruro di sodio; liposomi; polivinilpirrolidone; zuccheri, come destrano, mannitolo, sorbitolo e glicerolo; propilen glicole e polietilen glicole (per esempio PEG-4000, PEG-6000); glicerolo; glicina o altri amminoacidi; e lipidi. I sistemi tampone per l'uso con le formulazioni includono tamponi citrato; acetato; bicarbonato; e fosfato. Il tampone fosfato è una forma di realizzazione preferita.

[0073] La formulazione può contenere anche un detergente non ionico. Detergenti non ionici preferiti includono Polisorbato 20, Polisorbato 80, Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P-40, Ottil α -glucoside, Ottil β -glucoside, Brij 35, Pluronic, e Tween 20.

Vie di somministrazione

[0074] L'uno o più agenti terapeutici possono essere somministrati per via orale o parenterale, incluse le vie intravenosa, sottocutanea, intra-arteriosa, intraperitoneale, oftalmica, intramuscolare, boccale, rettale, vaginale, intraorbitale, intracerebrale, intradermica, intracranica, intraspinale, intraventricolare, intratecale, intracisternale, intracapsulare, intrapolmonare, intranasale, transmucosale, transdermica, o mediante inalazione. In una forma di realizzazione preferita, l'uno o più agenti terapeutici vengono somministrati per via orale.

[0075] La somministrazione dell'uno o più agenti terapeutici può essere mediante iniezioni periodiche di un bolo della formulazione, o possono essere somministrati mediante somministrazione intravenosa o intraperitoneale da un serbatoio che è esterno (per esempio, un sacco i.v.) o interno (per esempio, un impianto bioerodibile). Si vedano, per esempio, i brevetti US no. 4,407,957 e 5,798,113. Metodi e apparecchiature per il rilascio intrapolmonare sono descritti, per esempio, nei brevetti US no. 5,654,007, 5,780,014, e 5,814,607. Altri sistemi utili per il rilascio parenterale includono particelle copolimeriche di etilene-vinil acetato, pompe osmotiche, sistemi di infusione impiantabili, rilascio mediante pompe, rilascio di cellule incapsulate, rilascio liposomiale, iniezione rilasciata mediante ago, iniezione senza ago, nebulizzatore, aerosolizzatore, elettroporazione, e cerotto transdermico. Dispositivi iniettori senza ago vengono descritti nei brevetti US no. 5,879,327; 5,520,639; 5,846,233 e 5,704,911. Qualsiasi delle formulazioni descritte sopra può essere somministrata utilizzando questi metodi.

[0076] Le iniezioni sottocutanee hanno il vantaggio di consentire l'auto-somministrazione, determinando tuttavia anche un'emivita plasmatica prolungata rispetto alla somministrazione intravenosa. Inoltre, con le formulazioni della presente invenzione come discusse qui, può essere utilizzata una varietà di dispositivi progettati per la comodità del paziente, come penne per iniezione ricaricabili e dispositivi per iniezione senza ago.

Dosaggio

[0077] Una preparazione farmaceutica adatta è in una forma di dosaggio unitario. In tale forma, la preparazione viene suddivisa in dosi unitarie di dimensione adatta contenenti quantità appropriate del principio attivo, per esempio, una quantità efficace per ottenere lo scopo desiderato. In determinate forme di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici vengono somministrati in una o più dosi giornaliere (per esempio, una volta al giorno, due volte al giorno, tre volte al giorno). In determinate forme di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici vengono somministrati in modo intermittente.

[0078] Regimi di dosaggio esemplari sono descritti nella domanda di brevetto internazionale PCT/US08/61764 pubblicata come WO 2008/134628 l'11 giugno 2008 e nella domanda di brevetto provvisoria U.S. 61/108,192, depositata il 24 ottobre 2008. In una forma di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici vengono somministrati in un regime di dosaggio intermittente che include una dose "iniziale di carico" data giornalmente, seguita da un periodo di dosaggio ad intervalli non giornalieri.

[0079] La quantità dell'uno o più agenti terapeutici per la prevenzione o il trattamento del disturbo a cui si fa riferimento può essere determinata in base al caso singolo da parte dei tecnici del ramo. La quantità e la frequenza di somministrazione dell'uno o più agenti terapeutici verrà regolata secondo il giudizio del medico curante (dottore) considerando fattori come età, condizione e taglia del

paziente, così come il rischio di sviluppare il disturbo o la gravità dei sintomi del disturbo in fase di trattamento a cui si fa riferimento.

Terapia farmacologica di combinazione

[0080] L'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione possono essere somministrati in combinazione con almeno un altro agente terapeutico. La somministrazione dell'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione con almeno un altro agente terapeutico viene intesa comprendere la somministrazione che sia sequenziale o concomitante. In una forma di realizzazione, gli agenti terapeutici vengono somministrati in forme di dosaggio separate. In un'altra forma di realizzazione, due o più agenti terapeutici vengono somministrati in modo concomitante nella stessa forma di dosaggio.

[0081] In determinate forme di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione vengono somministrati in combinazione con almeno un altro agente terapeutico che è un Agente anti-discinesia (per esempio, Carbidopa, Levodopa), un agente anti-infettivo (per esempio, Miglustat), un agente anti-neoplastico (per esempio, Busolfan, Ciclofosfamide), un agente gastrointestinale (per esempio, Metilprednisolone), un micronutriente (per esempio, Calcitriolo, Colecalciferolo, Ergocalciferoli, Vitamina D), un agente vasocostrittore (per esempio, Calcitriolo). In una forma di realizzazione preferita, gli altri agenti terapeutici sopra citati vengono somministrati quando il disturbo è la malattia di Gaucher.

[0082] In determinate forme di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione vengono somministrati in combinazione con allopregnanolone, con una dieta a basso contenuto di colesterolo, o con agenti che decrementano il colesterolo come statine (per esempio, Lipitor®); fibrati come fenofibrato (Lipidil®); niacina; e/o resine leganti come colestiramina (Questran®).

[0083] In una forma di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione vengono somministrati in combinazione con terapia genica. La terapia genica viene contemplata sia con geni sostitutivi, come glucocerebrosidasi, o con RNA inibitori (siRNA) per il gene SNCA. La terapia genica viene descritta in maggior dettaglio nel brevetto US no. 7,446,098, depositato il 17 febbraio 2004.

[0084] In una forma di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione vengono somministrati in combinazione con almeno un altro agente terapeutico che è un agente anti-infiammatorio (per esempio, ibuprofene o altri FANS).

[0085] In una forma di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione vengono somministrati in combinazione con un inibitore del substrato per la glucocerebrosidasi, come N-butil-deossinojirimicina (Zavesca®; miglustat, disponibile presso Actelion Pharmaceuticals, US, Inc., South San Francisco, California, USA).

[0086] Sono contemplate inoltre le combinazioni dell'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione con almeno un altro agente

terapeutico che sia un agente terapeutico per uno o più degli altri enzimi lisosomiali. La Tabella 2 contiene un elenco non limitante di agenti terapeutici per enzimi lisosomiali.

Tabella 2

ENZIMA LISOSOMIALE	AGENTE TERAPEUTICO
α -Glucosidasi No. di accesso GenBank Y00839	1-deossinojirimicina (DNJ) α -omonojirimicina castanospermina
β -Glucosidasi acida (β -glucocerebrosidasi) No. di accesso GenBank J03059	Isofagomina C-benzil isofagomina e derivati N-alchil (C9-12)-DNJ Glucoimidazolo (e derivati) C-alchil-IFG (e derivati) N-alchil- β -valeinamine Flufenozina calistegine A ₃ , B ₁ , B ₂ e C ₁
α -Galattosidasi A No. di accesso GenBank NM000169	1-deossalattonojirimicina (DGJ) α -allo-omonojirimicina α -galatto-omonojirimicina β -1-C-butil-deossinojirimicina calistegine A ₂ e B ₂ N-metil calistegina A ₂ e B ₂
β -Galattosidasi acida	4-epi-isofagomina

No. di accesso GenBank M34423	1-deossigalattojirimicina
Galattocerebrosidasi (β - Galattosidasi acida) No. di accesso GenBank D25283	4- <i>epi</i> -isofagomina 1-deossigalattojirimicina
α -Mannosidasi acida No. di accesso GenBank U68567	1-deossimannojirimicina Swainsonina MannostatinaA
β -Mannosidasi acida No. di accesso GenBank U60337	2-idrossi-isofagomina
α -L-Fucosidasi acida No. di accesso GenBank NM_000147	1-deossifuconojirimicina β -omofuconojirimicina 2,5-immuno-1,2,5-trideossi-L-glucitolo 2,5-deossi-2,5-immuno-D-fucitolo 2,5-immuno-1,2,5-trideossi-D-altritolo
α -N-Acetilglucosaminidasi No. di accesso GenBank U40846	1,2-dideossi-2-N-acetammido- nojirimicina
α -N-Acetilgalattosaminidasi No. di accesso GenBank M62783	1,2-dideossi-2-N-acetamido- galattojirimicina
β -Esosaminidasi A	2-N-acetilammino-isofagomine

No. di accesso GenBank NM_000520	1,2-dideossi-2-acetamido-nojirimicina Nagstatina
β -Esosaminidasi B No. di accesso GenBank NM_000521	2-N-acetamido-isofagomina 1,2-dideossi-2-acetamido-nojirimicina Nagstatina
α -L-Iduronidasi No. di accesso GenBank NM_000203	1-deossi-iduronojirimicina 2-carbossi-3,4,5-trideossipiperidina
β -Glucuronidasi No. di accesso GenBank NM_000181	6-carbossi-isofagomina 2-carbossi-3,4,5-trideossipiperidina
Sialidasi No. di accesso GenBank U84246	acido 2,6-dideossi-2,6,immuno-sialico Siaastatin B
Iduronato solfatasi No. di accesso GenBank AF_011889	2,5-anidromannitolo-6-solfato
Sfingomielinasi acida No. di accesso GenBank M59916	desipramina, fosfatidilinositolo-4,5-difosfato

[0087] In determinate forme di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione vengono somministrati in combinazione con almeno un agente terapeutico che è un Agente anti-discinesia (per esempio, Carbidopa, Levodopa), un agente anti-infettivo

(per esempio, Ciclosporina, Miglustat, Pirimetamina), un agente anti-neoplastico (Alemtuzumab, Azatioprina, Busolfan, Clofarabina, Ciclofosfamide, Melfalan, Metotrexato, Rituximab), un agente antireumatico (per esempio, Rituximab), un agente gastrointestinale (per esempio, Metilprednisolone), un micronutriente (per esempio, Calcitriolo, Colecalciferolo, Ergocalciferoli, Acido Folico, Vitamina D), un agente per il controllo della riproduzione (per esempio, Metotrexato), un agente per il sistema respiratorio (per esempio, Tetraidrozolina), un agente vasocostrittore (per esempio, Calcitriolo, Tetraidrozolina).

[0088] In determinate forme di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione vengono somministrati in combinazione con almeno un agente terapeutico che è un agente terapeutico per la β -esosaminidasi A e/o un agente terapeutico per la β -galattosidasi acida. In determinate forme di realizzazione, l'uno o più agenti terapeutici della presente invenzione vengono somministrati in combinazione con almeno un agente terapeutico che è un agente anti-infettivo (per esempio, Miglustat), un agente antineoplastico (per esempio, Alemtuzumab, Busolfan, Ciclofosfamide), un agente gastrointestinale (per esempio, Metilprednisolone). In una forma di realizzazione, la combinazione sopra citata viene somministrata a soggetti a rischio o a cui è stata diagnosticata la malattia di Niemann-Pick (per esempio, malattia di Niemann-Pick di tipo C).

ESEMPI

[0089] La presente invenzione viene ulteriormente descritta mediante gli esempi presentati sotto. L'uso di tali esempi è solamente illustrativo e non limita in alcun modo l'ambito e il significato dell'invenzione o di qualsiasi termine esemplificato. Similmente, l'invenzione non è limitata ad alcuna forma di realizzazione preferita descritta qui. Invero, nella lettura di questa descrizione risulteranno evidenti ai tecnici del ramo molte modificazioni e variazioni dell'invenzione. L'invenzione deve quindi essere limitata solamente dalle clausole delle rivendicazioni allegate insieme all'intera portata degli equivalenti che sono autorizzati dalle rivendicazioni.

ESEMPIO 1 Determinazione delle costanti di inibizione

[0089] L'affinità di legame (definita qui dalla costante di legame K_i) alla GCasi per i nuovi composti della presente invenzione è stata determinata empiricamente utilizzando saggi di inibizione enzimatica. In breve, i saggi di inibizione enzimatica utilizzati hanno monitorato la capacità di un composto in esame di legare e prevenire l'idrolisi di un substrato fluorogeno in modo concentrazione-dipendente. Nello specifico, l'attività enzimatica della GCasi ricombinante umana (rhGCasi; Cerezyme®, Genzyme Corp.) è stata misurata utilizzando il substrato fluorogeno 4-metilumbelliferil- β -D-glucopiranoside (4-MU- β -D-Glc) in assenza o in presenza di quantità variabili di ciascun composto in esame. I dati che ne sono risultati sono stati analizzati confrontando tutti i campioni in esame rispetto al campione controllo senza inibizione (nessun composto; corrispondente al 100% dell'attività enzimatica) per

determinare l'attività enzimatica residua in presenza di un composto in esame. I dati di attività residua normalizzati sono stati successivamente messi in grafico (sull'asse delle y) rispetto alla concentrazione di composto in esame (sull'asse delle x) per estrapolare la concentrazione di composto in esame che determina il 50% dell'inibizione dell'attività enzimatica (definita come IC_{50}). Il valore di IC_{50} per ciascun composto in esame è stato quindi inserito nell'equazione di Cheng-Prusoff (in dettaglio sotto) per derivare la costante di inibizione assoluta K_i che rispecchia in modo accurato l'affinità di legame alla GCasi per il composto in esame. I saggi di inibizione enzimatica sono stati eseguiti sia a pH 7,0 (pH del reticolo endoplasmatico) che a pH 5,2 (pH lisosomiale) per ottenere una visione nel dettaglio dell'affinità di legame (cioè, della potenza) dei composti per la GCasi nel reticolo endoplasmatico e nel lisosoma.

Saggio *in vitro*

[0090] Sono state preparate varie concentrazioni dei composti in esame in un tampone "M" che consisteva di tampone sodio fosfato 50 mM con lo 0,25% di sodio taurocolato a pH 7,0 e a pH 5,2. L'enzima (Cerezyme®, una forma ricombinante della β -glucocerebrosidasi umana) è stato anch'esso diluito nello stesso tampone "M" a pH 7,0 e a pH 5,2. La soluzione di substrato consisteva di 4-metilumbelliferone β -D-glucopiranoside 3 mM in tampone "M" con lo 0,15% di Triton X-100 ad entrambi i pH. Sono stati aggiunti cinque microlitri di enzima diluito a 15 μ l delle varie concentrazioni di inibitore o di tampone "M" da solo e

sono stati incubati per 1 ora a 37° C con 50 µl della preparazione di substrato per valutare l'attività della β-glucosidasi a pH 7,0 e a pH 5,2. Le reazioni sono stati fermate con l'aggiunta di un ugual volume di glicina 0,4 M, a pH 10,6. La fluorescenza è stata misurata su un lettore per piastre per 1 sec/pozzetto utilizzando eccitazione a 335 nm ed emissione a 460 nm. Le incubazioni senza aggiunta di enzima o senza aggiunta di inibitori sono state utilizzate per definire rispettivamente nessuna attività enzimatica e massima attività, e per normalizzare la % di inibizione per un dato saggio. I risultati di tali saggi di inibizione *in vitro* per il composto di riferimento IFG-tartrato e per diversi composti in esame vengono riassunti sotto nella **Tabella 2A**.

Tabella 2A: Determinazione <i>in vitro</i> delle costanti di inibizione					
Com p #	Nome del composto	IC₅₀ (µM) pH 5,2	K_i (µM) pH 5,2	IC₅₀ (µM) pH 7,0	K_i (µM) pH 7,0
6	(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidin-3,4-diolo	0,0259 ±0,0014	0,0136±0,0008	0,0058±0,00023	0,00306±0,00012
13	(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidin-3,4-diolo*	0,0946 ±0,0028	0,0498±0,0015	0,0171±0,0008	0,009±0,0004

9	(3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo*	0,107± 0,0041	0,044±0,0 017	0,020±0,0 008	0,010±0,00 04
10	(3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo*	0,343± 0,021	0,142±0,0 088	0,066±0,0 041	0,035±0,00 21
14	(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidin-3,4-diolo*	0,038± 0,0016	0,016±0,0 007	0,007±0,0 003	0,004±0,00 01
Ness uno	(3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)-piperidin-3,4-diolo cloridrato	0,29±0, 006	0,121±0,0 026	0,060±0,0 029	0,031±0,00 15
Ness uno	(3R,4R,5S)-5-benzil-piperidin-3,4-diolo	0,659± 0,028	0,273±0,0 12	0,127±0,0 1	0,067±0,00 5

Nessuno	(3R,4R,5R)-5-((S)-idrossi(fenil)metil)-piperidin-3,4-diolo	3,29±0,25	1,36±0,10	0,017±0,0035	0,0089±0,0018
Nessuno	(3R,4R,5S)-5-(2-idrossipropan-2-il)piperidin-3,4-diolo	0,234±0,0037	0,097±0,0015	0,029±0,0013	0,015±0,0007
Nessuno	IFG-tartrato	0,049±0,0029	0,026±0,0015	0,0074±0,00007	0,0039±0,00037
<p>Note:</p> <p>* Stereoisomero A e/o B</p>					

Saggio *in situ*

[0091] L'effetto dei nuovi composti della presente invenzione sull'attività GCasica lisosomiale è stato valutato *in situ* utilizzando fibroblasti stabilizzati provenienti da un soggetto normale. Le cellule seminate in piastre da 48 pozzetti sono state incubate con le concentrazioni di composto indicate per 16-24 ore. Per i saggi di dose-risposta, le cellule sono state incubate *in situ* con il substrato 5-(pentafluorobenzoilammino)fluorescein di-β-D-glucopiranoside (PFBFDβGlu) per 1 ora e quindi sono state lisate per determinare il grado di idrolisi del substrato in presenza di composto. Il saggio

impiegava un intervallo di 12 concentrazioni comprendenti 5 ordini di grandezza, centrato sulla IC₅₀. Nello specifico, sono stati impiegati i seguenti intervalli di concentrazione: (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato, e (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo: da $1,0 \times 10^{-3}$ a $3,0 \times 10^{-9}$ M; (3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo: da $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-10}$ M; e (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo: da $1,0 \times 10^{-3}$ a $3,0 \times 10^{-11}$ M; in cui il composto è stato diluito in serie 1:3 dalla concentrazione più elevata negli intervalli specificati. L'inibizione è stata determinata come rapporto tra l'attività in presenza di composto rispetto a quella in assenza di composto. Per i saggi di washout, le cellule sono state trattate con il composto per 16-24 ore ad una concentrazione uguale alla IC₉₀. Le cellule sono state lavate in modo approfondito e incubate in un terreno privo di farmaco per consentire l'efflusso netto di composto dalle cellule. Le cellule sono state quindi testate per l'attività GCasica lisosomiale ad intervalli di 2 ore per un periodo totale di 8 ore in seguito all'eliminazione del composto. L'aumento di attività nel tempo è stato interpolato con una funzione singola esponenziale per determinare il tempo di washout del composto. I risultati di questi saggi di inibizione *in situ* per il composto di riferimento IFG-tartrato e per diversi composti in esame vengono riassunti sotto nella **Tabella 2B**.

Tabella 2B: Determinazione <i>In situ</i> delle costanti di inibizione

Comp #	Nome del composto	IC ₅₀ <i>in situ</i> (μM)	Washout <i>in situ</i> (h)	EC ₅₀ (μM)	E _{max} (%)
6	(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidin-3,4-diolo	0,408 ± 0,046	2,1 ± 0,30	0,018 ± 0,008	105,6 ± 8,7
13	(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidin-3,4-diolo*	0,650 ± 0,172	2,7 ± 0,12	0,044 ± 0,005	92,8 ± 6,6
9	(3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo*	0,518 ± 0,022	10,5 ± 1,75	0,49 ± 0,06	83,7 ± 2,9
10	(3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo*	0,798 ± 0,043	12 ± 1,65	1,06 ± 0,12	99,3 ± 4,9
14	(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidin-3,4-diolo*	0,061 ± 0,019	3,7 ± 0,63	0,026 ± 0,003	89,7 ± 3,5
nessuno	(3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)-piperidin-3,4-diolo cloridrato	0,972 ± 0,201	ND	0,086 ± 0,002	84,0 ± 4,1
nessuno	(3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo	1,299 ± 0,323	1,2 ± 0,13	0,18 ± 0,01	98,0 ± 4,5

nessuno	(3R,4R,5R)-5-((S)-idrossi(fenil)metil)-piperidin-3,4-diolo	ND	ND	4,99 ± 0,86	72,1 ± 3,5
nessuno	(3R,4R,5S)-5-(2-idrossipropan-2-il)piperidin-3,4-diolo	ND	ND	0,791 ± 0,162	109,3 ± 3,6
nessuno	IFG-tartrato	0,271 ± 0,012	8,2 ± 0,04	0,31 ± 0,11	105,5 ± 12,8
<p>Note:</p> <p>* Stereoisomero A e/o B</p> <p><i>Equazione di Cheng-Prusoff:</i> $K_i = IC_{50}/(1 + [S]/K_m)$</p> <p>dove [S] = concentrazione di substrato; è stato utilizzato 4-MU-β-D-Glc 2,5 mM</p> <p>K_m = costante di Michaelis che definisce l'affinità del substrato; 1,8 ± 0,6 mM per 4-MU-p-D-Glc (Liou et al., (2006) <i>J Biol. Chem.</i> 281 (7), 4242-53)</p>					

[0092] Nel confronto rispetto al composto di riferimento IFG-tartrato, ciò che segue è degno di nota: (i) è stato trovato che i composti in esame (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato, e (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo causano un incremento concentrazione-dipendente della attività GCasica e un'attività

enzimatica incrementata allo stesso livello massimo del composto di riferimento IFG-tartrato ad una concentrazione molto più bassa; (ii) i composti in esame (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, e (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo, sono stati eliminati dal comparto lisosomiale (*washout in situ*) in modo considerevolmente più veloce rispetto al composto di riferimento IFG-tartrato; e (iii), i composti in esame (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato, e (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo hanno inibito l'attività GCasica.

ESEMPIO 2: Penetrazione nella barriera ematoencefalica

[0093] La penetrazione nella barriera ematoencefalica (BEE) del composto di riferimento IFG-tartrato e di diversi composti della presente invenzione (cioè, (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato, e (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo) è stata valutata in seguito a somministrazione orale in topi. A questo scopo, topi maschi selvatici di 8 settimane (C57BL/6) sono stati trattati con una singola dose p.o. di 30 mg/kg (equivalente di base libera) del composto di riferimento o di composto in esame mediante sonda gastrica (n = 3 topi per punto temporale). Le

soluzioni di trattamento sono state preparate in acqua. Dopo il trattamento, i topi sono stati sacrificati con CO₂ ai seguenti punti temporali: 0, 0,5, 1 e 4 ore dopo la dose. Dopo il sacrificio, è stato prelevato il sangue intero dalla vena cava inferiore in provette con litio eparina. Similmente, è stato prelevato il cervello intero di ciascun topo. È stato ricavato il plasma mediante centrifugazione del sangue intero a 2.700 x g per 10 minuti a 4° C, seguita da conservazione su ghiaccio secco. I cervelli interi sono stati lavati in PBS freddo per eliminare il sangue che li contaminava, sono stati asciugati con carta assorbente, congelati velocemente su ghiaccio secco e infine conservati a -80° C fino all'analisi. Al fine di preparare i campioni di cervello per l'analisi, 50-100 mg di tessuto sono stati omogenati in 400 µl di acqua/mg di tessuto. I campioni sono stati quindi chiarificati mediante centrifugazione. Quindi, 25 µl di soprannatante di omogenato di cervello o 25 µl di plasma sono stati miscelati con 25 µl di acetonitrile:acqua (95/5). A questi sono stati aggiunti 25 µl di acetonitrile e 50 µl di standard interno (100 ng/ml di IFG-tartrato 13C2-15N in acido formico allo 0,5% in acetonitrile:metanolo (70:30)). I campioni sono stati nuovamente chiarificati mediante centrifugazione e 75 µl di soprannatante sono stati miscelati con 75 µl di acetonitrile. I campioni sono stati quindi analizzati per i livelli di composto mediante LC-MS/MS presso la PPD Inc. (3230 Deming Way, Middleton, WI 53562). In breve, è stata impiegata una colonna da 5 µ, Silice-100, 50 x 3mm, Thermo Betasil, equilibrata con una miscela di fase mobile che consisteva di

formiato di ammonio 5 mM e di acido formico allo 0,05% in (A) acetonitrile:acqua 95:5 o (B) metanolo:acqua:acetonitrile 70:20:10. Sono stati iniettati per l'analisi tra 20 e 30 µl di campione. Per il calcolo delle concentrazioni di farmaco, i dati grezzi per il plasma (ng/mL) e per il cervello (ng/g) sono stati convertiti in nM utilizzando il peso molecolare dei rispettivi composti e assumendo che 1 g di tessuto fosse equivalente ad 1 ml di volume. La concentrazione in funzione del tempo è stata messa in grafico in GraphPad Prism versione 4.02.

[0094] I livelli nel plasma e i livelli nel cervello rilevati nei topi trattati con una singola dose p.o. di 30 mg/kg (equivalente di base libera) di composto di riferimento (cioè IFG-tartrato) o di composto in esame (cioè (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5R)-5-(1-idrossietil)-piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato, o (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo) rispecchiano il fatto che (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato, e (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo hanno attraversato la barriera ematoencefalica più facilmente rispetto a IFG-tartrato. Inoltre, sono stati rilevati nel cervello livelli più elevati di (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato, e di (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo rispetto a quelli osservati in seguito a somministrazione di IFG-tartrato.

ESEMPIO 3: Incremento di GCasi

[0095] È stata valutata nei topi la capacità dei composti in esame somministrati per via orale ((3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato, o (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo) di aumentare i livelli di GCasi. A questo scopo, topi maschi selvatici di 8 settimane (C57BL/6) sono stati trattati con una singola dose p.o. (sonda gastrica) di un composto della presente invenzione (cioè (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidin-3,4-diolo cloridrato, o (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo). I dettagli della dose somministrata per ciascun composto vengono forniti nelle **Tabelle 3A** e **3B**. Le soluzioni di trattamento sono state preparate in acqua. I composti sono stati somministrati per 2 settimane come segue: settimana 1, lun-ven (Sì), sab-dom (No); settimana 2, lun-gio (Sì), necropsia il venerdì. Quindi è stato somministrato a ciascun topo un totale di 9 dosi (soluzioni di trattamento preparate fresche ogni giorno), con un washout di 24 ore tra l'ultima dose e la necropsia.

[0096] Dopo la fine del trattamento, i topi sono stati sacrificati con CO₂ e il sangue intero è stato estratto dalla vena cava inferiore in provette di litio eparina. Il plasma è stato raccolto centrifugando il sangue a 2.700 g per 10 minuti a 4° C. Sono stati prelevati tessuti di fegato, milza, polmone e cervello, sono stati lavati in PBS freddo,

asciugati con carta assorbente, congelati velocemente su ghiaccio secco e conservati a -80° C fino all'analisi. I livelli di GCasi sono stati misurati omogeneizzando circa 50 mg di tessuto in 500 μ L di tampone McIlvane (MI) (sodio citrato 100 mM, sodio fosfato dibasico 200 mM, sodio taurocolato allo 0,25%, e Triton X-100 allo 0,1%, pH 5,2) a pH 5,2 per 3-5 secondi su ghiaccio con un micro omogeneizzatore. Gli omogenati sono stati quindi incubati a temperatura ambiente senza e con conduritol-B-eossido (CBE) 2,5 mM per 30 min. Infine, è stato aggiunto il substrato 4-metilumbeliferril- β -glucoside (4-MUG) 3,7 mM ed è stato incubato a 37° C per 60 min. Le reazioni sono state fermate con aggiunta di glicina 0,4 M, a pH 10,6. La fluorescenza è stata misurata su un lettore per piastre per 1 sec/pozzetto utilizzando eccitazione a 335 nm ed emissione a 460 nm. Le proteine totali sono state determinate nei lisati utilizzando il kit MicroBCA secondo le istruzioni del produttore. È stata fatta correre in parallelo una curva standard di 4-metilumbelliferone (4-MU) nell'intervallo da 1,0 nM a 50 μ M per la conversione dei dati grezzi di fluorescenza in attività Gcasica assoluta (in presenza o in assenza di CBE) per mg di proteina all'ora (nmol/mg di proteina/h). I livelli di GCasi e i livelli di proteine sono stati calcolati utilizzando Microsoft Excel (Redmond, Washington) e GraphPad Prism versione 4.02.

[0097] Le **Tabelle 3A** e **3B** riassumono la dose somministrata ai topi per ciascun composto esaminato come descritto sopra così come il livello di incremento di GCasi che ne deriva, la concentrazione

di composto nel tessuto, la concentrazione di composto nel saggio GCasi e la costante di inibizione (K_i), rispettivamente nel cervello e nella milza.

Tabella 3A: Incremento di GCasi nel cervello

Nome del composto	Dose (mg/kg) FBE	Incremento di Gcasi (volte)	Concentrazione di composto nel tessuto 2,2 nmol/kg	Concentrazione di composto nel saggio GCasi (μM)	K_i a pH 5,2 (μM)
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidin-3,4-diolo	10	2,1	55	0,0002	0,0136±0,0008
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidin-3,4-diolo	100	2,6	301	0,0010	

(3R,4R,5S)- 5-(1- fluoroetil)- piperidin- 3,4-diolo*	10	1,5	50	0,0002	0,0498±0, 0015
(3R,4R,5S)- 5-(1- fluoroetil)- piperidin- 3,4-diolo*	100	2,4	415	0,0014	
(3R,4R,5R)- 5-(1- idrossietil)- piperidin- 3,4-diolo*	ND	ND	ND	ND	0,044±0,0 017
(3R,4R,5R)- 5-(1- idrossietil)- piperidin- 3,4-diolo*	ND	ND	ND	ND	0,142±0,0 088

(3R,4R,5S)- 5-(1- fluoroetil)- piperidin- 3,4-diolo*	10	1,5	BLQ (1)	BLQ	0,016±0,0 007
(3R,4R,5S)- 5-(1- fluoroetil)- piperidin- 3,4-diolo*	100	2,2	41	0,0001	
(3R,4R,5S)- 5-((R)-1- fluoropropil)- piperidin- 3,4-diolo cloridrato	10	0,9	BLQ (2)	BLQ	0,121±0,0 026
(3R,4R,5S)- 5-((R)-1- fluoropropil)- piperidin- 3,4-diolo cloridrato	100	1,1	38	0,0001	

(3R,4R,5S)- 5- benzilpiperid in-3,4-diolo	10	1,2	ND	ND	0,273±0,6 12
(3R,4R,5S)- 5- benzilpiperid in-3,4-diolo	100	1,4	ND	ND	
(3R,4R,5R)- 5-((S)- idrossi(fenil) metil)- piperidin- 3,4-diolo	ND	ND	ND	ND	1,36±0,10
(3R,4R,5S)- 5-(2- idrossipropa n-2- il)piperidin- 3,4-diolo	ND	ND	ND	ND	0,097±0,0 015
<p>Note:</p> <p>* Stereoisomero A e/o B</p> <p>(1) BLQ < 7,4 nmol/kg; (2) BLQ < 2,2 nmol/kg</p> <p>ND: Non determinato</p>					

Tabella 3B: Incremento di GCasi nella milza

Nome del composto	Dose (mg/kg) FBE	Incremento di GCasi (volte)	Concentrazione di composto nel tessuto 2,2 nmol/kg	Concentrazione di composto nel saggio GCasi (μM)	K_i a pH 5,2 (μM)
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidin-3,4-diolo	10	1,9	100	0,0003	0,0136 \pm 0,0008
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidin-3,4-diolo	100	2,4	435	0,0015	
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidin-3,4-diolo*	10	1,0	BLQ (1)	BLQ	0,0498 \pm 0,0015

(3R,4R,5S)- 5-(1- fluoroetil)- piperidin- 3,4-diolo*	100	1,5	948	0,0032	
(3R,4R,5R)- 5-(1- idrossietil)- piperidin- 3,4-diolo*	ND	ND	ND	ND	0,044±0,0 017
(3R,4R,5R)- 5-(1- idrossietil)- piperidin- 3,4-diolo*	ND	ND	ND	ND	0,142±0,0 088
(3R,4R,5S)- 5-(1- fluoroetil)- piperidin- 3,4-diolo*	10	1,6	BLQ (2)	BLQ	0,016±0,0 007

(3R,4R,5S)- 5-(1- fluoroetil)- piperidin- 3,4-diolo*	100	2,3	99	0,0003	
(3R,4R,5S)- 5-((R)-1- fluoropropil)- piperidin- 3,4-diolo cloridrato	10	0,7	21	0,0001	0,121±0,0 026
(3R,4R,5S)- 5-((R)-1- fluoropropil)- piperidin- 3,4-diolo cloridrato	100	0,7	60	0,0002	
(3R,4R,5S)- 5- benzilpiperid in-3,4-diolo	10	1,0	ND	ND	0,273±0,0 12

(3R,4R,5S)- 5- benzilpiperid in-3,4-diolo	100	1,2	ND	ND	
(3R,4R,5R)- 5-((S)- idrossi(fenil) metil)- piperidin- 3,4-diolo	ND	ND	ND	ND	1,36±0,10
(3R,4R,5S)- 5-(2- idrossipropa n-2- il)piperidin- 3,4-diolo	ND	ND	ND	ND	0,097±0,0 015
<p>Note:</p> <p>* Stereoisomero A e/o B</p> <p>(1) BLQ < 6,8 nmol/kg; (2) BLQ < 7,9 nmol/kg</p> <p>ND: Non determinato</p>					

[0098] Come si riflette nelle **Tabelle 3A** e **3B**, i topi trattati con (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, o (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo

hanno dimostrato un significativo incremento di GCasi nel cervello e nella milza.

ESEMPIO 4: Farmacocinetica nel ratto

[0099] I dati di farmacocinetica (PK) sono stati ottenuti in ratti per valutare la biodisponibilità di composti in esame. In particolare, sono stati calcolati i seguenti parametri di PK: biodisponibilità misurata come area sotto la curva (AUC) di Concentrazione/Tempo, frazione di dose disponibile (%F; ulteriormente definita sotto), eliminazione (CL), volume di distribuzione (Vd) ed emivita ($t_{1/2}$). A questo scopo, ratti maschi Sprague-Dawley di 8 settimane sono stati trattati con una dose intravenosa (IV) singola equivalente a 3 mg/kg di base libera o con dosi singole crescenti p.o. (sonda gastrica) di composto in esame equivalenti a 10, 30 e 100 mg/kg di base libera. Sono stati utilizzati tre ratti per gruppo di trattamento. Il sangue è stato prelevato per un periodo di 24 ore. I punti temporali per il prelievo del sangue dopo la somministrazione intravenosa erano: 0, 2,5, 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 8, 12, e 24 h; i punti temporali per il prelievo del sangue dopo la somministrazione p.o. erano: 0, 5, 15, 30, 45 min, 1, 2, 3, 4, 8, 12, e 24 h. I campioni di plasma sono stati analizzati per i livelli di composto mediante LC-MS/MS presso la PPD. I dati grezzi sono stati analizzati mediante analisi non compartimentale in Win-nonLin per calcolare V_D , %F, CL, e $t_{1/2}$.

[00100] I vari parametri farmacocinetici per (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-

3,4-diolo, e (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo in base allo studio sopra citato vengono forniti in dettaglio sotto nelle **Tabelle 4A-D**.

Tabella 4A: PK nel ratto per (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo-HCl								
Dose (mg/kg)								
Sale	Base libera	Via	AUC _{last} (h*ng/ml)	% F	t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	CL (mL/h/kg)	V _D (mL/kg)
3,65	3	IV	AUC _{0-12 h} 2044 ± 294	N/ D	1,1 ± 0,05	2323 ± 348	1555 ± 218	2612 ± 269
12,18	10	P O	AUC _{0-12h} 6714 ± 524	10 6 ± 8, 6	2,58 ± 0,78	3363 ± 219	N/D	N/D
36,54	30	P O	AUC _{0-24h} 21685 ± 1515	10 1 ± 6, 9	2,75 ± 0,36	10037 ± 865	N/D	N/D

121,8	100	P	AUC _{0-24h}	12	2,41	33200	N/D	N/D
1		O	79389 ± 8570	1 ± 12 ,9	± 0,16	± 4990		

Note:

Valori medi di analisi non compartimentale (N=3 ratti)

BLD Sotto il limite di rilevamento (<0,5ng/mL)

BLQ Sotto il limite di quantificazione

$$\%F = \frac{AUC\ PO \times 100\ dose\ normalizzata}{AUC\ IV}$$

AUC_{last} = Area sotto la curva Concentrazione/Tempo all'ultimo punto di rilevamento

Tabella 4B: PK nel ratto per (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo-HCl*								
Dose (mg/kg)								
Sale	Base libera	Vi	AUC _{last} (h*ng/ml)	% F	t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	CL (mL/h/kg)	V _D (mL/kg)
3,67	3	IV	AUC _{0-24h} 1421 ± 188,1	N/ D	2,6 ± 0,64	2328 ± 373	2708 ± 410	9774 ± 1551

12,23	10	P O	AUC _{0-24h} 7097 ± 606	14 8 ± 12 ,5	2,8 ± 0,50	2680 ± 167	N/D	N/D
36,70	30	P O	AUC _{0-24h} 21664 ± 1708	15 5 ± 12 ,2	2,7 ± 0,12	6917 ± 451	N/D	N/D
122,3 4	100	P O	AUC _{0-24h} 59481 ± 1005	14 2 ± 2, 5	2,5 ± 0,19	19433 ± 3031	N/D	N/D
Note: * Stereoisomero A e/o B								

Tabella 4C: PK nel ratto per (3R,4R,SS)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo-HCl*								
Dose (mg/kg)								
Sale	Base libera	Viola	AUC _{last} (h*ng/ml)	%F	t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	CL (mL/h/kg)	V _D (mL/kg)

3,67	3	IV	AUC _{0-24h} 1370 ± 109	N/D	2,06 ± 0,47	2427 ± 192	2188 ± 173	6304 ± 927
12,23	10	P O	AUC _{0-24h} 4251 ± 88	98 ± 1,8 5	3,0 ± 0,22	1127 ± 60	N/D	N/D
36,70	30	P O	AUC _{0-24h} 14229 ± 127	104 ± 0,8 8	2,6 ± 0,16	4680 ± 369	N/D	N/D
122,3 4	100	P O	AUC _{0-24h} 50946 ± 713	104 ± 1,5	2,4 ± 0,16	15733 ± 622	N/D	N/D
<p>Note:</p> <p>* Stereoisomero A e/o B</p>								

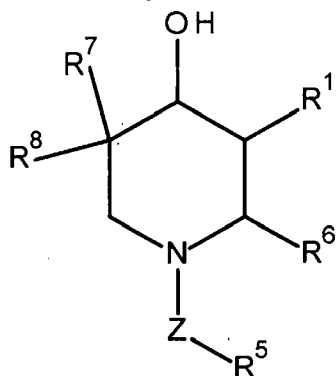
Tabella 4D: PK nel ratto per (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo-HCl								
Dose (mg/kg)								
Sale	Base libera	Vi	AUC _{last} (h*ng/ml)	%F	t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	CL (mL/h/kg)	V _D (mL/kg)
		a)))))

3,53	3	IV	AUC ₀₋ 12h 592 ± 60,9	N/D	1,7 ± 1,5	969 ± 104	5145 ± 532	12570 ± 1792
11,76	10	P O	AUC ₀₋ 24h 1200 ± 46,4	61, 7 ± 2,4	3,86 ± 0,6	641 ± 48,7	N/D	N/D
35,28	30	P O	AUC ₀₋ 24h 3690 ± 71,5	62, 3 ± 1,2	3,8 ± 0,19	1703 ± 133	N/D	N/D
117,5 9	100	P O	AUC ₀₋ 24h 13519 ± 2177	68, 3 ± 10, 8	2,9 ± 0,11	7140 ± 1357	N/D	N/D

[00101] Come si riflette nelle **Tabelle 4A-D**, (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, e (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo hanno profili farmacocinetici favorevoli per lo sviluppo come farmaci. In particolare, (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidin-3,4-diolo, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidin-3,4-diolo, e (3R,4R,5S)-5-benzilpiperidin-3,4-diolo mostrano biodisponibilità orale (circa del 50-100%) e proporzionalità di dose eccellenti, un'emivita da 1,0 a 4,0 ore e un volume di distribuzione che suggerisce un'adeguata penetrazione nei tessuti periferici.

RIVENDICAZIONI

1. Composto di formula II:



in cui:

R^1 è $C(R^2)(R^3)(R^4)$;

R^2 è idrogeno, -OH o alogeno;

R^3 è idrogeno, -OH, alogeno o -CH₃;

R^4 è alogeno, -CH₃, fenile, fluorofenile, metilfenile, cicloesilmetile, in cui quando R^4 è un alogeno R^2 e R^3 non possono essere entrambi idrogeno;

R^3 e R^4 possono unirsi all'atomo di carbonio a cui sono attaccati per formare un anello cicloalchilico, il quale può essere facoltativamente sostituito con uno o più atomi di alogeno;

R^6 è idrogeno o fenilalchile;

Z è facoltativo, quando presente Z è -(CH₂)-, -C(=O)-, -S(=O)₂NH-, -S(=O)₂-, -S(=O)₂-CH₂-, C(=O)-NH-, -S(=O)₂-NR⁹-, -C(=S)NH- o -C(=O)CH₂-;

R^9 è idrogeno o CH₃;

R^5 è idrogeno o amminofenilalchile;

R^7 è -OH o alogeno; e

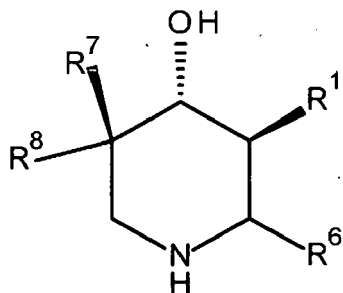
R^8 è idrogeno, alogeno o -CH₃,

a condizione che R^2 e R^3 non possano essere entrambi idrogeno quando R^4 è alogeno, e quando Z non è presente, R^7 è -OH, R^5 , R^6 e R^8 sono idrogeno;

o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile;

per uso nella prevenzione e/o nel trattamento di un disturbo da accumulo lisosomiale in un paziente a rischio di sviluppare o a cui è stato diagnosticato lo stesso.

2. Composto per uso secondo la rivendicazione 1, in cui il composto è di Formula III:



in cui

R^1 è C(R^2)(R^3)(R^4);

R^2 è idrogeno, -OH o alogeno;

R^3 è idrogeno, -OH, alogeno o -CH₃;

R^4 è alogeno, -CH₃, fenile, fluorofenile, metilfenile, cicloesilmetile, in cui quando R^4 è un alogeno R^2 e R^3 non possono essere entrambi idrogeno;

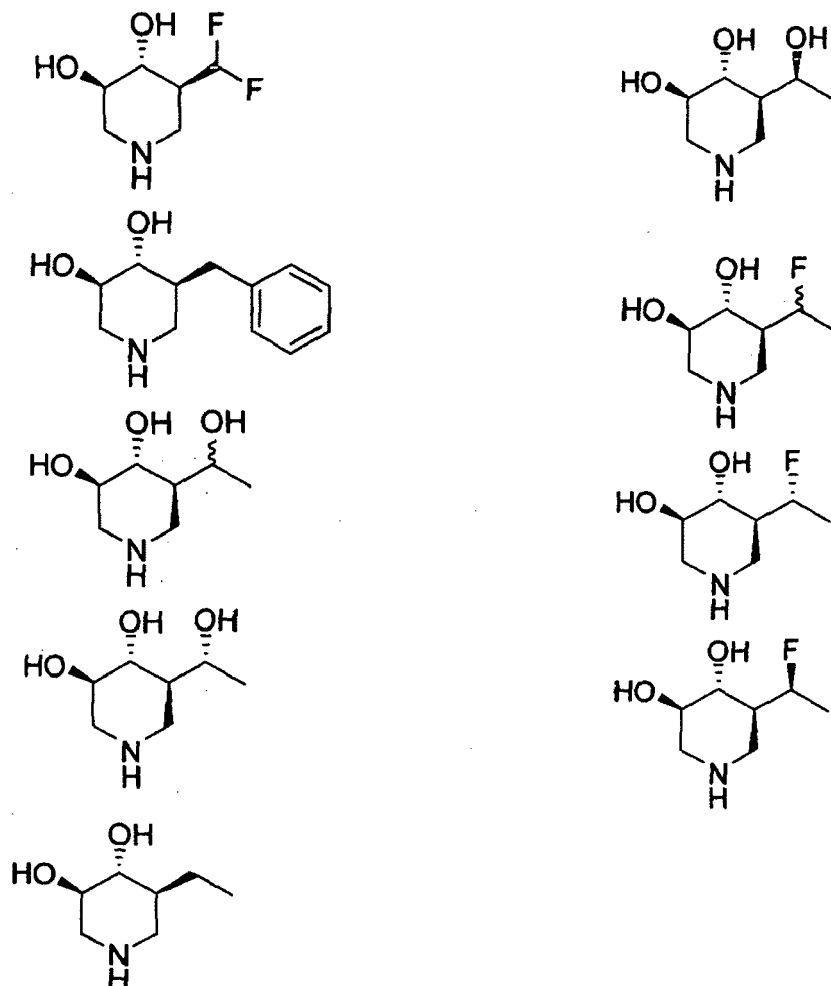
R^3 e R^4 possono unirsi all'atomo di carbonio a cui sono attaccati per formare un anello cicloalchilico, il quale può essere facoltativamente sostituito con uno o più atomi di alogeno;

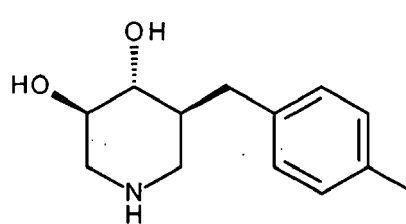
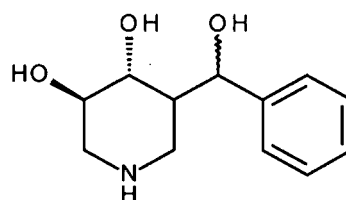
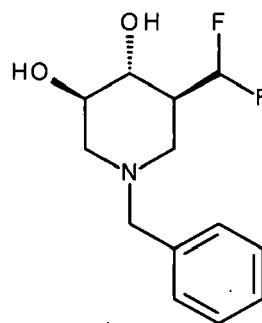
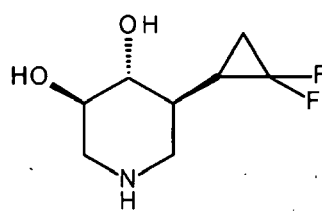
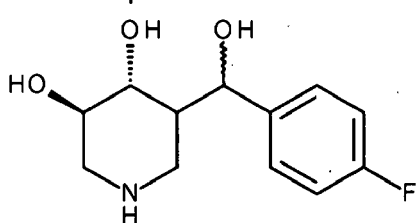
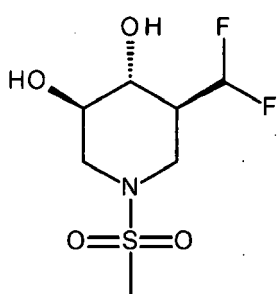
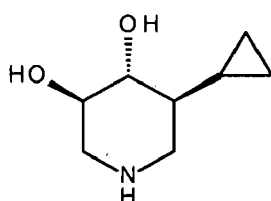
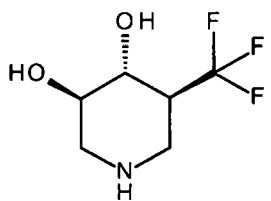
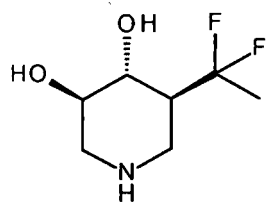
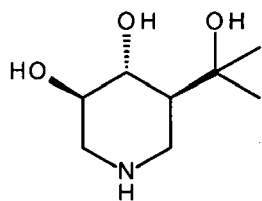
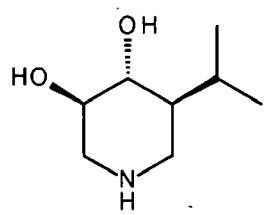
R^7 è -OH; R^6 è idrogeno; e

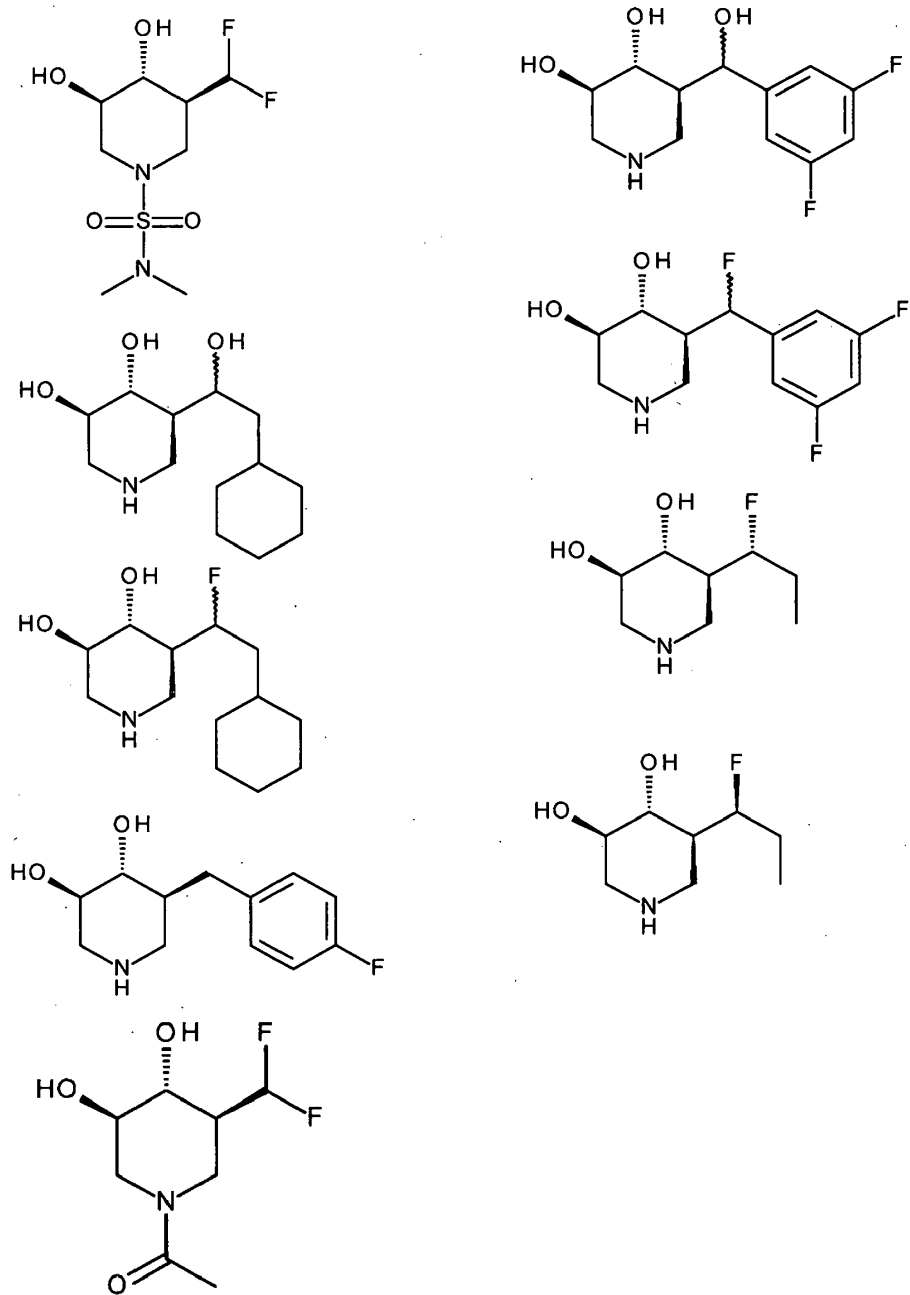
R^8 è idrogeno,

a condizione che R^2 e R^3 non possano essere entrambi idrogeno quando R^4 è alogeno.

3. Composto selezionato da:

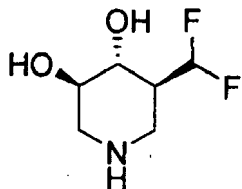






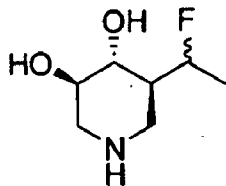
o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o qualsiasi combinazione di due o più di loro, per uso nella prevenzione e/o nel trattamento di un disturbo da accumulo lisosomiale in un paziente a rischio di sviluppare o a cui è stato diagnosticato lo stesso.

4. Composto per uso secondo la rivendicazione 3, in cui il composto è:



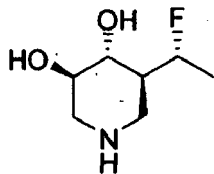
o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

5. Composto per uso secondo la rivendicazione 3, in cui il composto è:



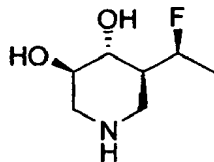
o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

6. Composto per uso secondo la rivendicazione 3, in cui il composto è:



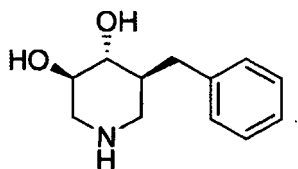
o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

7. Composto per uso secondo la rivendicazione 3, in cui il composto è:



o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

8. Composto per uso secondo la rivendicazione 3, in cui il composto è:



o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

9. Composto per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il disturbo da accumulo lisosomiale è la malattia di Neimann-Pick.

10. Composto per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui il disturbo da accumulo lisosomiale è la malattia di Gaucher.

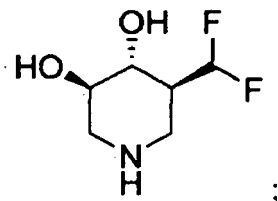
11. Composto per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in combinazione con almeno un altro agente terapeutico.

12. Composto per uso secondo la rivendicazione 11, in cui almeno un altro agente terapeutico è imiglucerasi o 1,5-(butilimmino)-1,5-dideossi-D-glucitolo.

13. Kit comprendente:

- un contenitore avente una quantità efficace di un

composto della formula:



o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile; e

- istruzioni per utilizzare lo stesso per prevenire o trattare un disturbo da accumulo lisosomiale.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.