

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 533**

51 Int. Cl.:

A01N 43/40 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2010 E 10825397 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2490533**

54 Título: **Nuevas composiciones para prevenir y/o tratar trastornos de almacenamiento lisosomal**

30 Prioridad:

19.10.2009 US 252806 P

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

04.01.2016

73 Titular/es:

**AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
1 Cedar Brook Drive
Cranbury, NJ 08512, US**

72 Inventor/es:

**BOYD, ROBERT;
LEE, GARY y
RYBCZYNSKI, PHILIP**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 555 533 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevas composiciones para prevenir y/o tratar trastornos de almacenamiento lisosomal

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona nuevos compuestos, conocidos como chaperonas farmacológicas, así como también métodos que las usan para prevenir y/o tratar trastornos de almacenamiento lisosomal. En particular, la presente invención proporciona métodos para prevenir y/o tratar la enfermedad de Gaucher.

Antecedentes de la invención

10 Los trastornos de almacenamiento lisosomal son causados por un defecto en la función lisosomal que resulta en la acumulación de sustancias dentro de los lisosomas de las células. Este defecto generalmente es consecuencia de la deficiencia de una única enzima necesaria para el metabolismo de lípido, glucógeno, glicoproteína o mucopolisacárido. La enfermedad de Gaucher, el trastorno de almacenamiento lisosomal más común, se caracteriza por la acumulación del glicolípido glucocerebrósido (también conocido como glucosilceramida). Los síntomas de la enfermedad de Gaucher incluyen hipertrofia del bazo e hígado, disfunción hepática, trastornos esqueléticos y lesiones óseas que pueden ser dolorosas, complicaciones neurológicas agudas, hinchazón de los ganglios linfáticos y (ocasionalmente) articulaciones adyacentes, abdomen distendido, una tonalidad amarillada en la piel, anemia, plaquetas bajas y depósitos grasos amarillos escleróticos. Adicionalmente, las personas que padecen la enfermedad de Gaucher pueden ser también más susceptibles a infecciones.

20 Existe la necesidad de métodos para prevenir y/o tratar trastornos de almacenamiento lisosomal que proporcionen a los pacientes una mejor calidad de vida y logren un mejor resultado clínico. En particular, existe la necesidad de métodos para prevenir y/o tratar la enfermedad de Gaucher que proporcionen a los pacientes una mejor calidad de vida y logren un mejor resultado clínico.

El documento Faugeroux *et al.*, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 4(24), 4437-4439 (2006) se refiere a compuestos que se consideran inhibidores de la glucosilceramida-sintasa y en particular describe la *N*-butil-1-desoxinojirimicina (Miglustat).

25 El documento US2004/082641 describe derivados de piperidina que se consideran útiles en el tratamiento de enfermedades cardíacas y cardiovasculares precoces.

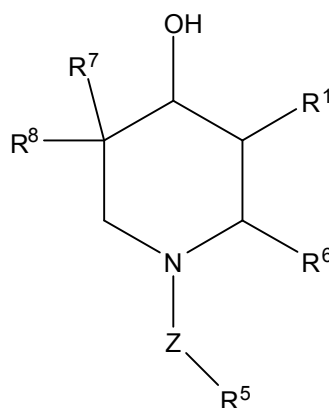
Los documentos US2008/009516 y EP1860101 describen ambos el uso de isofagomina y sus derivados para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosomal.

Compendio de la invención

30 La presente invención proporciona nuevos compuestos, así como también composiciones y métodos que los utilizan, para prevenir y/o tratar un trastorno de almacenamiento lisosomal en un paciente con riesgo de desarrollar o de que se le diagnostique esta enfermedad que incluye administrar al paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente.

35 Los expertos en la técnica comprenderán que R^2 , R^3 y R^4 en las Fórmulas II y III siguientes no se seleccionarán de forma tal que resulte una molécula inestable.

En un aspecto, se proporciona un compuesto de Fórmula II



en donde:

R^1 es $C(R^2)(R^3)(R^4)$;

R^2 es hidrógeno, -OH o halógeno;

R^3 es hidrógeno, -OH, halógeno o -CH₃;

R^4 es halógeno, -CH₃, fenilo, fluorofenilo, metilfenilo, ciclohexilmetilo, en donde cuando R^4 es un halógeno, R^2 y R^3 no pueden ser hidrógeno;

5 R^3 y R^4 pueden juntarse con el átomo de carbono al que están unidos para formar un anillo cicloalquilo, que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más átomos de halógeno;

R^6 es hidrógeno o fenilalquilo;

Z es opcional, cuando está presente Z es -(CH₂)-, -C(=O)-, -S(=O)₂NH-, -S(=O)₂-, -S(=O)₂-CH₂, C(=O)-NH-, -S(=O)₂NR⁹-, -C(=S)-NH- o -C(=O)₂-CH₂.

10 R^9 es hidrógeno o CH₃;

R^5 es hidrógeno o aminofenilalquilo;

R^7 es -OH o halógeno; y

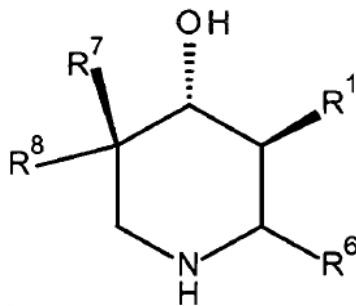
R^8 es hidrógeno, halógeno o -CH₃;

15 siempre que R^2 y R^3 no sean ambos hidrógeno cuando R^4 sea halógeno, Z no esté presente, R^7 sea -OH, R^5 , R^6 y R^8 sean hidrógeno;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este;

para su uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosomal en un paciente con riesgo de desarrollar o que se le diagnostique dicho trastorno.

En otro aspecto, se proporciona un compuesto definido por la Fórmula III:



20

en donde:

R^1 es C(R^2)(R^3)(R^4);

R^2 es hidrógeno, -OH o halógeno;

R^3 es hidrógeno, -OH, halógeno o -CH₃;

25 R^4 es halógeno, -CH₃, fenilo, fluorofenilo, metilfenilo, ciclohexilmetilo, en donde cuando R^4 es un halógeno, R^2 y R^3 no pueden ser hidrógeno;

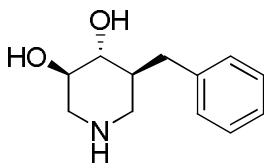
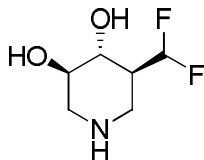
R^3 y R^4 pueden juntarse con el átomo de carbono al que están unidos para formar un anillo cicloalquilo, que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más átomos de halógeno;

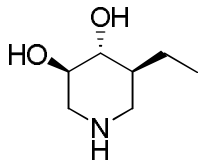
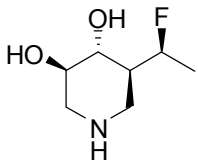
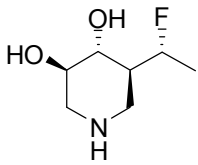
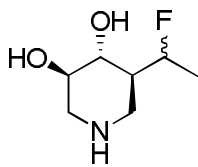
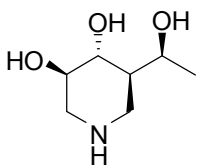
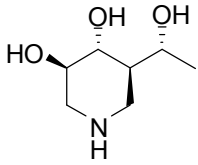
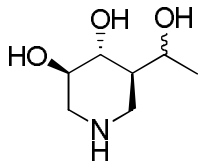
R^7 es -OH o halógeno; y

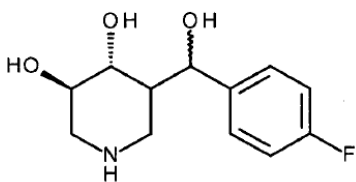
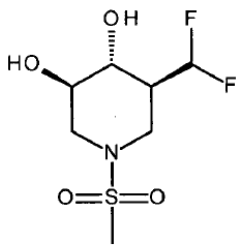
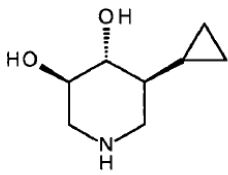
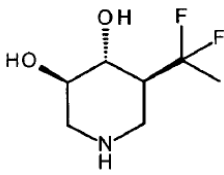
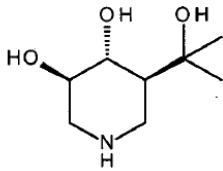
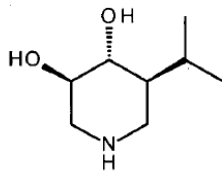
30 R^8 es hidrógeno, halógeno o -CH₃;

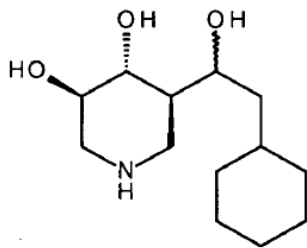
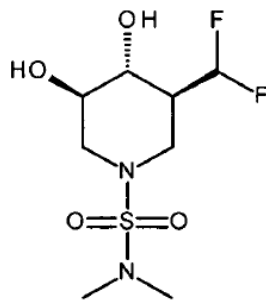
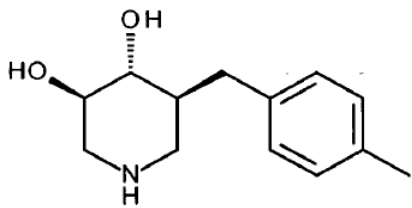
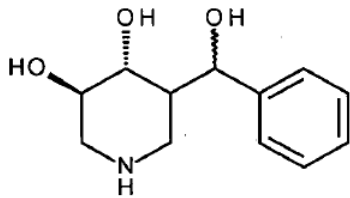
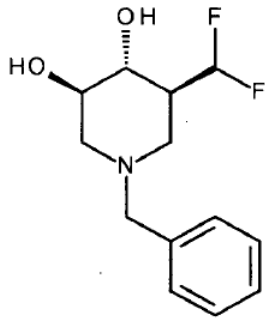
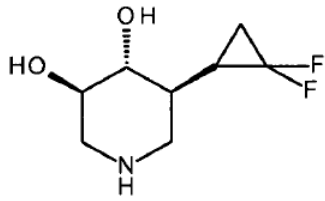
siempre que R^2 y R^3 no sean ambos hidrógeno cuando R^4 sea un halógeno, R^7 sea -OH y R^6 y R^8 sean hidrógeno;

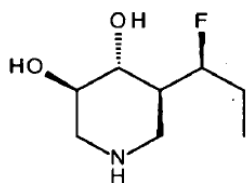
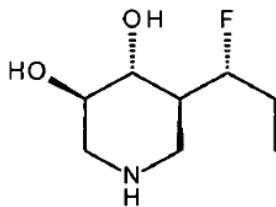
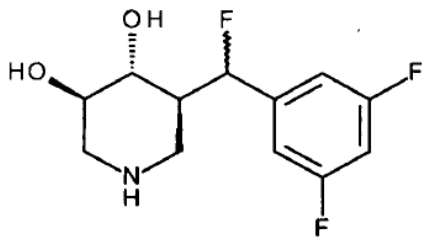
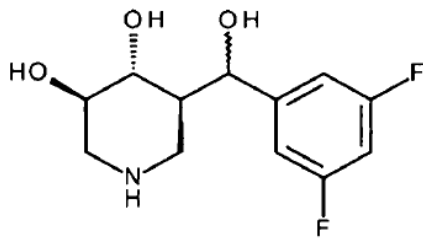
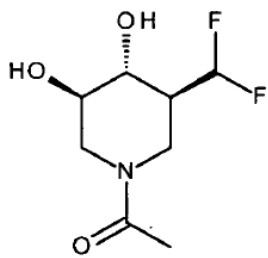
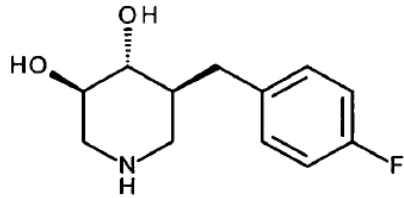
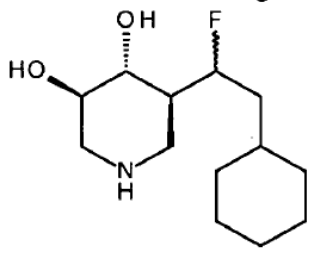
para su uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno lisosomal en un paciente con riesgo de desarrollar o que se le diagnostique dicho trastorno.











o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este, o cualquier combinación de dos o más de estos.

En una realización, el compuesto es (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de estos. En una realización, el compuesto es (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este. En una realización, el compuesto es (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este.

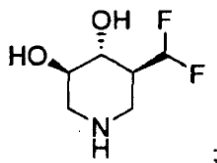
- 5 En una realización, el trastorno de almacenamiento lisosomal está asociado con la acumulación de al menos un glicolípido. En una realización, el trastorno de almacenamiento lisosomal está asociado con la acumulación de al menos un glicosfingolípido. En una realización, el trastorno de almacenamiento lisosomal está asociado con la acumulación de glucocerebrósido. En una realización, el trastorno de almacenamiento lisosomal está asociado con una deficiencia en la glucocerebrosidasa. En una realización, el trastorno de almacenamiento lisosomal está asociado con una mutación en la glucocerebrosidasa. En una realización, la enfermedad de almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Niemann-Pick. En una realización, la enfermedad de almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Gaucher. En una realización, el compuesto puede ser administrado con una cantidad efectiva de al menos otro agente terapéutico. En una realización, el o los otros agentes terapéuticos son imiglucerasa o 1,5-(butilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol.
- 10
- 15 La presente invención también proporciona compuestos como los definidos anteriormente o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de estos para prevenir y/o tratar la enfermedad de Gaucher en un paciente con riesgo de desarrollar o que se le diagnostique la misma.

- En una realización, el compuesto es (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de estos. En una realización, el compuesto es (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este. En una realización, el compuesto es (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este.
- 20

En una realización, el compuesto se administra con una cantidad efectiva de al menos otro agente terapéutico. En una realización, el o los otros agentes terapéuticos son imiglucerasa o 1,5-(butilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol.

La presente invención también proporciona kits que comprenden:

- 25
- un recipiente que tiene una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula:



- o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este; e
- instrucciones para usarlo para prevenir y/o tratar un trastorno de almacenamiento lisosomal.

En una realización, el trastorno de almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Gaucher.

- 30 La presente invención también proporciona 5-(fluorometil)piperidina-3,4-diol, 5-(clorometil)piperidina-3,4-diol, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de estos, o cualquier combinación de dos o más de estos para su uso en un método para mejorar la actividad de la glucocerebrosidasa en una célula *ex vivo*.

Descripción detallada de la invención

Tal como se utilizan en la presente, los siguientes términos tendrán las definiciones establecidas más abajo.

- 35 Tal como se utiliza en la presente, el término "tratar" significa mejorar uno o más de los síntomas asociados al trastorno de referencia.

Tal como se utiliza en la presente, el término "prevenir" significa mitigar un síntoma del trastorno de referencia.

- 40 Tal como se utiliza en la presente, la frase "una cantidad efectiva" significa una cantidad efectiva para prevenir y/o tratar un paciente con riesgo de desarrollar o de que se le diagnostique el trastorno de referencia y así producir el efecto terapéutico deseado.

Tal como se utiliza en la presente, el término "paciente" significa un mamífero (por ejemplo, un humano).

- 45 Tal como se usa en la presente la frase "trastorno de almacenamiento lisosomal" se refiere a cualquiera de un grupo de enfermedades resultantes del metabolismo anormal que resulta en la acumulación de un sustrato en el lisosoma. La Tabla 1 contiene una lista no taxativa de trastornos de almacenamiento lisosomal ejemplares y su enzima defectuosa asociada.

TABLA 1 Trastornos de almacenamiento lisosomal

	Trastorno de almacenamiento lisosomal	Enzima defectuosa
	Enfermedad de Pompe	α -Glucosidasa ácida
	Enfermedad de Gaucher	β -Glucosidasa ácida o Glucocerebrosidasa
	Enfermedad de Fabry	α -Galactosidasa A
5	G _{M1} -gangliosidosis	β -Galactosidasa ácida
	Enfermedad de Tay-Sachs	β -Hexosaminidasa A
	Enfermedad de Sandhoff	β -Hexosaminidasa B
	Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa ácida
	Enfermedad de Krabbe	Galactocerebrosidasa
10	Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida
	Leucodistrofia metacromática	Ariilsulfatasa A
	Enfermedad de Hurler-Scheie	α -L-Iduronidasa
	Enfermedad de Hunter	Iduronato-2-sulfatasa
	Enfermedad de Sanfilippo A	Heparán N-sulfatasa
15	Enfermedad de Sanfilippo B	α -N-Acetilglucosaminidasa
	Enfermedad de Sanfilippo C	Acetil-CoA: α -glucosaminida N-acetiltransferasa
	Enfermedad de Sanfilippo D	N-Acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa
20	Enfermedad de Morquio A	N-Acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa
	Enfermedad de Morquio B	β -galactosidasa ácida
	Enfermedad de Maroteaux-Lamy	Ariilsulfatasa B
	Enfermedad de Sly	β -Glucuronidasa
	alfa.-Mannosidosis	α -Mannosidasa ácida
	beta.-Mannosidosis	β -Mannosidasa ácida
25	Fucosidosis	α -L-fucosidasa ácida
	Sialidosis	Sialidasa
	Enfermedad de Schindler-Kanzaki	α -N-acetilgalactosaminidasa

El trastorno de almacenamiento lisosomal más común, la enfermedad de Gaucher, se caracteriza por la acumulación del glicolípido glucocerebrósido (también conocido como glucosilceramida). Se han descrito tres fenotipos para la enfermedad de Gaucher que se indican por la ausencia (tipo 1) o presencia de participación neurológica durante la infancia (tipo 2) o la adolescencia (tipo 3). Por ejemplo, ver Grabowski, Gaucher's disease. *Adv Hum Genet* 1993; 21:377-441.

Los tres tipos de enfermedad de Gaucher se heredan en un modo autosómico recesivo. Ambos padres deben ser portadores para afectar al niño. Si ambos padres son portadores, hay una en cuatro, o 25%, de posibilidades en cada embarazo de afectar al niño. Se recomienda asesoramiento genético y pruebas genéticas a las familias que pueden ser portadoras de mutaciones. Cada tipo está ligado a mutaciones particulares. En total, hay aproximadamente 80 mutaciones conocidas que conducen a la enfermedad de Gaucher (ver, por ejemplo, McKusick, V.A.: *Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12.^a edición)).

La enfermedad de Gaucher Tipo 1 es panétnica, pero es especialmente frecuente entre personas de ascendencia judía ashkenazí, con una tasa de portadores de 1 en 17 judíos ashkenazí. Las mutaciones N370S y 84GG son las mutaciones más frecuentes en el gen glucocerebrosidasa entre los judíos ashkenazí, con tasas de 1 en 17,5 para N370S y 1 en 400 para 84GG en la población ashkenazí general sana y están asociadas con la enfermedad de Gaucher leve y aguda, respectivamente. La mutación 84GG ocurre casi exclusivamente entre los judíos ashkenazí. Otras variantes raras del gen glucocerebrosidasa identificadas en pacientes de ascendencia ashkenazí con la enfermedad de Gaucher incluyen L444P, IVS2+1G→A, V394L y R496H. A diferencia de la presentación de la enfermedad de Gaucher Tipo 1 en los judíos ashkenazí, la enfermedad de Gaucher Tipo 1 tiende a ser aguda y progresiva en pacientes japoneses (ver, 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). Adicionalmente, la enfermedad de Gaucher Tipo 3, asociada con una o dos copias de la variante L444P del gen glucocerebrosidasa es frecuente en pacientes suecos de la región de Norrbotten.

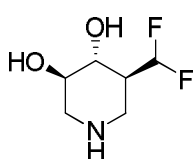
Un diagnóstico definitivo de la enfermedad de Gaucher se hace con pruebas genéticas. Como hay numerosas mutaciones diferentes, a veces es necesaria la secuenciación del gen glucocerebrosidasa para confirmar el diagnóstico. El diagnóstico prenatal está disponible y es útil cuando hay un factor de riesgo genético conocido. Sin embargo, un diagnóstico de la enfermedad de Gaucher también puede suponerse por anomalías bioquímicas tales como altos niveles de fosfatasa alcalina, enzima convertidora de angiotensina (ACE) e inmunoglobulina, o mediante un análisis celular que muestre un citoplasma con aspecto de "papel arrugado" y macrófagos cargados de glicolípidos. Particularmente, la enfermedad de Niemann-Pick es similar en que se caracteriza por la acumulación de G_{M2}-gangliósidos y G_{M1}-gangliósidos, además del glucocerebrósido (Vanier et al., *Brain Pathology*. 1998; 8: 163-74).

Los síntomas de la enfermedad de Gaucher incluyen los siguientes:

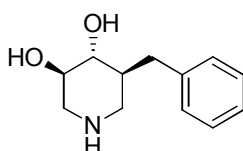
- Hepatomegalia y esplenomegalia indoloras (el tamaño del bazo puede ser 1500-3000 ml, en comparación con el tamaño normal de 50-200 ml)
- Hiperesplenismo: la destrucción rápida y prematura de células sanguíneas que conduce a anemia, neutropenia y trombocitopenia (con un riesgo aumentado de infección y hemorragia)
- 5 • Cirrosis del hígado, aunque rara
- Los síntomas neurológicos ocurren solo en algunos tipos de Gaucher (ver a continuación):
 - Tipo II: convulsiones graves, hipertensión, retardo mental, apnea.
 - Tipo III: espasmos musculares conocidos como mioclono, convulsiones, demencia, apraxia muscular ocular.
- 10 • Osteoporosis: 75% desarrollan anomalías óseas visibles debido a la acumulación de glucosilceramida. Se describe comúnmente una deformidad del fémur distal en la forma de un matraz Erlenmeyer.
- Pigmentación amarillenta-marrón de la piel

Compuestos

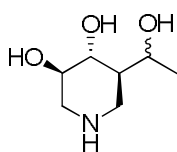
A continuación se proporcionan nuevos compuestos de la presente invención:



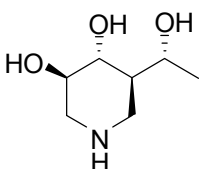
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol



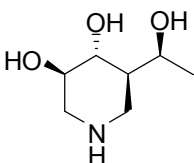
(3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol



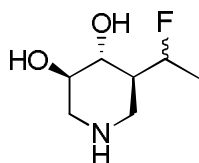
(3R,4R,5R)-5-(1-hidroxietil)piperidina-3,4-diol



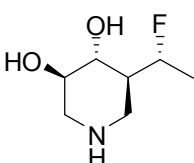
(3R,4R,5R)-5-(1-hidroxietil)piperidina-3,4-diol
(estereoisómero A)



(3R,4R,5R)-5-(1-hidroxietil)piperidina-3,4-diol
(estereoisómero B)

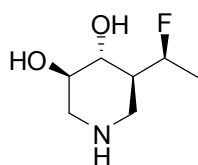


(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol

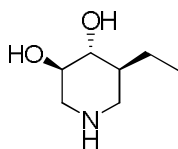


(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol (estereoisómero A)

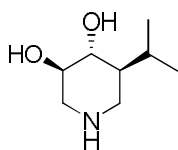
ES 2 555 533 T3



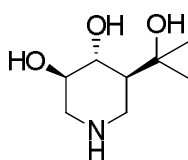
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol (estereoisómero B)



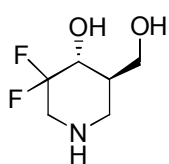
(3R,4R,5S)-5-etilpiperidina-3,4-diol



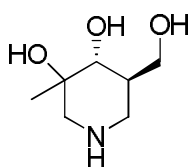
(3R,4R,5S)-5-isopropilpiperidina-3,4-diol



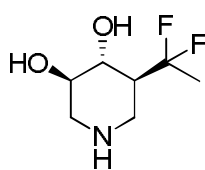
(3R,4R,5S)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)piperidina-3,4-diol



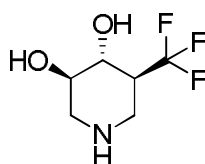
(4R,5R)-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)piperidin-4-ol



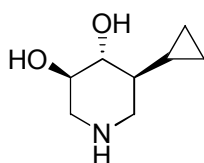
(4R,5R)-5-(hidroximetil)-3-metilpiperidina-3,4-diol



(3R,4R,5S)-5-(1,1-difluoroetil)piperidina-3,4-diol

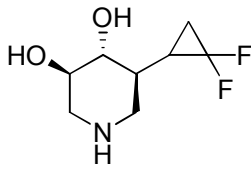


(3R,4R,5S)-5-(trifluorometil)piperidina-3,4-diol

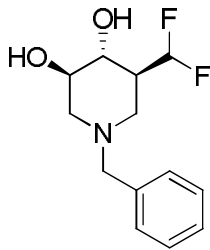


(3R,4R,5S)-5-ciclopropilpiperidina-3,4-diol

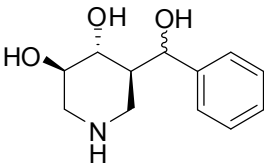
ES 2 555 533 T3



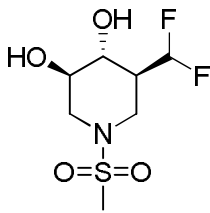
(3R,4R,5S)-5-(2,2-difluorociclopropil)piperidina-3,4-diol



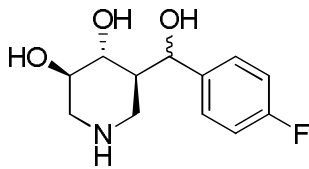
(3R,4R,5S)-1-bencil-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol



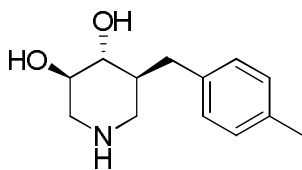
(3R,4R,5R)-5-((S)-hidroxi(fenilo)metil)piperidina-3,4-diol



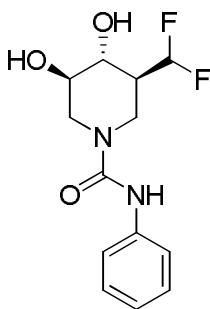
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-1-(metilsulfonilo)piperidina-3,4-diol



(3R,4R,5R)-5-((4-fluorofenilo)(hidroxi)metil)piperidina-3,4-diol

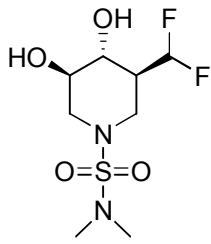


(3R,4R,5S)-5-(4-metilbencil)piperidina-3,4-diol

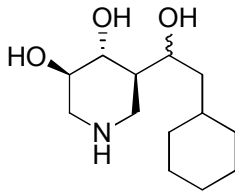


(3S,4R,5R)-3-(difluorometil)-4,5-dihidroxi-N-fenilpiperidina-1-carboxamida

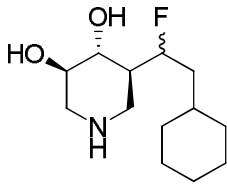
ES 2 555 533 T3



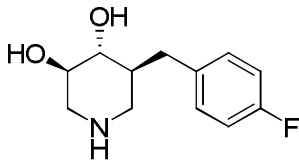
(3S,4R,5R)-3-(difluorometil)-4,5-dihidroxi-N,N-dimetilpiperidina-1-sulfonamida



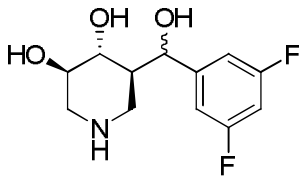
(3R,4R,5R)-5-(2-ciclohexil-1-hidroxi)etil)piperidina-3,4-diol



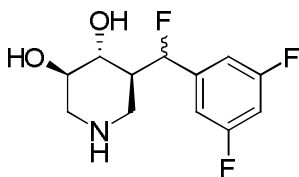
(3R,4R,5S)-5-(2-ciclohexil-1-fluoro)etil)piperidina-3,4-diol



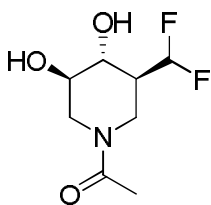
(3R,4R,5S)-5-(4-fluorobencil)piperidina-3,4-diol



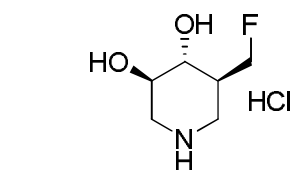
(3R,4R,5R)-5-((3,5-difluorofenilo)(hidroxi)metil)piperidina-3,4-diol



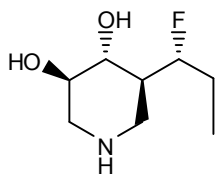
(3R,4R,5S)-5-((3,5-difluorofenilo)fluorometil)piperidina-3,4-diol



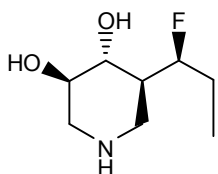
1-((3S,4R,5R)-3-(difluorometil)-4,5-dihidroxi)etanol



(3R,4R,5S)-5-(fluorometil)piperidina-3,4-diol clorhidrato



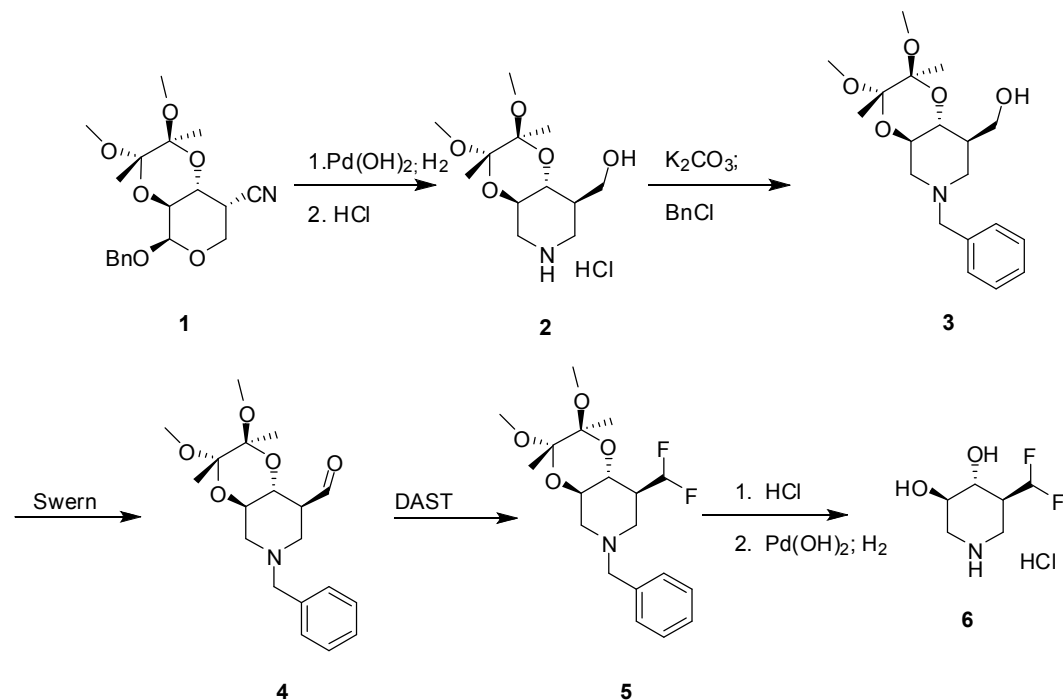
(3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol clorhidrato



(3R,4R,5S)-5-((S)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol clorhidrato

Proceso químico

Las composiciones de la presente invención pueden obtenerse de acuerdo con uno o más de los siguientes esquemas.

Esquema de proceso 1:**((2S,3S,4aR,8R,8aR)-2,3-Dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridin-8-il)metanol clorhidrato (2).**

Se combinó una solución de 1 (20,0 g, 55,0 mmol) en MeOH (500 mL) con Pd(OH)₂ (4-6 g) y formiato de amonio (14 g, 220 mmol) y la mezcla se calentó a 50-55°C. Se agregaron cantidades adicionales (3x100,0 mmol) de formiato de amonio en las siguientes 8 hrs. Después de la adición final, la mezcla de reacción se agitó adicionalmente y se calentó otras 16 hrs a 50-55°C. El catalizador se retiró mediante filtración y el filtrado se evaporó al vacío. El producto bruto se disolvió en acetona (150 mL), se filtró y se agregó HCl en 2-PrOH. Después de sembrar y luego enfriar en un baño de hielo, el producto se recogió como un sólido cristalino blanco (11,0 g, 71%). ¹H RMN (DMSO-d₆) 9,45 (s, 2H), 4,80 (t, 1H, ex), 3,85 (m, 1H), 3,0-3,75 (m, 11H), 2,8 (q, 2H), 1,95 (m, 1H), 1,2 (2, 6H).

((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Bencil-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridin-8-il)metanol (3).

A una solución de 2 (14,85 g, 50,0 mmol) en DMF (200 mL) se agregó K₂CO₃ (17,25 g, 125 mmol) y la mezcla se agitó a 40°C durante aproximadamente 4 hrs. En este momento se agregó BnCl (5,7 mL, 50,0 mmol) en una porción y la reacción se agitó a 40°C durante toda la noche. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se suspendió en agua (600 mL) y se agregó HCl para disolver el residuo. La solución se lavó con Et₂O y luego se basificó con Na₂CO₃. La solución se extrajo con EtOAc (2x) y los extractos combinados se lavaron con agua y luego con salmuera y luego se secaron sobre MgSO₄. La solución se filtró y el filtrado se evaporó al vacío para proporcionar el compuesto del título (17,2 g, >95%) como un aceite viscoso incoloro a amarillo pálido que se utilizó sin purificación adicional. ¹H RMN

(CDCl₃) 7,3 (m, 5H), 3,6-3,8 (m, 2H), 3,5 (s, 3H), 3,4 (t, 1H), 3,26 (s, 3H), 3,268 (s, 3H), 2,9 (m, 2H), 2,2 (br s, 1H), 2,05 (m, 1H), 1,85 (t, 1H), 1,28 (s, 3H), 1,26 (s, 3H).

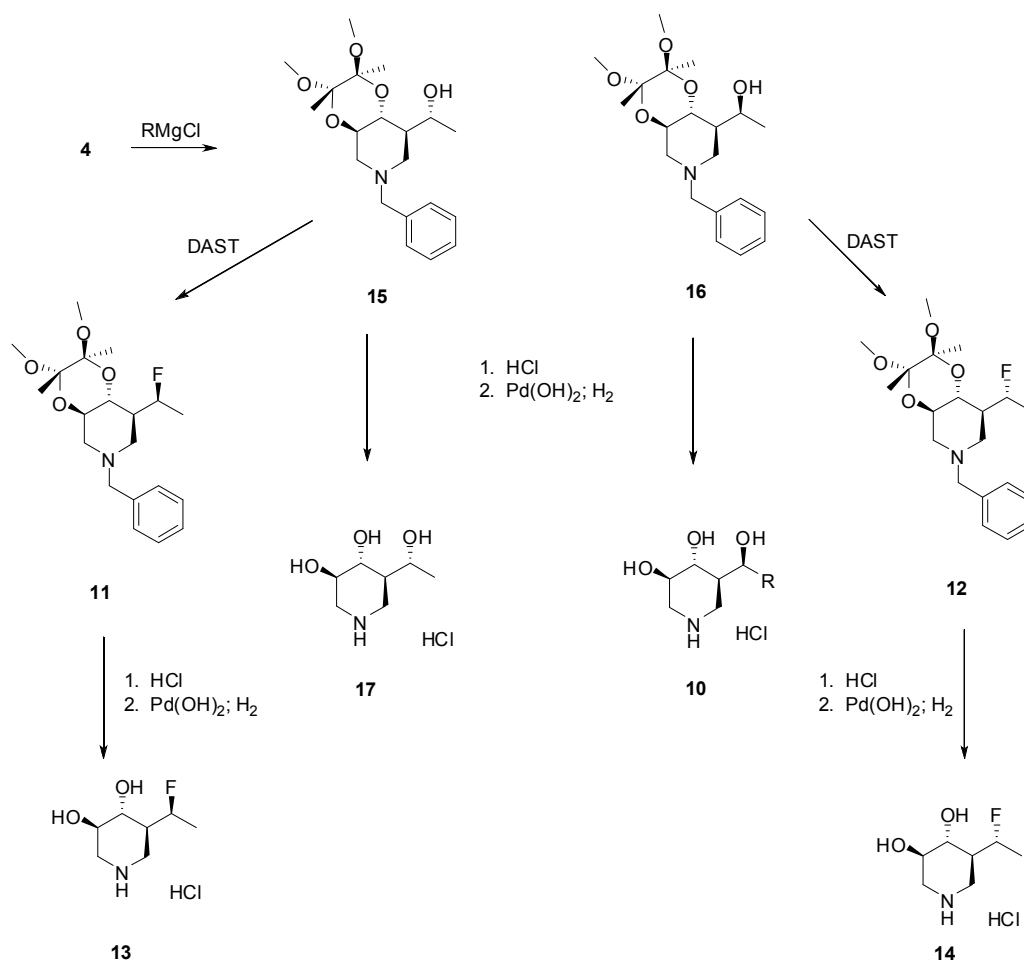
((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Bencil-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridin-8-il)carboxaldehído (Procedimiento General A) (4).

5 A una solución de DMSO (7,3 g, 96,9 mmol) en CH₂Cl₂ (150 mL) enfriada hasta alcanzar -78°C se agregó una solución de cloruro de oxalilo (6,1 mL, 72,8 mmol) en CH₂Cl₂ gota a gota. Después de que se completó la adición la mezcla de reacción se agitó durante 30 min adicionales, momento en el cual se agregó gota a gota una solución de 3 (17,0 g, 48,4 mmol) en CH₂Cl₂. Una vez completada la adición, la reacción se agitó durante 1 hr a -78°C y luego se agregó gota a gota diisopropiletilamina (34,4 mL, 193 mmol). Una vez completada esta adición se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla de reacción se dejó entibiar hasta alcanzar 0°C, momento en el cual se agregó NaHCO₃ saturado. La mezcla se diluyó con algo de CH₂Cl₂ adicional y luego la capa orgánica se separó y se secó sobre MgSO₄. Después de filtrar, el disolvente se evaporó al vacío y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (Hex/EtOAc) para proporcionar el compuesto del título (12,7 g, 75%) como un aceite viscoso. ¹H RMN (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).

((2S,3S,4aR,8S,8aR)-6-Bencil-8,8-difluorometil-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridina Clorhidrato (Procedimiento General B) (5).

15 A una solución de DAST (1,4 mL, 10,3 mmol) en CH₂Cl₂ (50 mL) enfriada hasta alcanzar -15°C se agregó una solución de 4 (2,4 g, 6,9 mmol) gota a gota. Después de 10 minutos se retiró el baño de hielo y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. En este momento la mezcla de reacción se enfrió nuevamente en un baño de hielo y la reacción se aplacó mediante adición de NaHCO₃ saturado (gota a gota al comienzo dado que esto produce una leve exotermia). La capa orgánica se separó y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó al vacío para proporcionar un aceite amarillo. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (Hex/EtOAc) para proporcionar el compuesto del título (1,6 g, 62%) como un aceite incoloro. ¹H RMN (CDCl₃) 7,2 (m, 5H), 6,0 (dt, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,55 (m, 3H), 3,2 (2s, 6H), 2,95 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,3 (m, 2H), 1,5 (br s, 1H), 1,2 (2s, 6H).

25 **(3R,4R, 5S)-5-(Difluorometil)piperidina 3,4-diol Clorhidrato (Procedimiento General C) (6).** El compuesto 5 (1,6 g, 4,3 mmol) se calentó a reflujo en una mezcla de EtOH/H₂O/HCl (40 mL/40 mL/5 mL) y la reacción se controló mediante HPLC hasta que el material de partida ya no pudo detectarse. El disolvente se evaporó al vacío y luego se coevaporó 2x con EtOH. El residuo se disolvió en MeOH y se hidrogenó sobre Pd(OH)₂. Cuando se completó, el catalizador se retiró mediante filtración y el filtrado se evaporó al vacío. El residuo se recristalizó a partir de EtOH (50 mL) para obtener el compuesto del título (0,55 g, 66%) como un sólido blanco (pf 168-170°C). ¹H RMN (D₂O) 6,15 (dt, 1H), 4,3-4,8 (m, 2H), 3,0 (t, 1H), 2,85 (t, 1H), 2,3 (m, 1H).



(R)y(S)-1-((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Bencil-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridin-8-il)etanol

Procedimiento General D (15/16). A una solución de **4** (7,0 g, 20,0 mmol) en THF seco (100 mL) se agregó MeMgBr (20,0 mL, 1,4 M en 3:1 THF/tolueno) y la reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se aplacó con NH_4Cl saturado y la mezcla se extrajo con EtOAc (2x). Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y el filtrado se evaporó al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (hexano/2- PrOH) para proporcionar el isómero principal (**15**) (1,6 g, 24,6%). ^1H RMN (CDCl_3) 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). También se aisló el isómero menor (**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, 1H), 1,75 (m, 2H), 1,2 (2s, 6H), 1,0 (d, 3H).

(3R,4R, 5R)-5((R)-1-Hidroxietil)piperdina 3,4-diol (17**).** Se agitó el compuesto **15** (0,55 g, 1,5 mmol) en una mezcla de 9/1 TFA:H $_2$ O (20 mL) hasta que el material de partida ya no pudo detectarse mediante HPLC. Los volátiles se retiraron y el residuo se coevaporó 2-3x con EtOH y luego se disolvió en EtOH y se trató con K_2CO_3 sólido. Después de filtrar el sólido, el filtrado se evaporó al vacío y el residuo se convirtió en una sal HCl y se hidrogenó sobre Pd(OH)_2 . El catalizador se filtró y el filtrado se evaporó al vacío. El producto bruto se purificó utilizando una resina de intercambio iónico (Dowex 50WX8-200) eluyendo con NH_4OH 0,1 N. Las fracciones apropiadas se combinaron y liofilizaron para proporcionar el compuesto del título (0,12 g, 50%). ^1H RMN (D_2O) 4,2 (q, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,45 (m, 3H), 2,8 (m, 2H), 1,65 (m, 1H), 1,15 (d, 3H).

(3R,4R, 5R)-5((S)-1-Hidroxietil)piperdina 3,4-diol (10**).** El compuesto **16** (0,34 g, 0,93 mmol) se desprotegió como se describió anteriormente para proporcionar el compuesto del título (0,11 g, 75%). ^1H RMN (D_2O) 4,15 (m, 2H), 3,5 (m, 1H), 3,35 (t, 1H), 3,15 (m, 2H), 1,8 (m, 1H), 1,1 (d, 3H).

((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Bencil-8(S)-(1-fluoroetil)-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridina (11**).** El compuesto **15** (1,8 g, 5,0 mmol) se fluoró utilizando el Procedimiento General B. La cromatografía en gel de sílice (Hex/ EtOAc) proporcionó el compuesto del título (0,42 g, 23%). ^1H RMN (CDCl_3) 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).

(3R,4R, 5R)-5((S)-1-Fluoroetil)piperdina 3,4-diol Clorhidrato (13**).** El compuesto **11** (0,42 g, 1,14 mmol) se desprotegió como se describe en el Procedimiento General C. Después de retirar el catalizador, el filtrado se evaporó al vacío y luego se coevaporó con EtOH (2x). El residuo resultante se trituró con acetona para proporcionar

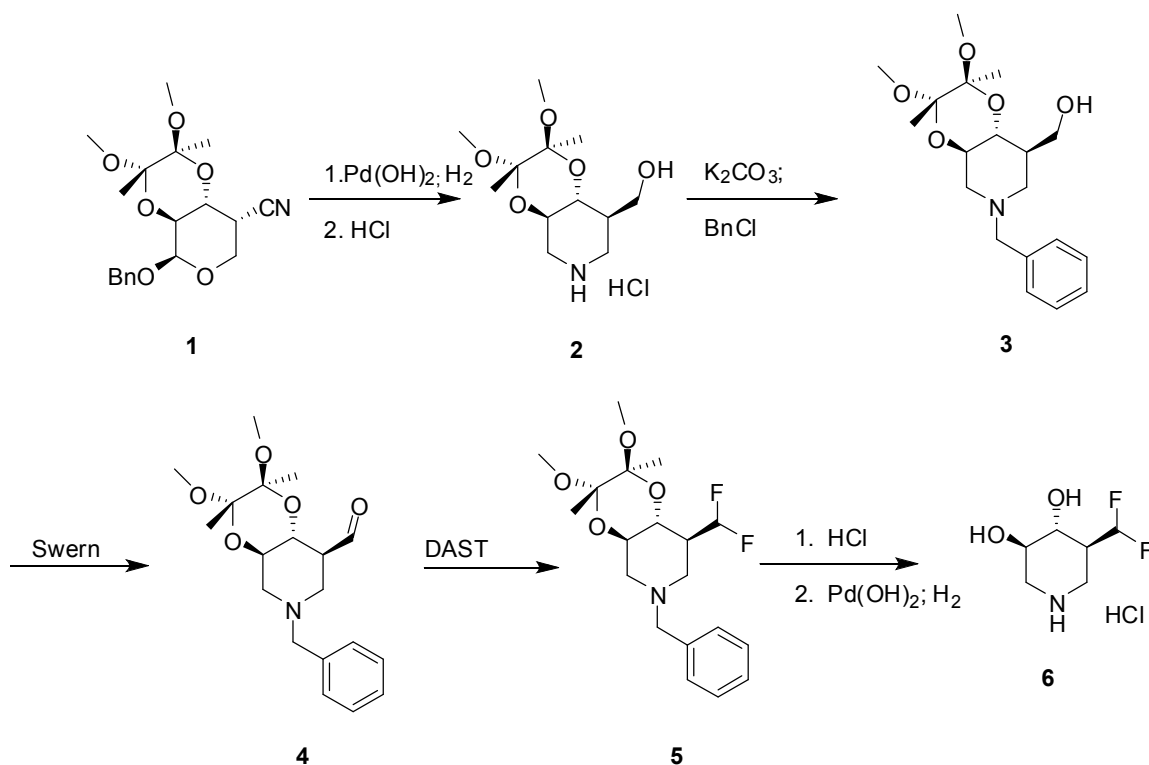
el compuesto del título (0,20 g, 88%) como un sólido blanco. ^1H RMN (DMSO- d_6) 9,0 (br s, 2H), 5,6 (d, 1H, ex), 5,4 (d, 1H, ex), 5,0-5,2 (dq, 1H), 3,55 (m, 1H), 3,2 (m, 2H), 2,9 (t, 1H), 2,7 (t, 1H), 2,2 (m, 1H), 1,3 (dd, 3H).

((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Bencil-8(R)-(1-fluoroetil)-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridina

5 **(12)**. El compuesto 16 (0,55 g, 1,5 mmol) se fluoró utilizando el Procedimiento General B para proporcionar el compuesto del título (0,22 g, 40%). ^1H RMN (CDCl_3) 7,3 (m, 5H), 5,0 (dq, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,5-3,75 (m, 3H), 3,3 (2s, 6H), 3,0 (d, 1H), 2,9 (m, 1H), 2,1 (m, 2H), 1,85 (m, 1H), 1,3 (2s, 6H).

10 **(3R,4R, 5R)-5((R)-(1-Fluoroetil)piperidina 3,4-diol Clorhidrato (1H)**. El compuesto 12 (0,22 g, 0,6 mmol) se desprotegió como se describe en el Procedimiento General C. Después de retirar el catalizador, el filtrado se evaporó al vacío y luego se coevaporó con EtOH (2x). El residuo resultante se trituró con acetona para proporcionar el compuesto del título (0,08 g, 67%) como un sólido blanco. ^1H RMN (D_2O) 5,1 (dq, 1H), 3,5 (m, 4H), 2,8 (m, 2H), 1,8 (m, 1H), 1,3 (dd, 3H).

Esquema de proceso 2:



15 **((2S,3S,4aR,8R,8aR)-2,3-Dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridin-8-il)metanol Clorhidrato (2)**. Una solución de 1 (20,0 g, 55,0 mmol) en MeOH (500 mL) se combinó con $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (4-6 g) y formiato de amonio (14 g, 220 mmol) y la mezcla se calentó a 50-55°C. Se agregaron cantidades adicionales (3x100,0 mmol) de formiato de amonio en las siguientes 8 hrs. Después de la adición final, la mezcla de reacción se agitó adicionalmente y se calentó otras 16 hrs a 50-55°C. El catalizador se retiró mediante filtración y el filtrado se evaporó al vacío. El producto bruto se disolvió en acetona (150 mL), se filtró y se agregó HCl en 2-PrOH. Después de añadir gérmenes cristalinos y luego enfriar en un baño de hielo, el producto se recogió como un sólido cristalino blanco (11,0 g, 71%). ^1H RMN (DMSO- d_6) 9,45 (s, 2H), 4,80 (t, 1H, ex), 3,85 (m, 1H), 3,0-3,75 (m, 11H), 2,8 (q, 2H), 1,95 (m, 1H), 1,2 (2, 6H).

25 **((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Bencil-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridin-8-il)metanol (3)**. A una solución de 2 (14,85 g, 50,0 mmol) en DMF (200 mL) se agregó K_2CO_3 (17,25 g, 125 mmol) y la mezcla se agitó a 40°C durante aproximadamente 4 hrs. En este momento se agregó BnCl (5,7 mL, 50,0 mmol) en una porción y la reacción se agitó a 40°C durante toda la noche. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se suspendió en agua (600 mL) y se agregó HCl para disolver el residuo. La solución se lavó con Et_2O y luego se basificó con Na_2CO_3 . La solución se extrajo con EtOAc (2x) y los extractos combinados se lavaron con agua y luego con salmuera y luego se secaron sobre MgSO_4 . La solución se filtró y el filtrado se evaporó al vacío para proporcionar el compuesto del título (17,2 g, >95%) como un aceite viscoso incoloro a amarillo pálido que se utilizó sin purificación adicional. ^1H RMN (CDCl_3) 7,3 (m, 5H), 3,6-3,8 (m, 2H), 3,5 (s, 3H), 3,4 (t, 1H), 3,26 (s, 3H), 3,268 (s, 3H), 2,9 (m, 2H), 2,2 (br s, 1H), 2,05 (m, 1H), 1,85 (t, 1H), 1,28 (s, 3H), 1,26 (s, 3H).

((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-Bencil-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridin-8-il)carboxaldehído

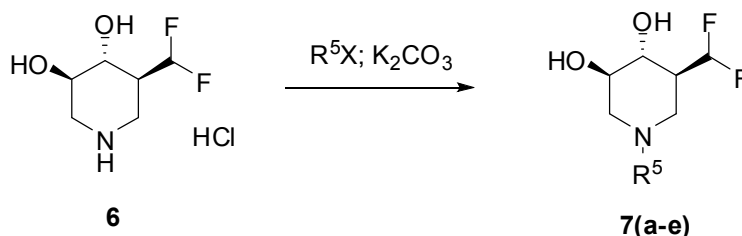
(Procedimiento General A) (4). A una solución de DMSO (7,3 g, 96,9 mmol) en CH₂Cl₂ (150 mL) enfriada hasta alcanzar -78°C se agregó una solución de cloruro de oxalilo (6,1 mL, 72,8 mmol) en CH₂Cl₂ gota a gota. Después de que se completó la adición la mezcla de reacción se agitó durante 30 min adicionales, momento en el que se agregó gota a gota una solución de **3** (17,0 g, 48,4 mmol) en CH₂Cl₂. Una vez completada la adición, la reacción se agitó durante 1 hr a -78°C y luego se agregó gota a gota diisopropiletamina (34,4 mL, 193 mmol). Una vez completada esta adición, el baño de enfriamiento se retiró y la mezcla de reacción se dejó entibiar hasta alcanzar 0°C, momento en el que se agregó NaHCO₃ saturado. La mezcla se diluyó con algo de CH₂Cl₂ adicional y luego la capa orgánica se separó y se secó sobre MgSO₄. Después de filtrar, el disolvente se evaporó al vacío y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (Hex/EtOAc) para proporcionar el compuesto del título (12,7 g, 75%) como un aceite viscoso. ¹H RMN (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).

((2S,3S,4aR,8S,8aR)-6-Bencil-8,8-difluorometil-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridina

Clorhidrato (Procedimiento General B) (5). A una solución de DAST (1,4 mL, 10,3 mmol) en CH₂Cl₂ (50 mL) enfriada hasta alcanzar -15°C se agregó una solución de **4** (2,4 g, 6,9 mmol) gota a gota. Después de 10 minutos se retiró el baño de hielo y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. En este momento la mezcla de reacción se enfrió nuevamente en un baño de hielo y la reacción se aplacó mediante adición de NaHCO₃ saturado (gota a gota al comienzo ya que esto produce una leve exotermia). La capa orgánica se separó y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó al vacío para proporcionar un aceite amarillo. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (Hex/EtOAc) para proporcionar el compuesto del título (1,6 g, 62%) como un aceite incoloro. ¹H RMN (CDCl₃) 7,2 (m, 5H), 6,0 (dt, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,55 (m, 3H), 3,2 (2s, 6H), 2,95 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,3 (m, 2H), 1,5 (br s, 1H), 1,2 (2s, 6H).

(3R,4R, 5S)-5-(Difluorometil)piperidina 3,4-diol Clorhidrato (Procedimiento General C) (6).

El **compuesto 5** (1,6 g, 4,3 mmol) se calentó a reflujo en una mezcla de EtOH/H₂O/HCl (40 mL/40 mL/5 mL) y la reacción se controló mediante HPLC hasta que el material de partida no pudo detectarse. El disolvente se evaporó al vacío y luego se coevaporó 2x con EtOH. El residuo se disolvió en MeOH y se hidrogenó sobre Pd(OH)₂. Cuando se completó, el catalizador se retiró mediante filtración y el filtrado se evaporó al vacío. El residuo se recrystalizó a partir de EtOH (50 mL) para obtener el compuesto del título (0,55 g, 66%) como un sólido blanco (pf 168-170°C). ¹H RMN (D₂O) 6,15 (dt, 1H), 4,3-4,8 (m, 2H), 3,0 (t, 1H), 2,85 (t, 1H), 2,3 (m, 1H).

**(3R,4R, 5S)-1-Butil-5-(difluorometil)piperidina 3,4-diol (Procedimiento General D) (7a; R⁵ = Bu).**

Una mezcla de **6** (0,30 g, 1,4 mmol), K₂CO₃ (0,48 g, 3,5 mmol) y BuBr (0,20 g, 1,4 mmol) se combinó en DMF (10 mL) y se calentó durante toda la noche a 60°C. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con agua y luego con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. Después de la filtración, el filtrado se evaporó al vacío para proporcionar el producto bruto que se purificó mediante cromatografía (CH₂Cl₂/(9:1) MeOH/NH₄OH) para proporcionar el compuesto del título (0,25 g, 80%) como un jarabe incoloro. MH⁺ = 224. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 6,2 (t, 1H, J = 57 Hz), 5,13 (d, 1H, ex), 4,91 (d, 1H, ex), 3,3 (m, 1H), 3,1 (m, 1H), 2,9 (m, 2H), 2,3 (m, 2H), 1,95 (m, 2H), 1,75 (t, 1H), 1,2-1,5 (2 m, 4H), 0,9 (t, 3H).

(3R,4R, 5S)-1-Alil-5-(difluorometil)piperidina 3,4-diol (7b; R⁵ = alilo).

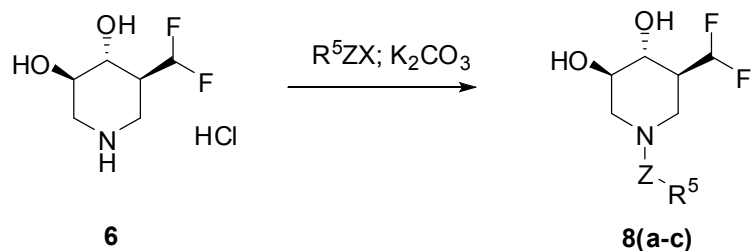
Siguiendo el Procedimiento General D utilizando bromuro de alilo (0,17 g, 1,4 mmol) se obtuvo el compuesto del título como un sólido blanco (0,22 g, 76%). MH⁺ = 208. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 6,2 (t, 1H, J = 57 Hz), 5,8 (m, 1H), 5,2 (m, 3H), 4,92 (d, 1H), 3,3 (m, 1H), 3,1 (1H), 2,95 (d, 2H), 2,85 (d, 2H), 1,9 (br m, 2H), 1,75 (t, 1H).

(3R,4R, 5S)-5-(Difluorometil)-1-(4-fluorobencil)piperidina 3,4-diol (7c; R⁵ = 4-fluorobencilo).

Siguiendo el Procedimiento General D, excepto que la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y utilizando bromuro de 4-fluorobencilo (0,26 g, 1,4 mmol) se obtuvo el compuesto del título como un sólido blanco (0,22 g, 56%). MH⁺ = 276. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 7,4 (m, 2H), 7,15 (m, 2H), 6,2 (t, 1H, J = 57 Hz), 5,2 (d, 1H, ex), 4,9 (d, 1H, ex), 3,5 (q, 2H), 3,3 (m, 1H), 3,1 (m, 1H), 2,8 (m, 2H), 2,0 (m, 2H), 1,8 (t, 1H).

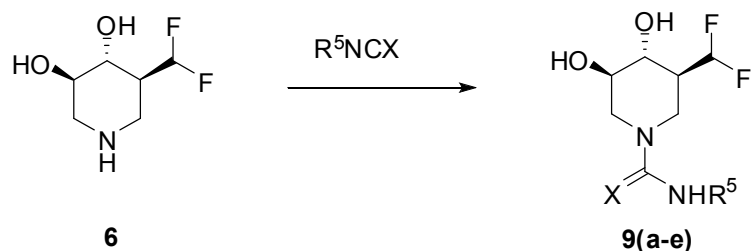
(3R,4R, 5S)-5-(Difluorometil)-1-(4-metilbencil)piperdina 3,4-diol (7d; R⁵ = 4-metilbencil). Siguiendo el Procedimiento General D, excepto que la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y utilizando bromuro de 4-metilbencil (0,26 g, 1,4 mmol) el compuesto del título se obtuvo como un sólido blanco (0,30, 81%). MH⁺ = 272. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 7,2 (m, 4H), 6,2 (t, 1H, *J* = 57 Hz), 5,2 (d, 1H, ex), 4,9 (d, 1H, ex), 3,5 (q, 2H), 3,3 (1H), 3,05 (m, 1H), 2,8 (m, 2H), 2,5 (s, 3H), 1,95 (m, 2H), 1,8 (t, 1H).

(3R,4R, 5S)-5-(Difluorometil)-1-(4-metoxibencil)piperdina 3,4-diol (7e; R⁵ = 4-metoxibencil). Siguiendo el Procedimiento General D, excepto que la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y utilizando cloruro de 4-metoxibencil (0,26 g, 1,4 mmol) se obtuvo el compuesto del título como un jarabe incoloro (0,19 g, 49%). MH⁺ = 288. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 7,3 (m, 1H), 6,85 (m, 3H), 6,2 (t, 1H, *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, 1H), 2,85 (m, 2H), 1,95 (m, 2H), 1,8 (t, 1H).



1-((3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-dihidroxipiperdina-1-il)pentano-1-ona (8a; Z = CO; R⁵ = butilo). Siguiendo el Procedimiento General D, excepto que la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y utilizando cloruro de pentanoilo (0,17 g, 1,4 mmol), el compuesto del título se obtuvo como un sólido blanco (0,26 g, 71%). MH⁺ = 252. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 5,9-6,5 (dt, 1H), 5,35 (m, 1H, ex), 5,25 (m, 1H, ex), 4,2 (dd, 1H), 3,75 (dd, 1H), 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).

(3R,4R, 5S)-5-(Difluorometil)-1-(metanosulfonilo)piperdina 3,4-diol (8b; Z = SO₂; R⁵ = Me) Siguiendo el Procedimiento General D, excepto que la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y utilizando cloruro de metanosulfonilo (0,16 g, 1,4 mmol), el compuesto del título se obtuvo como un sólido blanco (0,17 g, 51%). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 6,2 (t, 1H, *J* = 53 Hz), 5,43 (d, 1H, ex), 5,38 (d, 1H, ex), 3,2-3,7 (m, 4H), 2,95 (s, 3H), 2,85 (m, 1H), 2,7 (t, 1H), 2,1 (br s, 1H). **(3R,4R, 5S)-5-(Difluorometil)-1-tosilpiperdina 3,4-diol (8b; Z = SO₂; R⁵ = Ph)** Siguiendo el Procedimiento General D, excepto que la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y utilizando cloruro de toluenosulfonilo (0,26, 1,4 mmol), el compuesto del título se obtuvo como un sólido blanco (0,35 g, 67%). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 7,6 (d, 2H), 7,45 (d, 2H), 6,25 (t, 1H, *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, 1H).



(3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-dihidroxi-N-propilpiperdina-1-carboxamida (Procedimiento General E) (9a; X = O; R⁵ = propilo). A una solución de **6** (base libre) (0,29 g, 1,2 mmol) en DMF seco (5 mL), se agregó isocianato de propilo (0,10 g, 1,2 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía (CH₂Cl₂/ MeOH) para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (0,14 g, 48%). MH⁺ = 253. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 6,7 (t, 1H), 6,22 (t, 1H, *J* = 53 Hz), 5,25 (d, 1H, ex), 5,15 (d, 1H, ex), 4,05 (d, 1H), 3,9 (d, 1H), 3,3 (m, 2H), 3,0 (q, 2H), 2,5 (m, 1H), 1,8 (br d, 1H), 1,4 (m, 2H), 0,85 (t, 3H).

(3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-dihidroxi-N-fenilpiperdina-1-carboxamida (9b; X = O; R⁵ = fenilo). Siguiendo el Procedimiento General E y utilizando isocianato de fenilo (0,14 g, 1,2 mmol) el compuesto del título se obtuvo como un sólido blanco (0,21 g, 62%). MH⁺ = 287. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 8,7 (s, 1H), 7,45 (d, 2H), 7,3 (t, 2H), 6,95 (t, 1H), 6,3 (t, 1H, *J* = 53 Hz), 5,35 (d, 1H), 5,25 (d, 1H), 4,1 (t, 2H), 3,3 (m, 2H), 2,85 (t, 1H), 2,75 (t, 1H), 1,95 (br d, 1H).

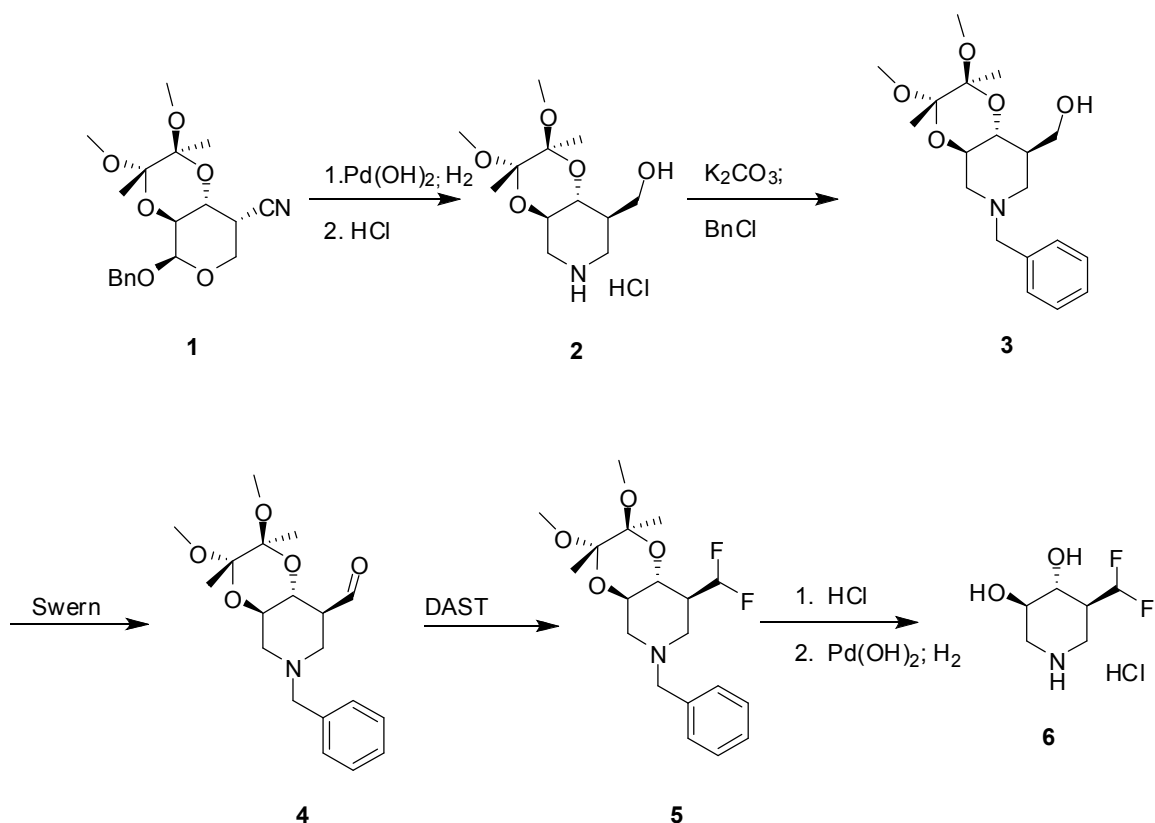
(3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-dihidroxi-N-butilpiperdina-1-carboxamida (9c; X = O; R⁵ = butilo). Siguiendo el Procedimiento General E y utilizando isocianato de butilo (0,12 g, 1,2 mmol) el compuesto del título se obtuvo como

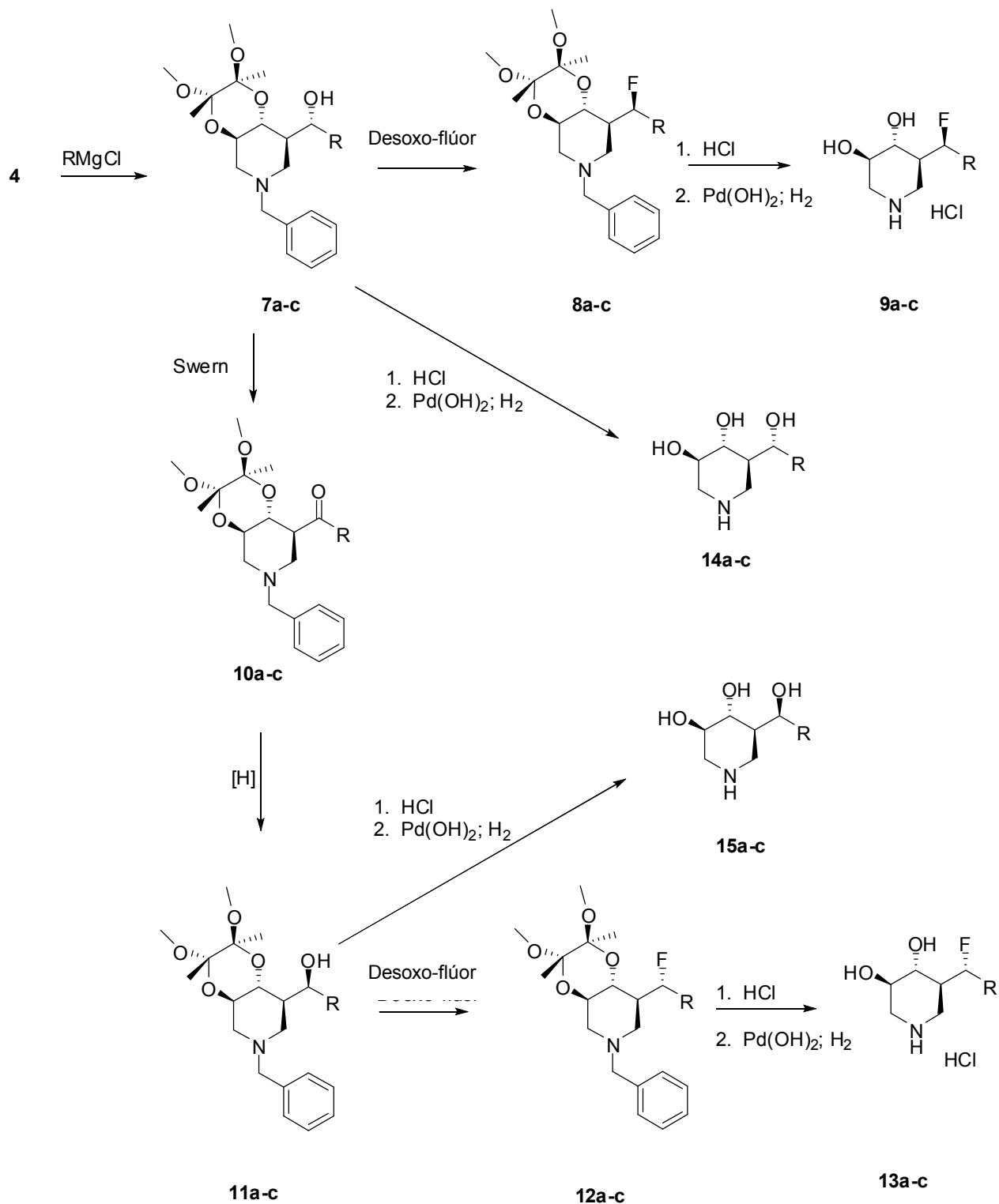
un sólido blanco (0,24 g, 76%). $MH^+ = 267$. 1H RMN (DMSO- d_6) 6,6 (t, 1H), 6,2 (t, 1H, $J = 53$ Hz), 5,25 (d, 1H), 5,1 (d, 1H), 4,05 (d, 1H), 3,9 (d, 1H), 3,35 (m, 2H), 3,05 (q, 2H), 2,65 (t, 1H), 2,45 (m, 1H), 1,8 (br d, 1H), 1,2-1,4 (2 m, 4H), 0,85 (t, 3H).

5 **(3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-dihidroxi-N-butilpiperdina-1-carbotioamida (9d; X = S; R⁵ = butilo)**. Siguiendo el Procedimiento General E y utilizando isotiocianato de butilo (0,14 g, 1,2 mmol) el compuesto del título se obtuvo como un jarabe incoloro (0,21 g, 63%). $MH^+ = 283$. 1H RMN (DMSO- d_6) 7,85 (t, 1H), 6,25 (t, 1H), 5,35 (2d, 2H), 4,8 (d, 1H), 4,45 (d, 1H), 3,45 (m, 2H), 3,25 (m, 1H), 3,05 (t, 1H), 2,8 (t, 1H), 1,85 (br d, 1H), 1,4 (m, 2H), 1,35 (m, 2H), 1,1 (m, 1H), 0,95 (t, 3H).

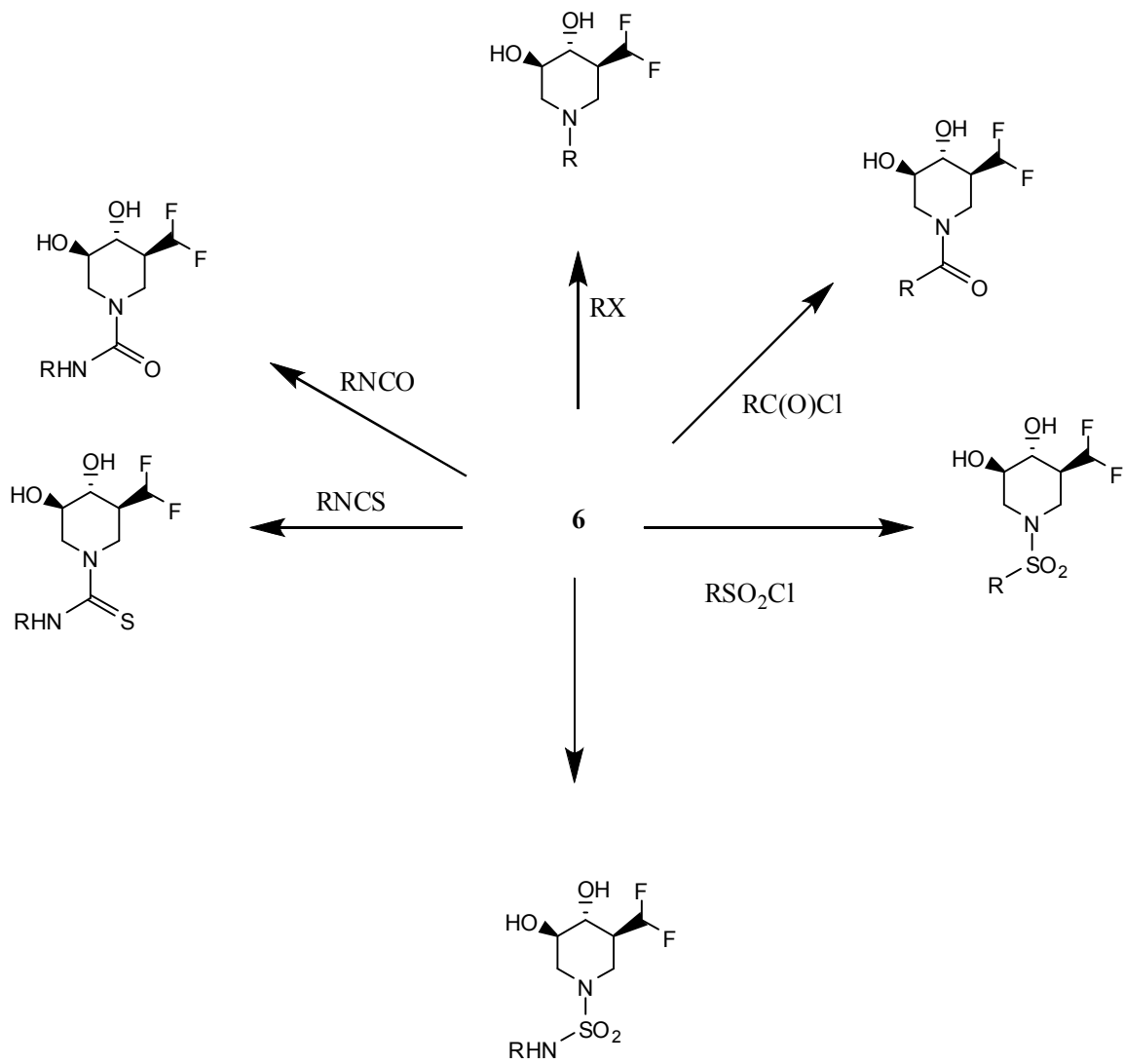
10 **(3S,4R, 5R)-3-(Difluorometil)-4,5-dihidroxi-N-fenilpiperdina-1-carbotioamida (9e; X = S; R⁵ = fenilo)**. Siguiendo el Procedimiento General E y utilizando isotiocianato de fenilo (0,16 g, 1,2 mmol) el compuesto del título se obtuvo como un sólido blanco (0,31 g, 86%). $MH^+ = 303$. 1H RMN (DMSO- d_6) 9,5 (s, 1H), 7,3 (m, 4H), 7,1 (t, 1H), 6,35 (t, 1H), 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, 1H).

15 Los expertos en la técnica también podrán obtener compuestos de la presente invención mediante el uso de los siguientes esquemas generales:

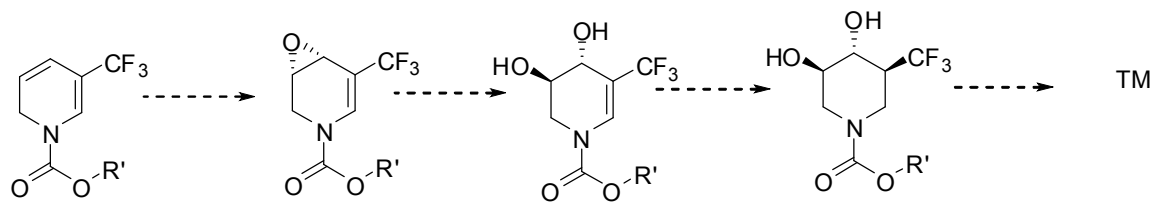




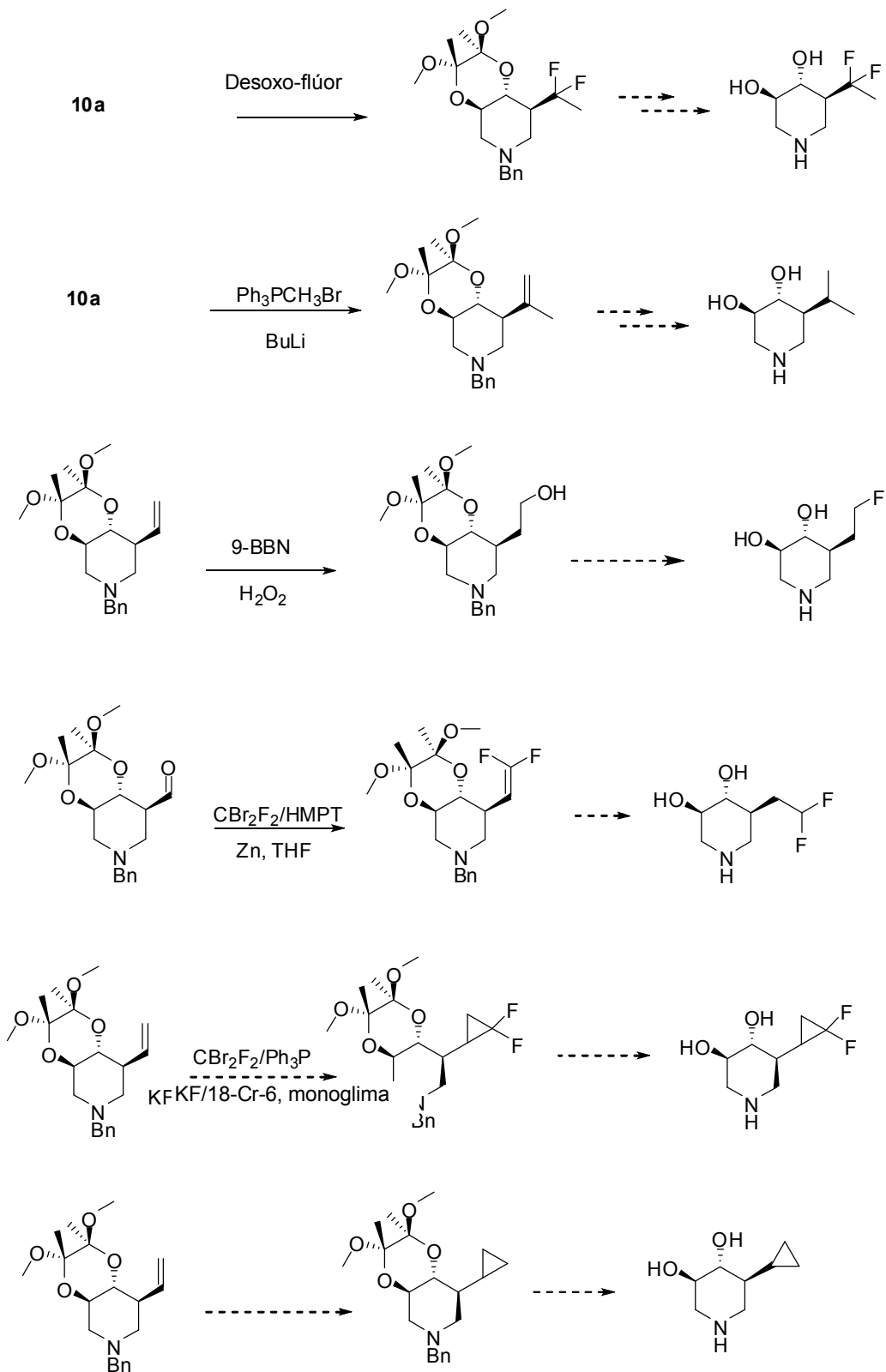
Esquema 4



Esquema 5



Esquema 6



Esquema 7

Sales, solvatos y profármacos

Los compuestos de la presente invención incluyen sales, solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos divulgados en la presente. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales derivadas de bases inorgánicas tales como Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn; sales de bases orgánicas tales como $[\text{Nu}]$, $[\text{Nu}]'$ -diacetiletilendiamina,

glucamina, trietilamina, colina, hidróxido, diciclohexilamina, metformina, bencilamina, trietilamina, tiamina; bases quirales como alquilfenilamina, glicinol, fenil glicinol, sales de aminoácidos naturales tales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, norleucina, tirosina, cistina, cisteína, metionina, prolina, hidroxil prolina, histidina, ornitina, lisina, arginina, serina; aminoácidos no naturales tales como D-isómeros o aminoácidos sustituidos; guanidina, guanidina sustituida en donde los sustituyentes se seleccionan de nitro, amino, alquilo, alqueno, alquino, amonio o sales de amonio sustituido y sales de aluminio. Las sales pueden incluir sales de adición ácida, cuando corresponda, que son, clorhidratos, sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, hidrohaleuros, acetatos, tartratos, maleatos, citratos, succinatos, palmoatos, metanosulfonatos, benzoatos, salicilatos, bencenosulfonatos, ascorbatos, glicerofosfatos, cetoglutaratos. En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos divulgados en la presente es la sal de clorhidrato.

“Solvato” denota una asociación física de un compuesto con una o más moléculas de disolvente. Esta asociación física implica variar los grados de unión iónica y covalente, incluida la unión de hidrógeno. En determinados casos, el solvato será capaz de aislarse, por ejemplo, cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en la estructura de cristal del sólido cristalino. “Solvato” comprende tanto solvatos de fase de solución como aislables. “Hidrato” es un solvato en donde la molécula de disolvente es H₂O. Otros ejemplos no taxativos de solvatos adecuados incluyen alcoholes (por ejemplo, etanolatos, metanolatos y similares).

Todos los estereoisómeros (por ejemplo, isómeros geométricos, isómeros ópticos y similares) de los compuestos que se revelan en la presente (incluidos aquellos de las sales, solvatos y profármacos de estos compuestos así como también las sales y solvatos de los profármacos), tales como aquellos que existen debido a carbonos asimétricos en varios sustituyentes, incluidas las formas enantioméricas (que pueden existir aun en ausencia de carbonos asimétricos), formas rotaméricas, atropisómeros y formas diastereoméricas se contemplan dentro del alcance de la presente invención. Los estereoisómeros individuales de estos compuestos pueden, por ejemplo, estar sustancialmente libres de otros isómeros, o pueden mezclarse, por ejemplo, como racematos o con todos los otros estereoisómeros u otros seleccionados. Los centros quirales de los compuestos anteriores pueden tener una configuración S o R como se define en las Recomendaciones IUPAC 1974. El uso de los términos “sal”, “solvato”, “profármaco” y similares, se aplica equitativamente a la sal, solvato y profármaco de los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, racematos o profármacos de los compuestos de la presente invención que se describen en la presente.

Formulaciones

Los agentes terapéuticos pueden formularse para que sean adecuados para cualquier vía de administración, incluida, por ejemplo, la vía oral en forma de comprimidos o cápsulas o líquido o en una solución acuosa estéril para inyección. Cuando los agentes terapéuticos se formulan para administración oral, los comprimidos o cápsulas pueden prepararse mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de hidrógeno de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden formularse, por ejemplo, como soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); o conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones líquidas también pueden contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse de forma adecuada para proporcionar una liberación controlada o liberación sostenida de los agentes terapéuticos.

En determinadas realizaciones de la presente invención, los agentes terapéuticos se administran en una forma de dosificación que permite la absorción sistémica, de forma tal que los agentes terapéuticos puedan cruzar la barrera hematoencefálica con el fin de ejercer efectos sobre células neuronales. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas de los agentes terapéuticos adecuados para uso parenteral/inyectable generalmente incluyen soluciones acuosas estériles (que son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de las soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto que pueda administrarse mediante jeringa con facilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol, por ejemplo, glicerol, propilenglicol o polietilenglicol y similares), mezclas adecuadas de estos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, alcohol bencílico, ácido sórbico y similares. En muchos casos, será razonable incluir agentes isotónicos, por ejemplo,

azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los agentes terapéuticos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes que se enumeraron anteriormente, según se requirió, seguido de filtro o esterilización terminal. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y la técnica de secado por refrigerado que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier otro ingrediente deseado de la solución anteriormente filtrada estéril de este.

La formulación puede contener un excipiente. Excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden incluirse en la formulación son soluciones amortiguadoras tales como solución amortiguadora de citrato, solución amortiguadora de fosfato, solución amortiguadora de acetato y solución amortiguadora de bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas, tales como albúmina de suero, colágeno y gelatina; sales tales como EDTA o EGTA y cloruro de sodio; liposomas; polivinilpirrolidona; azúcares, tales como dextrano, manitol, sorbitol y glicerol; propilenglicol y polietilenglicol (por ejemplo, PEG-4000, PEG-6000); glicerol; glicina u otros aminoácidos; y lípidos. Los sistemas de solución amortiguadora para utilizar con las formulaciones incluyen citrato; acetato; bicarbonato y soluciones amortiguadoras de fosfato. La solución amortiguadora de fosfato es una realización preferida.

La formulación también puede contener un detergente no iónico. Los detergentes no iónicos preferidos incluyen Polisorbato 20, Polisorbato 80, Tritón X-100, Tritón X-114, Nonidet P-40, Octil α -glucósido, Octil β -glucósido, Brij 35, Pluronic y Tween 20.

Vías de administración

Los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral o parenteral, incluidas vía intravenosa, subcutánea, intraarterial, intraperitoneal, oftálmica, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intradérmica, intracraneana, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intrapulmonar, intranasal, transmucal, transdérmica o por inhalación. En una realización preferida, los agentes terapéuticos se administran oralmente.

La administración de los agentes terapéuticos puede ser mediante inyecciones periódicas de un bolo de la formulación, o puede administrarse mediante administración intravenosa o intraperitoneal de un recipiente externo (por ejemplo, una bolsa intravenosa) o interno (por ejemplo, un implante bioerosionable). Ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.407.957 y 5.798.113. Los métodos y sistemas de administración intrapulmonar se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.654.007, 5.780.014 y 5.814.607. Otros sistemas de administración parenteral útiles incluyen partículas de copolímero de acetato de etileno-vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, administración por bomba, administración celular encapsulada, administración lisosomal, inyección administrada por aguja, inyección sin aguja, nebulizador, aerosolizador, electroporación y parche transdérmico. Los dispositivos de inyector sin aguja se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.879.327; 5.520.639; 5.846.233 y 5.704.911. Cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente puede administrarse utilizando estos métodos.

Las inyecciones subcutáneas tienen las ventajas de permitir la autoadministración, mientras que también resultan en una semivida en plasma prolongada en comparación con la administración intravenosa. Asimismo, pueden utilizarse una variedad de dispositivos diseñados a conveniencia del paciente, tales como lapiceras de inyección recargables y dispositivos de inyección sin aguja, con las formulaciones de la presente invención, como se describe en la presente.

Dosificación

Una preparación farmacéutica adecuada es en una forma de dosificación unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias en tamaños adecuados que contienen cantidades apropiadas del componente activo, por ejemplo, una cantidad efectiva para lograr el objetivo deseado. En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos se administran en una o más dosis diarias (por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día). En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos se administran intermitentemente.

Los regímenes de dosificación ejemplares se describen en la solicitud de patente internacional PCT/US08/61764 publicada como WO 2008/134628 el 11 de junio de 2008 y la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos 61/108,192, presentada el 24 de octubre de 2008. En una realización, los agentes terapéuticos se administran en un régimen de dosificación intermitente que incluye una "dosis de carga" inicial que se proporciona a diario, seguida de un período de dosificación en intervalos no diarios.

La cantidad de agentes terapéuticos eficaces para evitar o tratar el trastorno al que se hace referencia puede ser determinada caso a caso por los expertos en la técnica. La cantidad y frecuencia de administración de los agentes terapéuticos se regulará de acuerdo con el criterio del médico tratante (profesional de la salud) considerando

factores tales como la edad, afección y tamaño del paciente, así como también el riesgo de desarrollar el trastorno o la gravedad de los síntomas del trastorno tratado al que se hace referencia.

Terapia de fármacos combinada

5 Los agentes terapéuticos de la presente invención pueden administrarse en combinación con al menos otro agente terapéutico. Se comprende que la administración de los agentes terapéuticos de la presente invención con al menos otro agente terapéutico comprende la administración que es secuencial o concurrente. En una realización, los agentes terapéuticos se administran en formas de dosificación separadas. En otra realización, dos o más agentes terapéuticos se administran conjuntamente en la misma forma de dosificación.

10 En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos otro agente terapéutico que es un agente antidisquinesia (por ejemplo, Carbidopa, Levodopa), un agente antiinfeccioso (por ejemplo, Miglustat), un agente antineoplásico (por ejemplo, Busulfán, Ciclofosfamida), un agente gastrointestinal (por ejemplo, Metilprednisolona), un micronutriente (por ejemplo, Calcitriol, Colecalciferol, Ergocalciferoles, Vitamina D), un agente vasoconstrictor (por ejemplo, Calcitriol). En una realización preferida, los otros agentes terapéuticos mencionados anteriormente se administran cuando el trastorno es enfermedad de Gaucher.

En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con alopregnanolona, una dieta baja en colesterol o agentes de disminución de colesterol tales como estatinas (por ejemplo, Lipitor®); fibratos tales como fenofibrato (Lipidil®); niacina; y/o resinas de unión tales como colestiramina (Questran®).

20 En una realización, los agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con terapia de genes. La terapia de genes se contempla tanto con genes de reemplazo tales como glucocerebrosidasa como con ARN inhibitorio (ARNsi) para el gen SNCA. La terapia de genes se describe en más detalle en la Patente de los Estados Unidos No. 7.446.098 presentada el 17 de febrero de 2004.

25 En una realización, los agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos otro agente terapéutico que es un agente antiinflamatorio (por ejemplo, ibuprofeno u otro AINES).

En una realización, los agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con un inhibidor de sustrato para glucocerebrosidasa, tal como N-butil-desoxinojirimicina (Zavesca®; miglustat disponible de Actelion Pharmaceuticals, EUA, Inc., San Francisco del Sur, CA, EE. UU.).

30 También se contemplan las combinaciones de los agentes terapéuticos de la presente invención con al menos otro agente terapéutico que es un agente terapéutico para una o más enzimas lisosomales. La Tabla 2 contiene una lista no taxativa de agentes terapéuticos para enzimas lisosomales.

Tabla 2

ENZIMA LISOSOMAL	AGENTE TERAPÉUTICO
α-Glucosidasa No. de acceso de GenBank Y00839	1-desoxinojirimicina (DNJ) α-homonojirimicina castanospermina
β-Glucosidasa ácida (β-glucocerebrosidasa) No. de acceso de GenBank J03059	isofagomina C-bencil isofagomina y derivados N-alkil (C9-12)-DNJ Glucoimidazol (y derivados) C-alkil-IFG (y derivados) N-alkil-β-valeinaminas Flufenozina calisteginas A ₃ , B ₁ , B ₂ y C ₁
α-Galactosidasa A No. de acceso de GenBank NM000169	1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) α- <i>alo</i> -homonojirimicina α- <i>galacto</i> -homonojirimicina β-1-C-butil-desoxinojirimicina calisteginas A ₂ y B ₂ N-metil calisteginas A ₂ y B ₂
β-Galactosidasa ácida No. de acceso de GenBank M34423	4- <i>epi</i> -isofagomina 1-desoxigalactonojirimicina
Galactocerebrosidasa (β-Galactosidasa ácida) No. de acceso de GenBank D25283	4- <i>epi</i> -isofagomina 1-desoxigalactonojirimicina
α-Manosidasa ácida No. de acceso de GenBank U68567	1-desoximanojirimicina Swainsonina Manostatina A

β -Manosidasa ácida No. de acceso de GenBank U60337	2-hidroxi-isofagomina
α -L-fucosidasa ácida No. de acceso de GenBank NM_000147	1-desoxifuconojirimicina β -homofuconojirimicina 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol 2,5-desoxi-2,5-imino-D-fucitol 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-altritol
α -N-Acetilglucosaminidasa No. de acceso de GenBank U40846	1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina
α -N-Acetilgalactosaminidasa No. de acceso de GenBank M62783	1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galactonojirimicina
β -Hexosaminidasa A No. de acceso de GenBank NM_000520	2-N-acetilamino-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina Nagstatina
β -Hexosaminidasa B No. de acceso de GenBank NM_000521	2-N-acetamido-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina Nagstatina
α -L-Iduronidasa No. de acceso de GenBank NM_000203	1-desoxiduronojirimicina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
β -Glucuronidasa No. de acceso de GenBank NM_000181	6-carboxi-isofagomina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
Sialidasa No. de acceso de GenBank U84246	ácido 2,6-didesoxi-2,6, imino-siálico Siastatina B
Iduronato sulfatasa No. de acceso de GenBank AF_011889	2,5-anhidromanitol-6-sulfato
esfingomielinasa ácida No. de acceso de GenBank M59916	desipramina, fosfatidilinositol-4,5-difosfato

- En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos un agente terapéutico que es un agente antidisquinesia (por ejemplo, Carbidopa, Levodopa), un agente antiinfeccioso (por ejemplo, Ciclosporina, Miglustat, Pirimetamina), un agente antineoplásico (por ejemplo, Alemtuzumab, Azatioprina, Busulfán, Clofarabina, Ciclofosfamida, Melfalan, Metotrexato, Rituximab), un agente antireumático (por ejemplo, Rituximab), un agente gastrointestinal (por ejemplo, Metilprednisolona), un micronutriente (por ejemplo, Calcitriol, Colecalciferol, Ergocalciferoles, Ácido fólico, Vitamina D), un agente de control reproductivo (por ejemplo, Metotrexato), un agente del sistema respiratorio (por ejemplo, Tetrahidrozolina), un agente vasoconstrictor (por ejemplo, Calcitriol, Tetrahidrozolina).
- 5 En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos un agente terapéutico que es un agente terapéutico para β -hexosaminidasa A y/o un agente terapéutico para β -galactosidasa ácida. En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos un agente terapéutico que es un agente antiinfeccioso (por ejemplo, Miglustat), un agente antineoplásico (por ejemplo, Alemtuzumab, Busulfán, Ciclofosfamida), un agente gastrointestinal (por ejemplo, Metilprednisolona). En una realización, la combinación mencionada anteriormente se administra a sujetos en riesgo o diagnosticados con la enfermedad de Niemann-Pick (por ejemplo, enfermedad de Niemann-Pick tipo C).
- 10
- 15

Ejemplos

- La presente invención se describe también por medio de los ejemplos que se presentan a continuación. El uso de dichos ejemplos es únicamente ilustrativo y de ningún modo limita el alcance y significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. De este modo, la invención no está limitada a ninguna realización particular preferida descrita en la presente. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica luego de leer la presente memoria descriptiva. Por lo tanto, la invención debe estar limitada únicamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas junto con el alcance completo de los equivalentes a los cuales se refieren las reivindicaciones.
- 20
- 25

Ejemplo 1: Determinación de constantes de inhibición

- La afinidad de unión (definida aquí mediante la constante de unión K_i) de GCasa para nuevos compuestos de la presente invención se determinó empíricamente utilizando ensayos de inhibición enzimática. Brevemente, los ensayos de inhibición enzimática utilizados monitorearon la capacidad de un compuesto de prueba de unir y evitar la hidrólisis de un sustrato fluorogénico en un modo dependiente de la concentración. Específicamente, la actividad enzimática de GCasa humana recombinante, (GCasa hr; Cerezime®, Genzyme Corp.) se midió utilizando sustrato fluorogénico de 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosida (4-MU- β -D-Glc) en ausencia o en presencia de diversas cantidades de cada compuesto de prueba. Los datos resultantes se analizaron comparando todas las muestras de
- 30

prueba con la muestra testigo sin inhibición (sin compuesto; corresponde al 100% de actividad enzimática) para determinar la actividad enzimática residual en presencia de un compuesto de prueba. Los datos de actividad residual normalizada se graficaron posteriormente (sobre el eje y) en relación con la concentración del compuesto de prueba (sobre el eje x) para extrapolar la concentración del compuesto de prueba que conduce al 50% de inhibición de la actividad enzimática (definida como CI_{50}). El valor de CI_{50} para cada compuesto de prueba se insertó luego en la ecuación de Cheng-Prusoff (que se detalla a continuación) para derivar en la constante de inhibición absoluta K_i que refleja con precisión la afinidad de unión de GCasa para el compuesto de prueba. Los ensayos de inhibición enzimática se realizaron en 7,0 de pH (pH del retículo endoplásmico) y en 5,2 de pH (pH lisosomal) para obtener una percepción sobre la afinidad de unión (es decir, potencia) de los compuestos para GCasa en el retículo endoplásmico y lisosoma.

Ensayo *in vitro*

Se prepararon diversas concentraciones de compuestos de prueba en la solución amortiguadora "M" que consiste en 50 mM de solución amortiguadora de fosfato de sodio con taurocolato de sodio al 0,25% en 7,0 de pH y 5,2 de pH. La enzima (Cerezima®, una forma recombinante de la enzima β -glucocerebrosidasa humana) también se diluyó en la misma solución amortiguadora "M" en 7,0 de pH y 5,2 de pH. La solución de sustrato consistía en 3 mM de 4-metilumbeliferona β -D-glucopiranosida en solución amortiguadora "M" con Tritón X-100 al 0,15% en ambos pH. Se agregaron cinco microlitros de enzima diluida a 15 μ l de las diversas concentraciones de inhibidor o solución amortiguadora "M" sola y se incubó a 37°C durante 1 hora con 50 μ l de la preparación de sustrato para evaluar la actividad de β -glucosidasa en 7,0 de pH y 5,2 de pH. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de un volumen igual de 0,4 de M glicina, pH 10,6. La fluorescencia se midió sobre un lector de placa durante 1 seg/pocillo utilizando 355 nm de excitación y 460 nm de emisión. Las incubaciones sin enzima agregada o sin inhibidores agregados se utilizaron para definir la actividad sin enzima y la actividad máxima, respectivamente, y normalizar el % de inhibición para un ensayo dado. Los resultados de dichos ensayos de inhibición *in vitro* para el compuesto de referencia IFG-tartrato y diversos compuestos de prueba se resumen a continuación en **Tabla 2A**.

25

Tabla 2A: Determinación <i>in vitro</i> de las constantes de inhibición					
Cto. No.	Nombre de compuesto	CI_{50} (μM) pH 5,2	K_i (μM) pH 5,2	CI_{50} (μM) pH 7,0	K_i (μM) pH 7,0
6	(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidina-3,4-diol	0,0259±0,0014	0,0136±0,0008	0,0058±0,00023	0,00306±0,00012
13	(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	0,0946±0,0028	0,0498±0,0015	0,0171±0,0008	0,009±0,0004
9	(3R,4R,5R)-5-(1-hidroxietil)-piperidina-3,4-diol*	0,107±0,0041	0,044±0,0017	0,020±0,0008	0,010±0,0004
10	(3R,4R,5R)-5-(1-hidroxietil)-piperidina-3,4-diol*	0,343±0,021	0,142±0,0088	0,066±0,0041	0,035±0,0021
14	(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	0,038±0,0016	0,016±0,0007	0,007±0,0003	0,004±0,0001
Ninguno	Clorhidrato (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)-piperidina-3,4-diol	0,291±0,006	0,121±0,0026	0,060±0,0029	0,031±0,0015
Ninguno	(3R,4R,5S)-5-bencil-piperidina-3,4-diol	0,659±0,028	0,273±0,012	0,127±0,01	0,067±0,005
Ninguno	(3R,4R,5R)-5-((S)-hidroxifenil)metil-piperidina-3,4-diol	3,29±0,25	1,36±0,10	0,017±0,0035	0,0089±0,0018
Ninguno	(3R,4R,5S)-5-(2-hidroxiopropan-2-	0,234±0,0037	0,097±0,0015	0,029±0,0013	0,015±0,0007

	il)piperidina-3,4-diol				
Ninguno	Tartrato de IFG	0,049±0,0029	0,026±0,0015	0,0074±0,00007	0,0039±0,000037
Notas:					
* Estereoisómero A y/o B					

Ensayo *in situ*

El efecto de los compuestos nuevos de la presente invención sobre la actividad lisosomal de GCasa se ensayó *in situ* utilizando fibroblastos establecidos de un sujeto normal. Las células sembradas en placas de 48 pocillos se incubaron con las concentraciones indicadas de compuesto durante 16-24 horas. Para los ensayos de respuesta a dosis, las células se incubaron *in situ* con el sustrato 5-(pentafluorobenzoilamino)fluoresceína di-β-D-glucopiranosida (PFBFDβGlu) durante 1 hora y posteriormente se lisaron para determinar el alcance de la hidrólisis de sustrato en presencia del compuesto. El ensayo empleó un rango de 12 concentraciones que comprenden 5 órdenes de magnitud, centrados en el CI_{50} . Específicamente, se emplearon los siguientes rangos de concentración: (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5R)-5-(1-hidroxietil)piperidina-3,4-diol, clorhidrato (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol, y (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol: $1,0 \times 10^{-3}$ a $3,0 \times 10^{-9}$ M; (3R,4R,5R)-5-(1-hidroxietil)piperidina-3,4-diol: $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-10}$ M; y (3R,4R,5R)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol: $1,0 \times 10^{-3}$ a $3,0 \times 10^{-11}$ M; en donde el compuesto se diluyó en serie 1:3 a partir de la concentración más alta en los rangos especificados. La inhibición se determinó como la relación entre la actividad en presencia de compuesto y la actividad en ausencia de compuesto. Para los ensayos de lavado, las células se trataron con compuesto durante 16-24 horas a una concentración igual a CI_{90} . Las células se lavaron profusamente y se incubaron en un medio libre de fármaco para permitir que el compuesto neto fluyera de las células. Luego se evaluó la actividad de GCasa lisosomal de las células en intervalos de 2 horas en un período total de 8 horas después de la eliminación del compuesto. El aumento en la actividad con el tiempo se ajustó con una función exponencial única para determinar el tiempo de lavado del compuesto. Los resultados de dichos ensayos de inhibición *in situ* para el compuesto de referencia IFG-tartrato y diversos compuestos de prueba se resumen a continuación en la **Tabla 2B**.

Cto. No.	Compuesto Nombre	CI_{50} <i>in situ</i> (μ M)	lavado <i>in situ</i> (hr)	CE_{50} (μ M)	E_{max} (%)
6	(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidina-3,4-diol	0,408 ± 0,046	2,1 ± 0,30	0,018 ± 0,008	105,6 ± 8,7
13	(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	0,650 ± 0,172	2,7 ± 0,12	0,044 ± 0,005	92,8 ± 6,6
9	(3R,4R,5R)-5-(1-hidroxietil)-piperidina-3,4-diol*	0,518 ± 0,022	10,5 ± 1,75	0,49 ± 0,06	83,7 ± 2,9
10	(3R,4R,5R)-5-(1-hidroxietil)-piperidina-3,4-diol*	0,798 ± 0,043	12 ± 1,65	1,06 ± 0,12	99,3 ± 4,9
14	(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	0,061 ± 0,019	3,7 ± 0,63	0,026 ± 0,003	89,7 ± 3,5
ninguno	(3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)-piperidina-3,4-diol clorhidrato	0,972 ± 0,201	SD	0,086 ± 0,002	84,0 ± 4,1
ninguno	(3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol	1,299 ± 0,323	1,2 ± 0,13	0,18 ± 0,01	98,0 ± 4,5
ninguno	(3R,4R,5R)-5-((S)-hidroxi(fenil)metil)-	SD	SD	4,99 ± 0,86	72,1 ± 3,5

	piperidina-3,4-diol				
ninguno	(3R,4R,5S)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)piperidina-3,4-diol	SD	SD	0,791 ± 0,162	109,3 ± 3,6
ninguno	Tartrato de IFG	0,271 ± 0,012	8,2 ± 0,04	0,31 ± 0,11	105,5 ± 12,8
Notas: * Estereoisómero A y/o B Ecuación de Cheng-Prusoff: $K_i = CI_{50} / (1 + [S]/K_m)$ donde [S] = concentración de sustrato; se utilizó 2,5 mM de 4-MU-β-D-Glc K_m = constante de Michaelis que define la afinidad del sustrato; 1,8 ± 0,6 mM para 4-MU-β-D-Glc (Liou et al., (2006) <i>J Biol. Chem.</i> 281 (7), 4242-53)					

5 Cuando se compara con el compuesto de referencia IFG-tartrato, se observa lo siguiente: se encontró que (i) los compuestos de prueba (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5R)-5-(1-hidroxi-etil)-piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol clorhidrato y (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol causan un aumento dependiente de concentración en la actividad de GCasa y actividad enzimática mejorada al mismo nivel máximo que el compuesto de referencia IFG-tartrato en una concentración mucho más baja; (ii) los compuestos de prueba (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol y (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol se lavaron del compartimento lisosomal (lavado *in situ*) considerablemente más rápido que el compuesto de referencia IFG-tartrato; y (iii), los compuestos de prueba (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5R)-5-(1-hidroxi-etil)-piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5R)-5-(1-hidroxi-etil)-piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol clorhidrato y (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol inhibieron la actividad de GCasa.

Ejemplo 2: Penetración en la barrera sangre-cerebro

15 Se ensayó la penetración en la barrera sangre-cerebro (BBB) del compuesto de referencia IFG-tartrato y diversos compuestos de la presente invención (es decir, (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5R)-5-(1-hidroxi-etil)-piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol clorhidrato y (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol) después de la administración oral a ratones. A estos efectos, a ratones (57BL/6) macho tipo salvaje de 8 semanas de edad se les administró una única dosis oralmente de 30 mg/kg (equivalente de base libre) del compuesto de referencia o de prueba por sonda (n = 3 ratones por punto de tiempo). Las soluciones de dosificación se prepararon en agua. Después de la dosificación, los ratones se sacrificaron con CO₂ en los siguientes puntos de tiempo: 0, 0,5, 1 y 4 horas después de la dosis. Después de la sacrificio se recolectó sangre entera de la vena cava inferior en tubos con heparina de litio. De manera similar, se recolectaron los cerebros de cada ratón. El plasma se derivó mediante centrifugado de sangre entera a 2.700 x g durante 10 minutos a 4°C seguido de almacenamiento sobre hielo seco. Los cerebros enteros se lavaron en PBS frío para eliminar la sangre contaminante, se secaron, se congelaron sobre hielo seco y finalmente se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Para preparar las muestras de cerebro para análisis, se homogenizaron 50-100 mg de tejido en 400 µl de agua/mg de tejido. Las muestras se clarificaron luego mediante centrifugación. A continuación, se combinaron 25 µl del sobrenadante de homogenado de cerebro o 25 µl de plasma con 25 µl de acetonitrilo:agua (95/5). Esto se complementó con 25 µl de acetonitrilo y 50 µL de estándar interno (100 ng/mL de IFG-tartrato 13C2-15N en ácido fórmico al 0,5% en (70:30) acetonitrilo:metanol). Las muestras se clarificaron mediante centrifugación y se combinaron 75 µl del sobrenadante con 75 µl de acetonitrilo. Se analizaron luego los niveles de compuesto mediante LC-MS/MS en PPD Inc. (3230 Deming Way, Middleton, WI 53562). En breve, se empleó una columna de 5 µ de 50 x 3mm de Sílice-100 Thermo Betasil, equilibrada con una mezcla de fase móvil que consistía en 5 mM de formato de amonio y ácido fórmico al 0,05% en (A) 95:5 de acetonitrilo:agua o (B) 70:20:10 metanol:agua:acetonitrilo. Se inyectaron entre 20 y 30 µl de muestra para análisis. Para calcular las concentraciones de fármaco, los datos sin procesar para plasma (ng/mL) y cerebro (ng/g) se convirtieron a nM utilizando el peso molecular de los respectivos compuestos y asumiendo que 1 g de tejido es equivalente a 1 mL de volumen. La concentración en función de tiempo se graficó en GraphPad Prism versión 4.02.

40 Los niveles en plasma y los niveles en cerebro detectados en los ratones a los que se le administró una dosis única de 30 mg/kg (equivalente de base libre) oralmente del compuesto de referencia (es decir, IFG-tartrato) o el compuesto de prueba (es decir, (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5R)-5-(1-hidroxi-etil)-piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol clorhidrato o (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol) reflejan que (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol clorhidrato y (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol cruzaron la barrera de sangre-cerebro más fácilmente en comparación con el IFG-tartrato. Adicionalmente, se detectaron en el cerebro niveles más altos de (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol clorhidrato y (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol que los que se observaron tras la administración de IFG-tartrato.

Ejemplo 3: Mejora de GCasa

Se evaluó en ratones la capacidad de los compuestos de prueba administrados oralmente (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol clorhidrato o (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol de elevar los niveles de GCasa. A estos efectos, a ratones (57BL/6) macho tipo salvaje de 8 semanas de edad se les administró una única dosis oralmente (por sonda) de un compuesto de la presente invención (es decir, (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)piperidina-3,4-diol clorhidrato o (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol). Los detalles de la dosis administrada para cada compuesto se proporcionan en las **Tablas 3A** y **3B**. Las soluciones de dosificación se prepararon en agua. Los compuestos se administraron en 2 semanas de la siguiente forma: semana 1, lun-vie (con administración), sáb-dom (sin administración); semana 2, lun-jue (con administración); necropsia el viernes. Por lo tanto, se proporcionó un total de 9 dosis (soluciones de dosificación preparadas todos los días) a cada ratón, con un lavado de 24 horas entre la última dosis y la necropsia.

Después de completarse la dosificación, los ratones se sacrificaron con CO₂ y se extrajo sangre entera en tubos con heparina de litio de la vena cava inferior. Se recolectó plasma mediante centrifugación de la sangre a 2700g durante 10 minutos a 4°C. Se retiraron tejidos de hígado, bazo, pulmón y cerebro, se lavaron en PBS frío, se secaron, se congelaron sobre hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Los niveles de GCasa se midieron homogenizando aproximadamente 50 mg de tejido en 500 µL de solución amortiguadora Mcllvane (MI) (100 mM de citrato de sodio, 200 mM de fosfato de sodio dibásico, taurocolato de sodio al 0,25%, y Tritón X-100 al 0,1%, pH 5,2) a 5,2 de pH durante 3-5 segundos sobre hielo con un microhomogenizador. Los homogenizados se incubaron luego a temperatura ambiente sin y con 2,5 mM de condutiroil-B-epóxido (CBE) durante 30 min. Finalmente, se agregaron 3,7 mM de sustrato 4-metilumbeliferil-β-glucósido (4-MUG) y se incubaron a 37°C durante 60 min. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 0,4 M de glicina, pH 10,6. La fluorescencia se midió sobre un lector de placas durante 1seg/pocillo utilizando 355 nm de excitación y 460 nm de emisión. Se determinó la proteína total en lisados utilizando el kit MicroBCA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una curva estándar de 4-metilumbeliferona (4-MU) en el rango de 1,0 nM a 50 µM se ejecutó en paralelo para la conversión de los datos de fluorescencia brutos en la actividad absoluta de GCasa (en presencia y ausencia de CBE) y se expresó en nanomoles de 4-MU liberados por miligramo de proteína por hora (nmol/mg proteína/hora). Los niveles de GCasa y los niveles de proteína se calcularon utilizando Microsoft Excel (Redmond, WA) y GraphPad Prism versión 4.02.

Las **Tablas 3A** y **3B** resumen la dosis administrada para cada compuesto examinado en ratones como se describe anteriormente, así como también el nivel resultante de mejora de GCasa en cerebro y bazo, respectivamente, la concentración de compuesto en tejido, la concentración de compuesto en ensayo de GCasa y la constante de inhibición (K_i).

Nombre del compuesto	Dosis (mg/kg) Ensayo de sangre entera	Aumento de GCasa (veces)	Concentración de compuesto en tejido 2,2 nmol/kg	Concentración de compuesto en ensayo de GCasa (µM)	K _i pH 5,2 (uM)
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidina-3,4-diol	10	2,1	55	0,0002	0,0136±0,0008
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidina-3,4-diol	100	2,6	301	0,0010	
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	10	1,5	50	0,0002	0,0498±0,0015
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	100	2,4	415	0,0014	
(3R,4R,5S)-5-(1-hidroxietil)-piperidina-3,4-diol*	SD	SD	SD	SD	0,044±0,0017
(3R,4R,5R)-5-(1-hidroxietil)-piperidina-3,4-	SD	SD	SD	SD	0,142±0,0088

diol*					
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	10	1,5	BLQ (1)	BLQ	0.016±0,0007
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	100	2,2	41	0,0001	
Clorhidrato (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)-piperidina-3,4-diol	10	0,9	BLQ (2)	BLQ	0,121±0,0026
Clorhidrato (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)-piperidina-3,4-diol	100	1,1	38	0,0001	
(3R,4R,5S)-5-bencil-piperidina-3,4-diol	10	1,2	SD	SD	0,273±0,012
(3R,4R,5S)-5-bencil-piperidina-3,4-diol	100	1,4	SD	SD	
(3R,4R,5R)-5-((S)-hidroxi(fenil)metil)-piperidina-3,4-diol	SD	SD	SD	SD	1,36±0,10
(3R,4R,5S)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)piperidina-3,4-diol	SD	SD	SD	SD	0,097±0,0015
Notas:					
* Estereoisómero A y/o B					
(1) BQL (Debajo del límite de cuantificación) < 7,4 nmol/kg; (2) BQL < 2,2 nmol/kg					
SD: Sin determinar					

Tabla 3B: Mejora de GCasa en bazo					
Nombre del compuesto	Dosis (mg/kg) Ensayo de sangre entera	Aumento de GCasa (veces)	Concentración de compuesto en tejido	Concentración de compuesto en ensayo de GCasa	Ki pH 5,2 (uM)
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidina-3,4-diol	10	1,9	100	0,0003	0,0136±0,0008
(3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidina-3,4-diol	100	2,4	435	0,0015	
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	10	1,0	BLQ (1)	BLQ	0,0498±0,0015
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	100	1,5	948	0,0032	
(3R,4R,5R)-5-(1-hidroxi-etil)-piperidina-3,4-diol*	SD	SD	SD	SD	0,044±0,0017
(3R,4R,5R)-5-(1-hidroxi-etil)-piperidina-3,4-	SD	SD	SD	SD	0,142±0,0088

diol*					
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	10	1,6	BLQ (2)	BLQ	0,016±0,0007
(3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)-piperidina-3,4-diol*	100	2,3	99	0,0003	
Clorhidrato (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)-piperidina-3,4-diol	10	0,7	21	0,0001	0,121±0,0026
Clorhidrato (3R,4R,5S)-5-((R)-1-fluoropropil)-piperidina-3,4-diol	100	0,7	60	0,0002	
(3R,4R,5S)-5-bencil-piperidina-3,4-diol	10	1,0	SD	SD	0,273±0,012
(3R,4R,5S)-5-bencil-piperidina-3,4-diol	100	1,2	SD	SD	
(3R,4R,5R)-5-((S)-hidroxi(fenil)metil)-piperidina-3,4-diol	SD	SD	SD	SD	1,36±0,10
(3R,4R,5S)-5-(2-hidroxiopropan-2-il)piperidina-3,4-diol	SD	SD	SD	SD	0,097±0,0015
Notas: * Estereoisómero A y/o B (1) BLQ < 6,8 nmol/kg; (2) BLQ < 7,9 nmol/kg SD: Sin determinar					

Como se refleja en las Tablas 3A y 3B, los ratones a los que se les administró (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol o (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol demostraron una mejora significativa de Gcasa en cerebro y bazo.

5 Ejemplo 4: Farmacocinética de rata

Los datos de farmacocinética (PK) se obtuvieron en ratas para evaluar la biodisponibilidad del compuesto de prueba. En particular, se calcularon los siguientes parámetros de PK: biodisponibilidad medida por área bajo la curva de Concentración/Tiempo (AUC), fracción de dosis disponible (%F; se define también a continuación), aclaramiento (CL), volumen de distribución (Vd) y semivida ($t_{1/2}$). A estos efectos, a ratas macho Sprague-Dawley de 8 semanas de edad se les proporcionó una única dosis intravenosa (IV) equivalente a 3 mg/kg de dosis de base libre o dosis oral (por sonda) única en aumento del compuesto de prueba equivalente a 10, 30, y 100 mg/kg de base libre. Se utilizaron tres ratas por grupo de dosificación. Se recolectó la sangre en un período de 24 horas. Los puntos de tiempo para la recolección de sangre después de la administración intravenosa fueron: 0, 2,5, 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 hrs; los puntos de tiempo para la recolección de sangre después de las administraciones orales fueron: 0, 5, 15, 30, 45 min, 1, 2, 3, 4, 8, 12 y 24 hrs. Se analizaron los niveles de compuesto de las muestras en plasma mediante LC-MS/MS en PPD. Los datos sin procesar se analizaron mediante análisis no compartimental en Win-nonLin para calcular V_D , %F, CL y $t_{1/2}$.

Los parámetros farmacocinéticos para (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol y (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol en base al estudio antemencionado se detallan a continuación en las **Tablas 4A-D**.

Tabla 4A: PK de rata para (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)-piperidina-3,4-diol-HCl								
Dosis (mg/kg)								
Sal	Base libre	Vía	AUC _{last} (hr*ng/ml)	%F	$t_{1/2}$ (h)	C _{max} (ng/mL)	CL (mL/hr/kg)	V _D (mL/kg)

3,65	3	IV	AUC _{0-12 hr} 2044 ± 294	N/C	1,1 ± 0,05	2323 ± 348	1555 ± 218	2612 ± 269
12,18	10	oral	AUC _{0-12hr} 6714 ± 524	106 ± 8,6	2,58 ± 0,78	3363 ± 219	N/C	N/C
36,54	30	oral	AUC _{0-24hr} 21685 ± 1515	101 ± 6,9	2,75 ± 0,36	10037 ± 865	N/C	N/C
121,81	100	oral	AUC _{0-24hr} 79389 ± 8570	121 ± 12,9	2,41 ± 0,16	33200 ± 4990	N/C	N/C

Notas:

Valores medios del análisis no compartimental (N=3 ratas)

BLD Debajo del límite de detección (0,5ng/mL)

BLQ Debajo del límite de cuantificación

%F = $\frac{AUC\ oral \times 100\ dosis\ normalizada}{AUC\ IV}$

AUC_{last} = Área bajo la curva de Concentración/Tiempo hasta el último punto de datos

Tabla 4B: PK de rata para (3R,4R,5S)-5-(1-fluorometil)-piperidina-3,4-diol-HCl*

Dosis (mg/kg)								
Sal	Base libre	Vía	AUC _{last} (hr*ng/ml)	%F	t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	CL (mL/hr/kg)	V _D (mL/kg)
3,67	3	IV	AUC _{0-24hr} 1421 ± 188,1	N/C	2,6 ± 0,64	2328 ± 373	2708 ± 410	9774 ± 1551
12,23	10	oral	AUC _{0-24hr} 7097 ± 606	148 ± 12,5	2,8 ± 0,50	2680 ± 167	N/C	N/C
36,70	30	oral	AUC _{0-24hr} 21664 ± 1708	155 ± 12,2	2,7 ± 0,12	6917 ± 451	N/C	N/C
122,34	100	oral	AUC _{0-24hr} 59481 ± 1005	142 ± 2,5	2,5 ± 0,19	19433 ± 3031	N/C	N/C

Nota:
* Estereoisómero A y/o B

Tabla 4C: PK de rata para (3R,4R,5S)-5-(1-fluorometil)-piperidina-3,4-diol-HCl*

Dosis (mg/kg)								
Sal	Base libre	Vía	AUC _{last} (hr*ng/ml)	%F	t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	CL (mL/hr/kg)	V _D (mL/kg)
3,67	3	IV	AUC _{0-24hr} 1370 ± 109	N/C	2,06 ± 0,47	2427 ± 192	2188 ± 173	6304 ± 927
12,23	10	oral	AUC _{0-24hr} 4251 ± 88	98 ± 1,85	3,0 ± 0,22	1127 ± 60	N/C	N/C
36,70	30	oral	AUC _{0-24hr} 14229 ± 127	104 ± 0,88	2,6 ± 0,16	4680 ± 369	N/C	N/C
122,34	100	oral	AUC _{0-24hr} 50946 ± 713	104 ± 1,5	2,4 ± 0,16	15733 ± 622	N/C	N/C

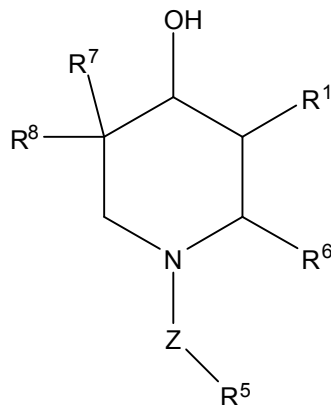
Nota:
* Estereoisómero A y/o B

Tabla 4D: PK de rata para (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol-HCl								
Dosis (mg/kg)								
Sal	Base libre	Vía	AUC _{last} (hr*ng/ml)	%F	t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	CL (mL/hr/kg)	V _D (mL/kg)
3,53	3	IV	AUC _{0-12hr} 592 ± 60,9	N/C	1,7 ± 1,5	969 ± 104	5145 ± 532	12570 ± 1792
11,76	10	oral	AUC _{0-24hr} 1200 ± 46,4	61,7 ± 2,4	3,86 ± 0,6	641 ± 48,7	N/C	N/C
35,28	30	oral	AUC _{0-24hr} 3690 ± 71,5	62,3 ± 1,2	3,8 ± 0,19	1703 ± 133	N/C	N/C
117,59	100	oral	AUC _{0-24hr} 13519 ± 2177	68,3 ± 10,8	2,9 ± 0,11	7140 ± 1357	N/C	N/C

5 Como se refleja en las **Tablas 4A-D**, (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol y (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol tienen perfiles farmacocinéticos favorables para el desarrollo de fármacos. En particular, (3R,4R,5S)-5-(difluorometil)piperidina-3,4-diol, (3R,4R,5S)-5-(1-fluoroetil)piperidina-3,4-diol y (3R,4R,5S)-5-bencilpiperidina-3,4-diol muestran una excelente biodisponibilidad oral (aproximadamente 50-100%) y proporcionalidad de dosis, una semivida de 1,0 a 4,0 horas y un volumen de distribución que sugiere una penetración adecuada en tejidos periféricos.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula II:



5 en donde:

R¹ es C(R²)(R³)(R⁴);

R² es hidrógeno, -OH o halógeno;

R³ es hidrógeno, -OH, halógeno o -CH₃;

10 R⁴ es halógeno, -CH₃, fenilo, fluorofenilo, metilfenilo, ciclohexilmetilo, en donde cuando R⁴ es un halógeno, R² y R³ no pueden ser hidrógeno;

R³ y R⁴ pueden juntarse con el átomo de carbono al que están unidos para formar un anillo cicloalquilo, que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más átomos de halógeno;

R⁶ es hidrógeno o fenilalquilo;

15 Z es opcional, cuando está presente Z es -(CH₂)-, -C(=O)-, -S(=O)₂NH-, -S(=O)₂-, -S(=O)₂-CH₂-, C(=O)-NH-, -S(=O)₂NR⁹-, -C(=S)-NH- o -C(=O)₂-CH₂-,

R⁹ es hidrógeno o CH₃;

R⁵ es hidrógeno o aminofenilalquilo;

R⁷ es -OH o halógeno; y

R⁸ es hidrógeno, halógeno o -CH₃;

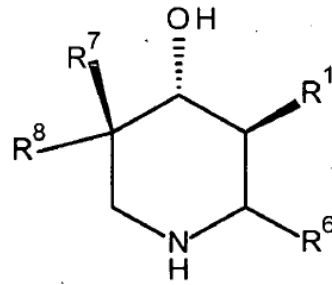
20 siempre que R² y R³ no sean ambos hidrógeno cuando R⁴ sea halógeno, y cuando Z no esté presente, R⁷ sea -OH, R⁵, R⁶ y R⁸ sean hidrógeno;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este;

para su uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosomal en un paciente con riesgo de desarrollar o que se le diagnostique dicho trastorno

25

2. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es de Fórmula III:



en donde:

R¹ es C(R²)(R³)(R⁴);

R² es hidrógeno, -OH o halógeno;

5 R³ es hidrógeno, -OH, halógeno o -CH₃;

R⁴ es halógeno, -CH₃, fenilo, fluorofenilo, metilfenilo, ciclohexilmetilo, en donde cuando R⁴ es un halógeno, R² y R³ no pueden ser hidrógeno;

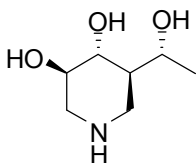
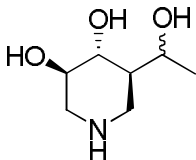
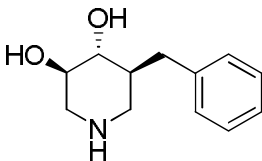
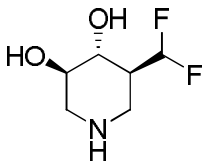
R³ y R⁴ pueden juntarse con el átomo de carbono al que están unidos para formar un anillo cicloalquilo, que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más átomos de halógeno;

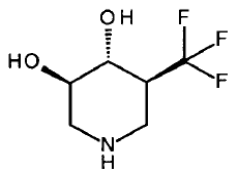
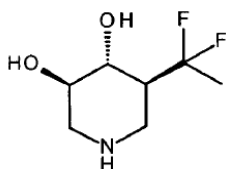
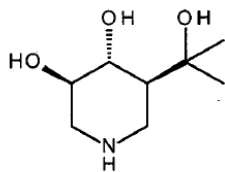
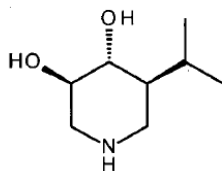
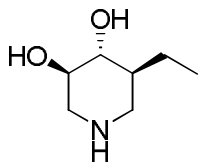
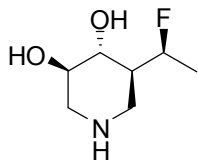
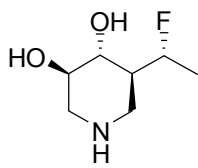
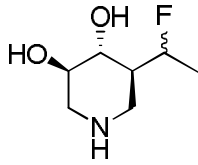
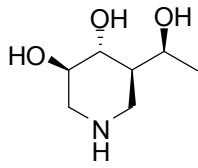
10 R⁷ es -OH; R⁶ es hidrógeno y

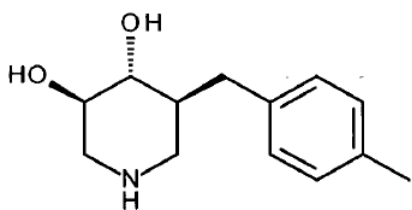
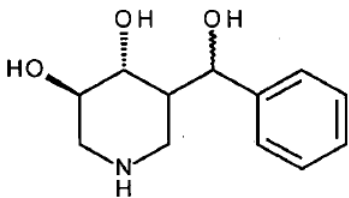
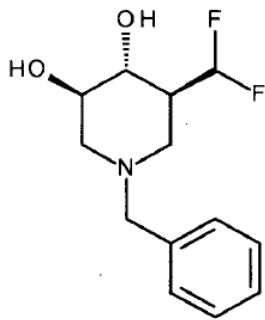
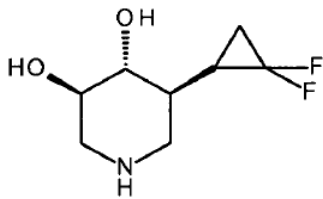
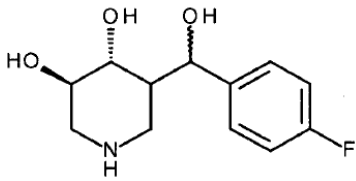
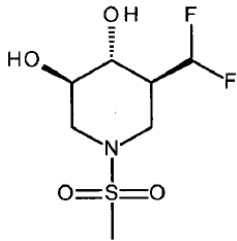
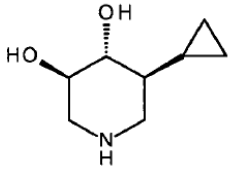
R⁸ es hidrógeno;

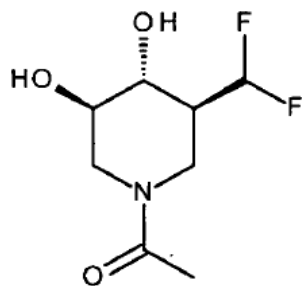
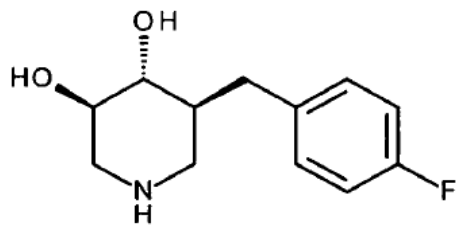
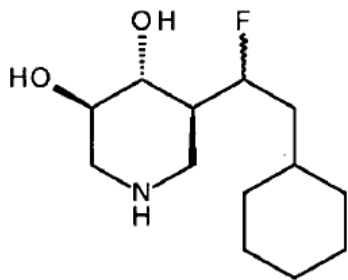
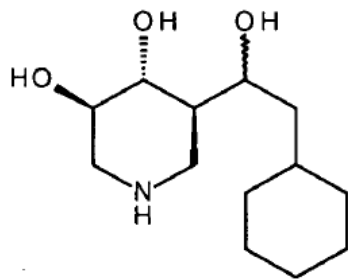
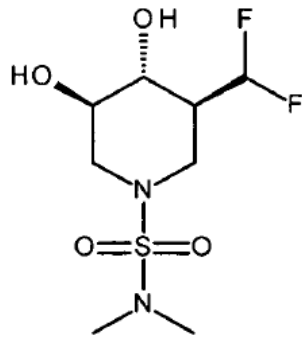
siempre que R² y R³ no sean ambos hidrógeno cuando R⁴ sea un halógeno.

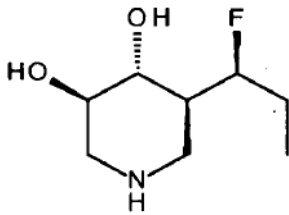
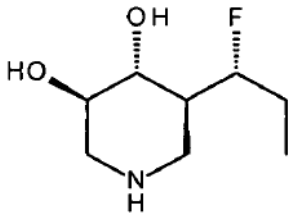
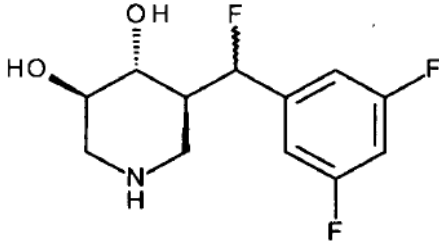
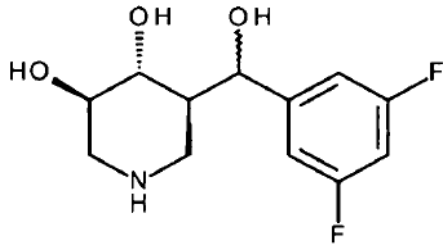
3. Un compuesto seleccionado de:





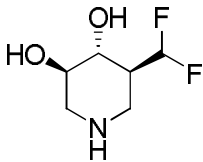






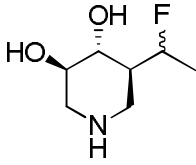
5 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de estos, o cualquier combinación de dos o más de estos; para su uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosomal en un paciente con riesgo de desarrollar o que se le diagnostique dicho trastorno.

4. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, en donde el compuesto es:



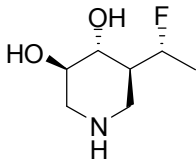
10 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este.

5. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, en donde el compuesto es:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este.

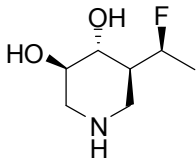
6. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, en donde el compuesto es:



5

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este.

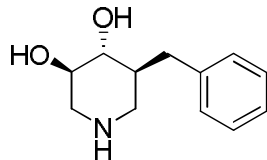
7. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, en donde el compuesto es:



10

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este.

8. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, en donde el compuesto es:



15

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este.

9. Un compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno de almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Niemann-Pick.

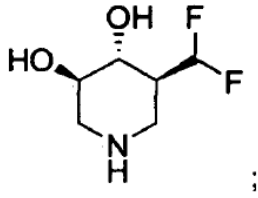
20 10. Un compuesto para su uso según cualquiera de la reivindicaciones 1-8, en donde el trastorno de almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Gaucher.

11. Un compuesto para su uso según cualquiera de la reivindicaciones 1-10, en combinación con al menos otro agente terapéutico.

25 12. Un compuesto para su uso según la reivindicación 11, en donde el o los otros agentes terapéuticos son imiglucerasa o 1,5-(butilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol.

13. Un kit que comprende:

- un recipiente que tiene una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este; e

- 5
- instrucciones para usarlo para prevenir o tratar un trastorno de almacenamiento lisosomal.