

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 703 944**

(51) Int. Cl.:

C07H 17/02 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2014 PCT/US2014/063161**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15069541**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2014 E 14802974 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3066108**

(54) Título: **Acetato de 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido**

(30) Prioridad:

08.11.2013 US 201361901488 P

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

13.03.2019

(73) Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

(72) Inventor/es:

REUTZEL-EDENS, SUSAN MARIE

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 703 944 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).

DESCRIPCION

Acetato de 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-il beta-D-glucopiranoso

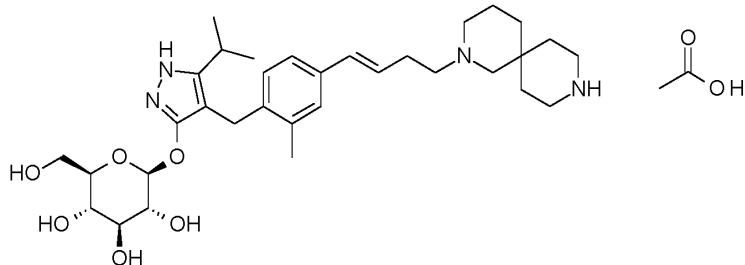
5 La presente invención se refiere a un nuevo inhibidor del SGLT1 que es una sal acetato de un compuesto pirazol, a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto, a procedimientos de uso del compuesto para tratar trastornos fisiológicos, y a compuestos intermedios y procedimientos útiles en la síntesis del compuesto.

10 La presente invención está en el campo del tratamiento de la diabetes y en otras enfermedades y trastornos asociados con la hiperglucemia. La diabetes es un grupo de enfermedades que se caracterizan por altos niveles de glucosa en sangre. Afecta aproximadamente a 25 millones de personas en los Estados Unidos de América y es, igualmente, la 7^a causa de muertes en los Estados Unidos de América, de acuerdo con la 2011 National Diabetes Fact Sheet (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention). Los cotransportadores de glucosa asociada con sodio (SGLT's) son uno de los transportadores conocidos por ser responsables de la absorción de carbohidratos, tal como glucosa. Más específicamente, el SGLT1 es responsable del transporte de glucosa a través de la membrana de borde en cepillo del intestino pequeño. La inhibición del SGLT1 puede dar como resultado una absorción reducida de glucosa en el intestino pequeño, proporcionando, de esta forma, una vía útil para el tratamiento de la diabetes.

15 La Patente de EE.UU. No. 7.655.632 (EP 1544208 A1) divulga ciertos derivados de pirazol con actividad inhibidora del SGLT1 humano, los cuales han sido divulgados además como útiles para la prevención o tratamiento de una enfermedad asociada con la hiperglucemia, tal como la diabetes. La Patente WO 2011/039338 divulga ciertos derivados pirazol con actividad inhibidora del SGLT1/SGLT2, los cuales han sido divulgados además como de ser útiles para el tratamiento de enfermedades óseas, tal como osteoporosis. La Patente WO 2013/169546 A1, publicada el 14 de Noviembre de 2013, divulga la base libre de 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-il beta-D-glucopiranoso.

20 Existe una necesidad de medicamentos alternativos y tratamiento para la diabetes. La presente invención proporciona una sal acetato de un compuesto pirazol, el cual es un inhibidor del SGLT1, y como tal, puede ser adecuado para el tratamiento de ciertos trastornos, tal como la diabetes.

25 De acuerdo con ello, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:



Fórmula I

30 o hidrato del mismo.

La presente invención proporciona igualmente una forma cristalina del compuesto de la Fórmula I que está hidratado.

Además, la presente invención proporciona una forma cristalina de un compuesto de Fórmula I, que está hidratado, caracterizado por al menos uno de lo siguiente:

- 35 a. un diagrama de difracción de polvo por rayos X que usa radiación CuKa, que tiene un pico intenso en el ángulo de difracción 2-teta de 5,2°, en combinación con uno o más picos intensos seleccionados entre el grupo que consiste en 7,8°, 8,0° y 10,7° ($\pm 0,2^\circ$ respectivamente); y
- 40 b. un espectro ^{13}C -RMN de estado sólido que comprende picos intensos referenciados con respecto a la resonancia de alto campo de adamantano ($\delta = 29,5$ ppm) a: 181,8, 161,2, 160,0, 147,6 y 137,4 ppm ($\pm 0,2$ ppm respectivamente);

en el que el término pico intenso significa un pico que tiene una intensidad que es al menos 5% de la del pico el más intenso en el espectro o el patrón de energía adecuado.

La presente invención proporciona, además, una forma cristalina de la Fórmula I que está hidratada, en la que el contenido en agua a temperatura ambiente está dentro del intervalo de 9% a 12% en peso.

Además, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para uso en terapia, en particular, para el tratamiento de la diabetes. Además, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 1. Además, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2. La invención

5 proporciona aún un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para uso en el tratamiento de IGT, IFG, o síndrome metabólico. La presente invención proporciona también el uso de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes. Además, la presente invención proporciona igualmente el uso de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes de tipo 1. La presente invención proporciona también el uso de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes de tipo 2. La invención proporciona también el uso un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de IGT, IFG, o síndrome metabólico.

10 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes aceptables farmacéuticamente. En una realización particular, la composición comprende además uno o más de otros agentes terapéuticos. La presente invención abarca también nuevos compuestos intermedios y procedimientos para la síntesis del compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo.

15 Además, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de un inhibidor del SGLT1 cristalino, que comprende la mezcla de 4-{(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-il}-2-metilbencil]-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido con acetato de etilo húmedo. La invención proporciona además un procedimiento para la preparación de un inhibidor del SGLT cristalino, que comprende la mezcla de 4-{(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-il}-2-metilbencil]-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido con acetato de etilo húmedo y, a continuación, la recogida del sólido resultante.

20 25 El aislamiento y purificación de 4-{(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-il}-2-metilbencil]-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido (base libre) que es un sólido amorfó, requiere el uso de cromatografía, la cual puede ser compleja. El compuesto de Fórmula I permite la mejora en el aislamiento y purificación mediante la eliminación de la cromatografía, y proporciona una forma cristalina con propiedades mejoradas de manipulación y estabilidad de forma para formulación farmacéutica, en particular fabricación comercial y almacenamiento de composiciones farmacéuticas.

30 Tal como se usa en la presente memoria, el término "pico intenso" significa un pico que tiene una intensidad que es al menos 5% de la del pico el más intenso en el espectro o diagrama de polvo adecuado.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "tratamiento" o "para tratar" incluyen restringir, retardar, parar o invertir la progresión o severidad de un síntoma o trastorno existente.

35 Tal como se usa en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero, tal como un ratón, cobayo, rata, perro, o humano. Se sobrentiende que el paciente preferido es un humano.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de compuesto de la invención que, mediante administración de dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnosis o tratamiento.

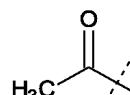
40 Una cantidad eficaz puede ser fácilmente determinada por el diagnosticador que le atienda, tal como un experto en la materia, mediante el uso de técnicas conocidas y mediante la observación de los resultados obtenidos bajo circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad eficaz para un paciente, un cierto número de factores son considerados por el diagnosticador que le atienda, incluyendo, pero sin limitarse a ellos: la especie de mamífero; su tamaño, edad, y salud general; la enfermedad o trastorno específico implicado; el grado o implicación o la severidad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

45 El compuesto de Fórmula I es generalmente eficaz dentro de un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día entran normalmente dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal. En algunas circunstancias, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente indicado pueden ser más que adecuado, en tanto que, en otros casos, pueden usarse dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario perjudicial y, por ello, el intervalo de dosificación anterior no está destinado a limitar de ningún modo el ámbito de la invención.

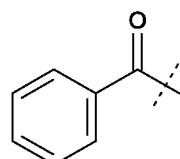
50 55 El compuesto de la invención está preferiblemente formulado como una composición farmacéutica administrada por cualquier vía que haga que el compuesto sea biodisponible. Lo más preferiblemente, dichas composiciones son para administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para su preparación son bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

- En un aspecto adicional de la invención, el compuesto de la presente invención puede administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos, tal como agentes antidiabéticos. La administración en combinación incluye la administración simultánea o secuencial. Además, la administración simultánea de la combinación puede ser en forma de una única dosis de combinación o dosis separadas de cada agente terapéutico. Los ejemplos de agentes antidiabéticos incluyen metformina, un inhibidor de DPPIV, tal como sitagliptina o linagliptina; una sulfonilurea, tal como glimepirida; una tiazolidinodiona, tal como pioglitazona; una insulina basal, tal como glargina; una insulina de rápida actuación, tal como HUMALOG o NOVALOG; un agonista de GLP-1, tal como exenatida o liraglutida; un inhibidor del SGLT2, tal como dapagliflozin o empagliflozin; Un antagonista del receptor de glucagón, tal como LY2409021; y similares.
- 5 El compuesto de Fórmula I puede prepararse tal como se ilustra en las preparaciones, ejemplos y esquemas establecidos más adelante. Los reactivos y materiales de partida se encuentran fácilmente disponibles para un experto normal en la técnica. Salvo que se especifique lo contrario, todos los sustituyentes son tal como previamente se han definido. Se sobrentiende que estos esquemas, preparaciones y ejemplos no están destinados de ningún modo a limitar el alcance de la invención.
- 10 Los ejemplos de resoluciones incluyen técnicas de cristalización selectivas o de cromatografía quiral (Véase, por ejemplo, J. Jacques, y otros, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel y S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Debe quedar claro además para un experto normal en la técnica que el asilamiento y separación, mediante cromatografía, cromatografía quiral o cristalización selectiva, de los diastereómeros individuales o isómeros geométricos puede llevarse a cabo en cualquier punto conveniente en la síntesis.
- 15 20 Tal como se usa en la presente invención, "δ" se refiere a partes por millón más abajo del tetrametilsilano, "min" se refiere a minuto o minutos; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "MeOH" se refiere a metanol o alcohol metílico; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alta eficacia. El término "Ac" se refiere a un acetilo substituido de la estructura siguiente:

25



El término "Bz" se refiere a un substituyente benzoilo de la estructura siguiente:

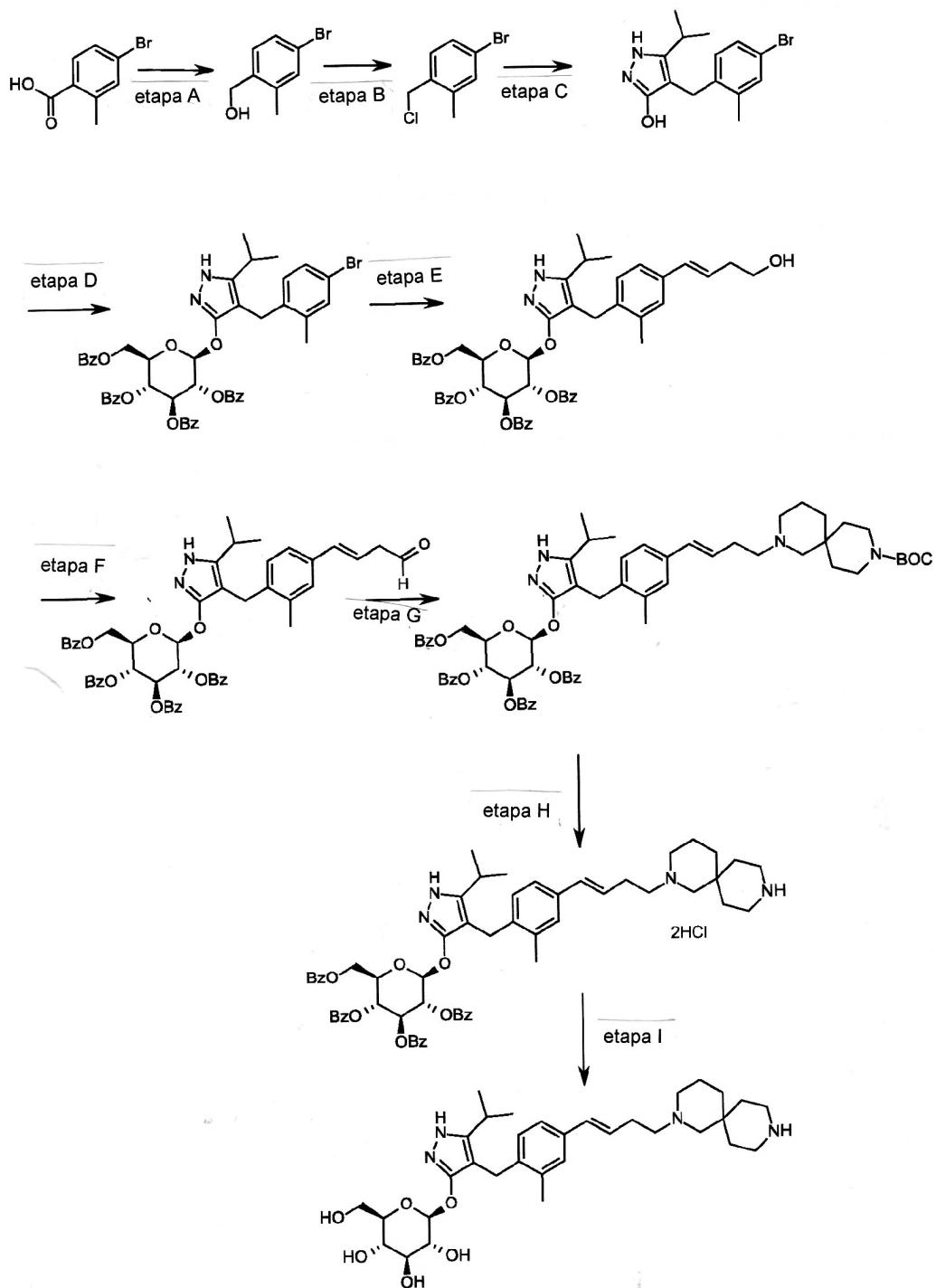


El término "BOC" se refiere a un grupo de protección t-butiloxicarbonilo.

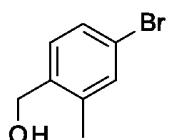
30

35

40

Esquema 1Preparación 1

(4-bromo-2-metil-fenil)metanol



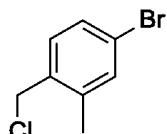
Esquema 1, etapa A: Agregar complejo de borano-tetrahidrofuranico (0,2 mol, 200 ml, solución 1,0 M) a una solución de ácido 4-bromo-2-metilbenzóico (39 g, 0,18 mol) en tetrahidrofuranico (200 ml). Después de 18 horas a temperatura ambiente, separar el disolvente bajo la presión reducida, para dar un sólido. Purificar mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color blanco (32,9 g, 0,16 mol). ^1H -RMN (CDCl_3): δ 1,55 (s, 1H), 2,28 (s, 3H), 4,61 (s, 2H), 7,18-7,29 (m, 3H).

Síntesis alternativa de (4-bromo-2-metil-fenil)metanol

Se agregó complejo de borano-sulfuro de dimetilo (2 M en THF; 116 ml, 0,232 mol) lentamente a una solución de ácido 4-bromo-2-metilbenzóico (24,3 g, 0,113 mol) en tetrahidrofuranico anhídrico (THF, 146 ml) a 3°C. Después de agitación en frío durante 10 min, el baño de enfriamiento se retiró y la reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la solución se enfrió a 5°C, y se agregó lentamente agua (100 ml). Se agregó acetato de etilo (100 ml) y las fases se separaron. La capa orgánica se lavó con solución de NaHCO_3 acuosa saturada (200 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . La filtración y concentración bajo presión reducida proporcionó un residuo, el cual se purificó mediante filtración a través de un lecho pequeño de sílice, eluyéndose con acetato de etilo al 15%/iso-hexano, proporcionando el compuesto del epígrafe (20,7 g, 91,2% de rendimiento). MS (m/z): 183/185 (M+1-18).

Preparación 2

4-bromo-1-clorometil-2-metil-benceno



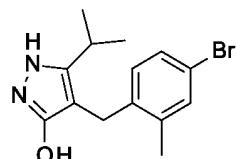
Esquema 1, etapa B: Agregar cloruro de tionilo (14,31 ml, 0,2 mol) a una solución de (4-bromo-2-metil-fenil)metanol (32,9 g, 0,16 mol) en diclorometano (200 ml) y dimetilformamida (0,025 mol, 2,0 ml) a 0°C. Después de 1 hora a temperatura ambiente, verter la mezcla en hielo-agua (100 g), extraer con diclorometano (300 ml), lavar el extracto con bicarbonato sódico acuoso al 5% (30 ml) y salmuera (200 ml), secar sobre sulfato sódico y concentrar bajo presión reducida, para obtener el compuesto del epígrafe bruto en forma de un sólido de color blanco (35,0 g, 0,16 mol). El material se usó para la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. ^1H -RMN (CDCl_3): δ 2,38 (s, 3H), 4,52 (s, 2H), 7,13-7,35 (m, 3H).

Síntesis alternativa de 4-bromo-1-clorometil-2-metil-benceno

Se agregó lentamente cloruro de metanosulfonilo (6,83 ml, 88,3 mmol) a una solución de (4-bromo-2-metil-fenil)metanol (16,14 g, 80,27 mmol) y trietilamina (16,78 ml, 120,4 mmol) en diclorometano (80,7 ml) enfriado en hielo/agua. La mezcla se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. Se agregó cloruro de metanosulfonilo adicional (1,24 ml, 16,1 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se agregó agua (80 ml) y las fases se separaron. La capa orgánica se lavó con ácido clorhídrico (1 N, 80 ml), a continuación con solución de bicarbonato sódico acuoso saturado (80 ml), a continuación con agua (80 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . La filtración y concentración bajo presión reducida proporcionó un residuo, el cual se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyendo con hexano), para dar el compuesto del epígrafe (14,2 g, 80,5% de rendimiento). ^1H -RMN (300,11 MHz, CDCl_3): δ 7,36-7,30 (m, 2H), 7,18 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 4,55 (s, 2H), 2,41 (s, 3H).

Preparación 3

4-[(4-bromo-2-metil-fenil)metyl]-5-isopropil-1*H*-pirazol-3-ol



Esquema 1, etapa C: Agregar hidruro sódico (8,29 g, 0,21 mol, 60% de dispersión en aceite) a una solución de 4-metil-3-oxovalerato de metilo (27,1 ml, 0,19 mol) en tetrahidrofuranico a 0°C. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, agregar una solución de 4-bromo-1-clorometil-2-metil-benceno (35,0 g, 0,16 mol) en tetrahidrofuranico (50 ml). Calentar la mezcla resultante a 70°C durante una noche (18 horas). Agregar HCl 1,0 M (20 ml) para interrumpir la reacción. Extraer con acetato de etilo (200 ml), lavar el extracto con agua (200 ml) y salmuera (200 ml), secar sobre Na_2SO_4 , filtrar y concentrar bajo presión reducida. Disolver el residuo resultante en tolueno (200 ml) y agregar monohidrato de hidracina (23,3 ml, 0,48 mol). Calentar la mezcla a 120°C durante 2 horas con un aparato Dean-Stark para separar el agua. Enfriar y separar el disolvente bajo presión reducida, disolver el residuo con diclorometano (50 ml) y metanol (50 ml). Verter esta solución lentamente en un vaso de pico con agua (250 ml). Recoger el

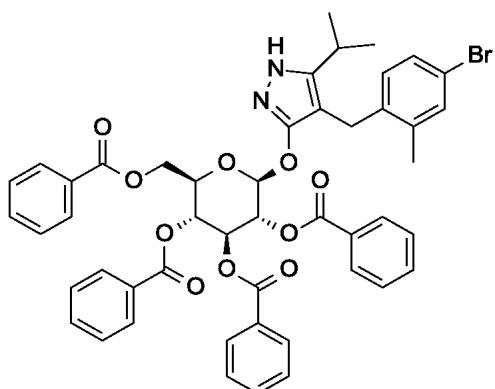
producto precipitado resultante mediante filtración en vacío. Secar en vacío en una estufa durante una noche a 40°C, para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido (48,0 g, 0,16 mol). MS (m/z): 311,0 (M+1), 309,0 (M-1).

Síntesis alternativa de 4-[(4-bromo-2-metil-fenil)metil]-5-isopropil-1*H*-pirazol-3-ol

- 5 Se preparó una solución de 4-bromo-1-clorometil-2-metil-benceno (13,16 g, 59,95 mmol) en acetonitrilo (65,8 ml). Se agregaron carbonato potásico (24,86 g, 179,9 mmol), yoduro potásico (11,94 g, 1,94 mmol) y 4-metil-3-xovalerato de metilo (8,96 ml, 62,95 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Se agregó ácido clorhídrico (2 N) para dar un pH 3. La solución se extrajo con acetato de etilo (100 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (100 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. La mezcla se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo 10 se disolvió en tolueno (65,8 ml) y se agregó monohidrato de hidracina (13,7 ml, 0,180 mol). La mezcla resultante se calentó a reflujo y el agua se separó usando un aparato Dean-Stark. Después de 3 horas, la mezcla se enfrió a 90°C y se agregó monohidrato de hidracina adicional (13,7 ml, 0,180 mol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora. La mezcla se enfrió y concentró bajo presión reducida. El sólido resultante se trituró con agua (200 ml), se filtró y se secó en una estufa de vacío sobre P₂O₅ a 60°C. El sólido se trituró en iso-hexano (200 ml) y se filtró, dando el compuesto del epígrafe (14,3 g, 77,1% de rendimiento). MS (m/z): 309/311 (M+1).
- 15

Preparación 4

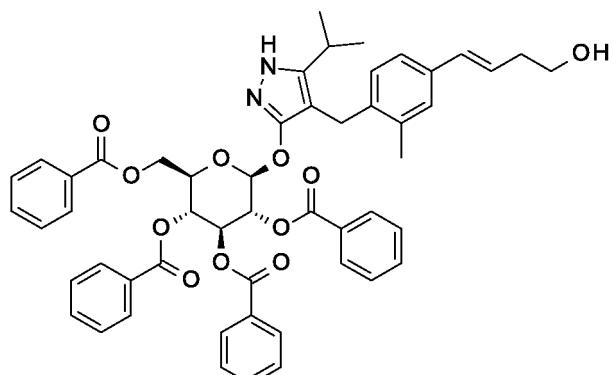
4-(4-bromo-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-beta-D-glucopiranosido



- 20 Esquema1, etapa D: A un matraz de 1 litro, agregar 4-[(4-bromo-2-metil-fenil)metil]-5-isopropil-1*H*-pirazol-3-ol (20 g, 64,7 mmol), tetrabenzooato de alfa-D-glucopiranósil bromuro (50 g, 76 mmol), cloruro de benciltributílamonio (6 g, 19,4 mmol), diclorometano (500 ml), carbonato potásico (44,7 g, 323 mmol) y agua (100 ml). Agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Extraer con diclorometano (500 ml). Lavar el extracto con agua (300 ml) y salmuera (500 ml). Secar la fase orgánica sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar bajo presión reducida. Purificar el residuo mediante chromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto del epígrafe (37 g, 64 mmol). MS (m/z): 889,2 (M+1), 887,2 (M-1).
- 25

Preparación 5

4-{4-[(1*E*)-4-hidroxibut-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-beta-D-glucopiranosido

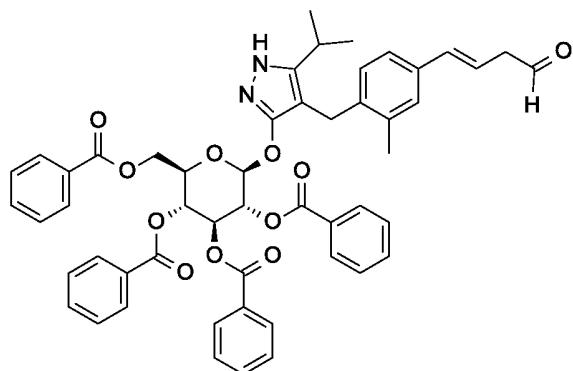


- 30 Esquema 1, etapa E: Agregar 3-buten-1-ol (0,58 ml, 6,8 mmol) a una solución de 4-(4-bromo-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-beta-D-glucopiranosido (3,9 g, 3,4 mmol) en acetonitrilo (30 ml) y trietilamina (20 ml). Desgasificar la solución con nitrógeno durante 10 minutos. Agregar tri-o-tolilfosfina (205 mg, 0,67

mmol) y acetato de paladio (76 mg, 0,34 mmol). Mantener a reflujo a 90°C durante 2 horas. Enfriar a temperatura ambiente y concentrar para separar el disolvente bajo presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto del epígrafe (2,1 g, 2,4 mmol). MS (m/z): 878,4 (M+1).

Preparación 6

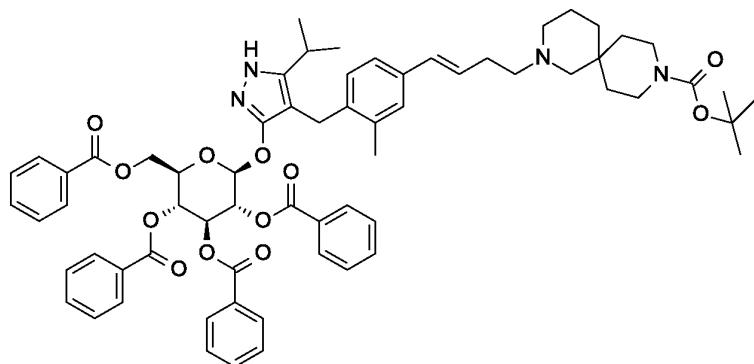
- 5 4-{4-[(1*E*)-4-oxibut-1-en-1-il]-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-beta-D-glucopirano
sido



- 10 Esquema 1, etapa F: Agregar 3,3,3-triacetoxi-3-yodoftalida (134 mg, 0,96 mmol) a una solución de 4-{4-[(1*E*)-4-hidroxibut-1-en-1-il]-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-beta-D-glucopiranosido (280 mg, 0,32 mmol) y bicarbonato sódico (133,8 mg, 1,6 mmol) en diclorometano (20 ml) a 0°C. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, interrumpir la reacción con tiosulfato sódico acuoso saturado (10 ml). Extraer con diclorometano (30 ml). Lavar el extracto con agua (30 ml) y salmuera (40 ml). Secar la fase orgánica sobre sulfato sódico, filtrar, y concentrar bajo presión reducida. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto del epígrafe (270 mg, 0,31 mmol). MS (m/z): 876,5 (M+1), 874,5 (M-1).

15 Preparación 7

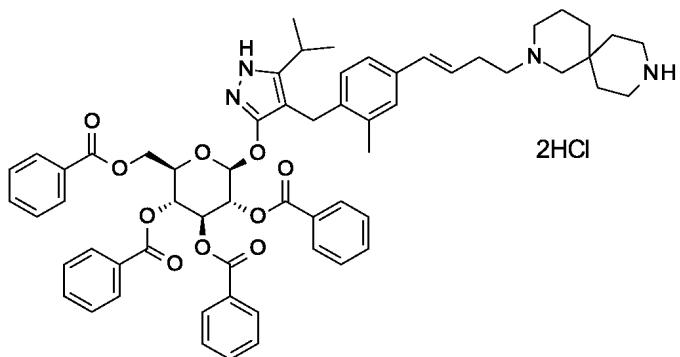
2-{(3*E*)-4-[3-metil-4-({5-(propan-2-il)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-benzoil-beta-D-glucopiranosil)oxi]-1*H*-pirazol-4-il}metil)fenil]-but-3-en-1-il}-2,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo



- 20 Esquema 1, etapa G: Agregar triacetoxiborohidruro sódico (98 mg, 0,46 mmol) a una solución de 4-{4-[(1*E*)-4-oxibut-1-en-1-il]-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-beta-D-glucopiranosido (270 mg, 0,31 mmol) e hidrocloruro de 2,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo (179 mg, 0,62 mmol) en 1,2-diclorometano (5 ml). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, interrumpir la reacción con bicarbonato sódico acuoso saturado (10 ml). Extraer con diclorometano (30 ml). Lavar el extracto con agua (30 ml) y salmuera (40 ml), secar la fase orgánica sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto del epígrafe (275 mg, 0,25 mmol). MS (m/z): 1115,6 M+1).

25 Preparación 8

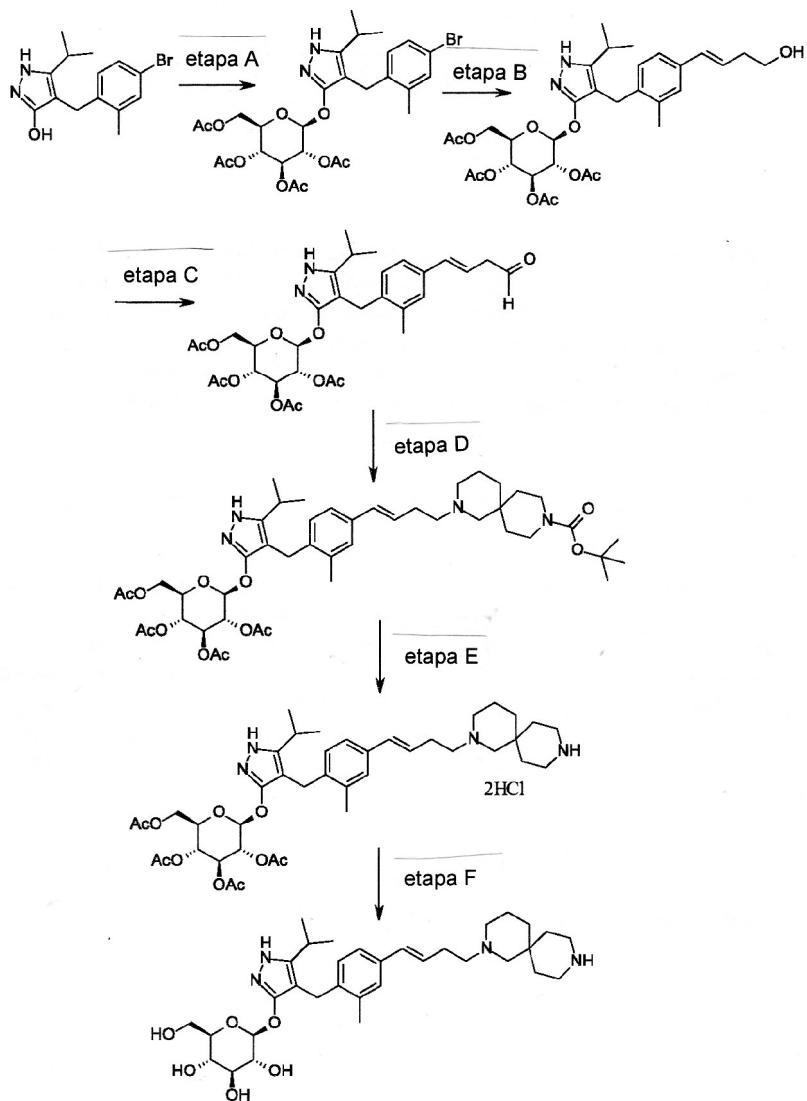
Dihidrocloruro de 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il]-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-beta-D-glucopiranosido



Esquema 1, etapa H: Agregar cloruro de hidrógeno (solución 4,0 M en 1,4-dioxano, 0,6 ml, 2,4 mmol) a una solución de 2-((3E)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1H-pirazol-4-yl}methyl)fe- niil]-but-3-en-1-yl)-2,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo (275 mg, 0,25 mmol) en diclorometano (5 ml). Despues de una noche (18 horas) a temperatura ambiente, concentrar para separar el disolvente bajo presión reducida, para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido (258 mg, 0,24 mmol). MS (m/z): 1015,6 (M+1).

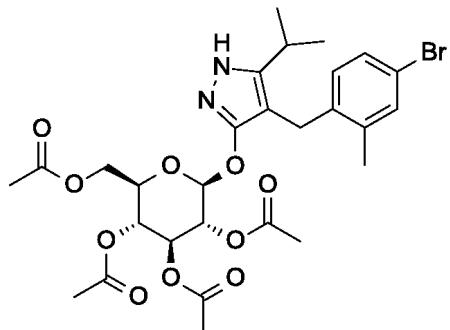
5

Esquema 2



Preparación 9

4-(4-bromo-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranoso



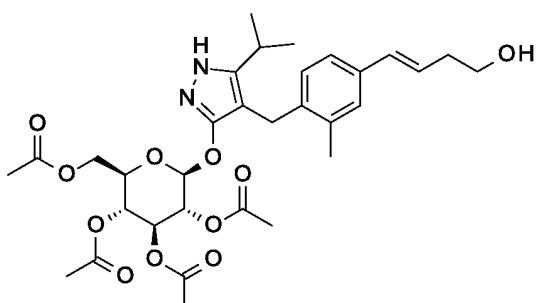
Esquema 2, etapa A: A un matraz de 1 litro, agregar 4-[(4-bromo-2-metil-fenil)metil]-5-isopropil-1*H*-pirazol-3-ol (24 g, 77,6 mmol), bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-alfa-D-glucopiranosoilo (50,4 g, 116 mmol), cloruro de benciltributilamonio (5 g, 15,5 mmol), diclorometano (250 ml), carbonato potásico (32 g, 323 mmol) y agua (120 ml). Agitar la mezcla de reacción durante una noche a temperatura ambiente. Extraer con diclorometano (450 ml). Lavar el extracto con agua (300 ml) y salmuera (500 ml). Secar la fase orgánica sobre sulfato sódico, filtrar, y concentrar bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto del epígrafe (36,5 g, 57 mmol). MS (m/z): 638,5 (M+1), 636,5 (M-1).

Síntesis alternativa de 4-(4-bromo-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranoso

Los reactivos 4-[(4-bromo-2-metil-fenil)metil]-5-isopropil-1*H*-pirazol-3-ol (24 g, 77,6 mmol), bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-alfa-D-glucopiranosoilo (50,4 g, 116 mmol), cloruro de benciltributilamonio (4,94 g, 15,52 mmol), carbonato potásico (32,18 g, 232,9 mmol), diclorometano (250 ml) y agua (120 ml) se combinaron y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se repartió entre diclorometano (250 ml) y agua (250 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (250 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyendo con acetato de etilo al 10% en diclorometano hasta acetato de etilo al 70% en diclorometano) para proporcionar el compuesto del epígrafe (36,5 g, 74% de rendimiento). MS (m/z): 639/641 (M+1).

Preparación 10

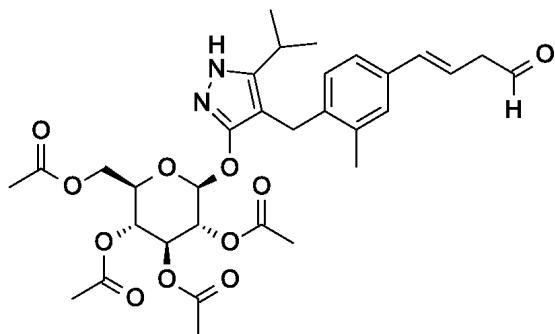
4-{4-[(1*E*)-4-hidroxibut-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranoso



Esquema 2, etapa B: Agregar 3-buten-1-ol (6,1 ml, 70 mmol) a una solución de 4-(4-bromo-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranoso (15 g, 23,5 mmol) en acetonitrilo (200 ml) y trietilamina (50 ml). Desgasificar la solución con nitrógeno durante 10 minutos. Agregar tri-*o*-tolilfosfina (1,43 g, 4,7 mmol) y acetato de paladio (526 mg, 2,35 mmol). Después de mantener a reflujo a 90°C durante 2 horas, enfriar, y concentrar para separar el disolvente bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto del epígrafe (7,5 g, 11,9 mmol). MS (m/z): 631,2 (M+1), 629,2 (M-1).

Preparación 11

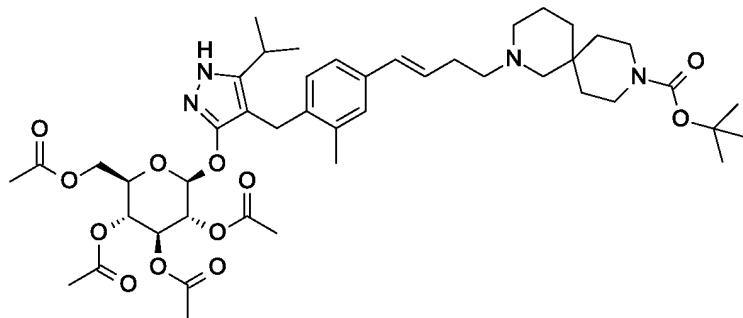
4-{4-[(1*E*)-4-oxibut-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranoso



Esquema 2, etapa C: Agregar 3,3,3-triacetoxi-3-yodoftalida (2,1 g, 4,76 mmol) a una solución de 4-{4-[(1E)-4-hidroxibut-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopiranosido (1,5 g, 2,38 mmol) y bicarbonato sódico (2 g, 23,6 mmol) en diclorometano (50 ml) a 0°C. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, interrumpir la reacción con tiosulfato sódico acuoso saturado (10 ml). Extraer con diclorometano (30 ml), lavar el extracto con agua (30 ml) y salmuera (40 ml). Secar la fase orgánica sobre sulfato sódico, filtrar, y concentrar bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto del epígrafe (0,95 g, 1,51 mol). MS (m/z): 628,8 (M+1), 626,8 (M-1).

Preparación 12a

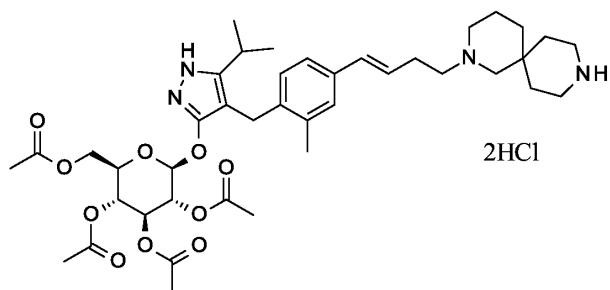
10 2-{(3E)-4-[3-metil-4-({5-(propan-2-il)-3-[{2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopiranosil}oxi]-1H-pirazol-4-il}metil)fenil]-but-3-en-1-il}-2,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo



15 Esquema 2, etapa D: Agregar triacetoxiborohidruro sódico (303 mg, 1,4 mmol) a una solución de 4-{4-[(1E)-4-oxibut-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopiranosido (600 mg, 0,95 mmol) e hidrocloruro de 2,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo (333 mg, 1,2 mmol) en 1,2-diclorometano (30 ml). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, interrumpir la reacción con bicarbonato sódico acuoso saturado (15 ml). Extraer con diclorometano (60 ml). Lavar el extracto con agua (30 ml) y salmuera (60 ml). Secar la fase orgánica sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto del epígrafe (500 mg, 0,58 mmol).
20 MS (m/z): 866,8, 867,8 (M+1), 864,8, 865,8 (M-1).

Preparación 13

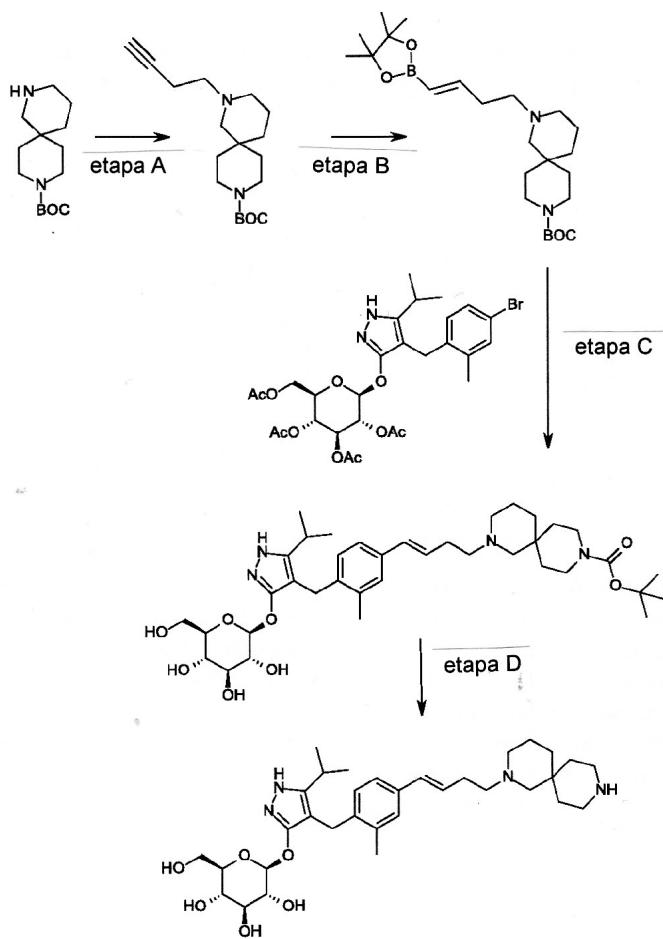
Dihidrocloruro de 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopiranosido



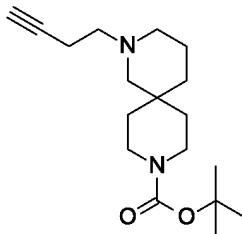
25 Esquema 2, etapa E: Agregar cloruro de hidrógeno (solución 4,0 M en 1,4-dioxano, 1,5 ml, 5,8 mmol) a una solución de 2-{(3E)-4-[3-metil-4-({5-(propan-2-il)-3-[{2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopiranosil}oxi]-1H-pirazol-4-il}metil)fenil]-but-3-en-1-il}-2,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo (500 mg, 0,58 mmol) en diclorometano

(20 ml). Después de 2 horas a temperatura ambiente, concentrar para separar el disolvente bajo presión reducida, para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido (480 mg, 0,57 mmol). MS (m/z): 767,4 (M+1).

Esquema 3

5 Preparación 14

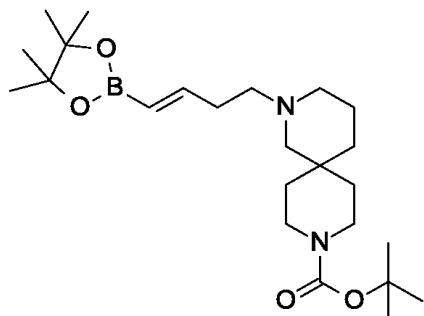
4-but-3-inil-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo



Esquema 3, etapa A: Se agregó carbonato de cesio (46,66 g, 143,21 mmol) a una suspensión de hidrocloruro de 4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo (16,66 g, 57,28 mmol) en acetonitrilo (167 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se agregó 4-bromobutino (6,45 ml, 68,74 mmol). La reacción se calentó a reflujo y se agitó durante 18 horas. La mezcla se enfrió y se concentró bajo presión reducida. El residuo se repartió entre agua (200 ml) y acetato de etilo (150 ml). Las fases se separaron y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (200 ml) y, a continuación, con salmuera (150 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron, y concentraron bajo presión reducida para dar el compuesto del epígrafe (17,2 g, 98% de rendimiento). ¹H-RMN (300,11 MHz, CDCl₃): δ 3,43-3,31 (m, 4H), 2,53-2,48 (m, 2H), 2,37-2,29 (m, 4H), 2,20 (s, 2H), 1,94 (t, J=2,6 Hz, 1H), 1,44 (s, 17H).

Preparación 15

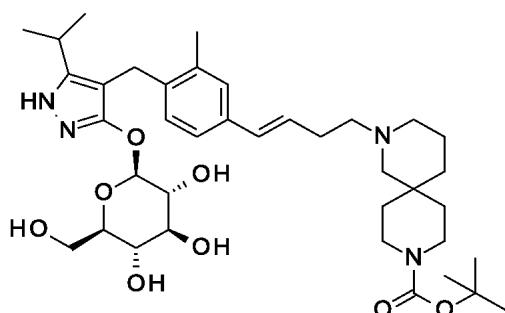
4-[*(E*)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo



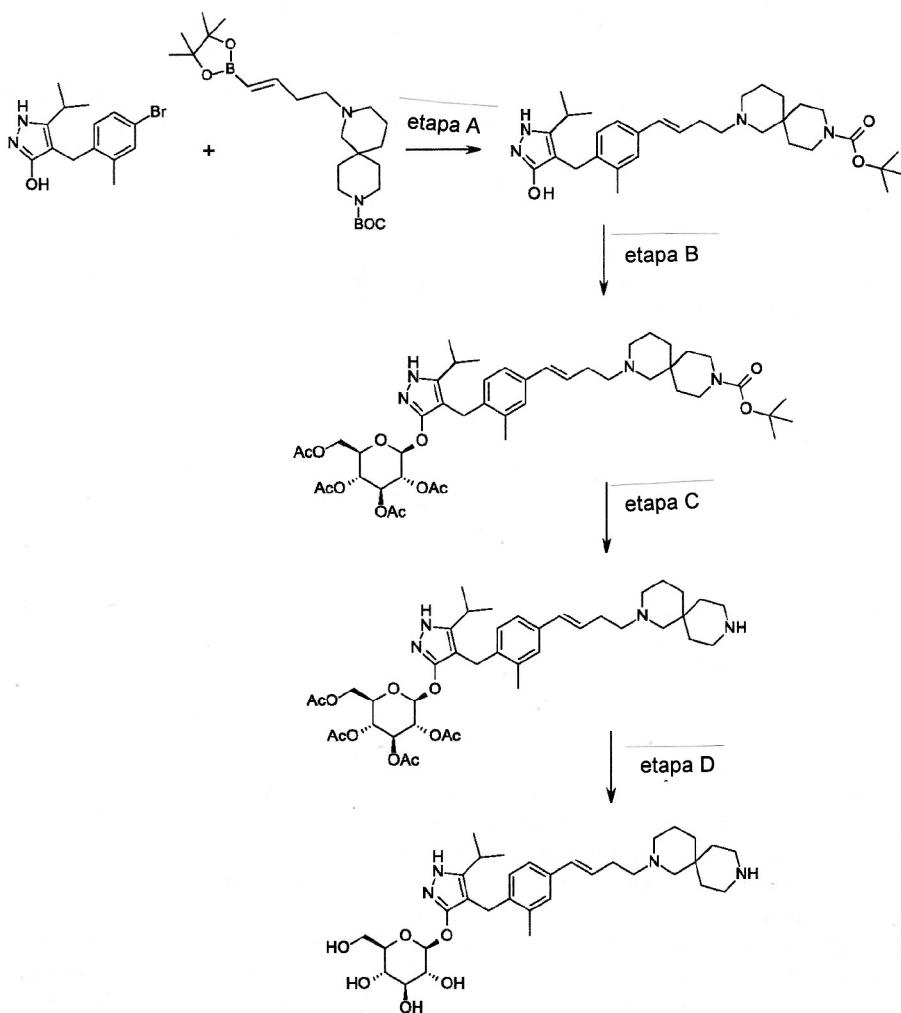
- 5 Esquema 3, etapa B: Se agregaron trietilamina (5,62 mmoles, 0,783 ml), 4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (8,56 ml, 59,0 mmol) y cloruro de zirconoceno (1,45 g, 5,62 mmol) a 4-but-3-enil-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo (17,21 g, 56,16 mmol). La mezcla resultante se calentó a 65°C durante 3,5 horas. La mezcla se enfrió y disolvió en diclorometano (150 ml). La solución resultante se pasó a través de un lecho de ~4 cm de espesor de gel de sílice, eluyéndose con diclorometano (2 x 200 ml). El filtrado se concentró bajo presión reducida dando el compuesto del epígrafe (21,2 g, 87% de rendimiento). ^1H -RMN (300,11 MHz, CDCl_3): δ 6,65-6,55 (m, 1H), 5,49-5,43 (m, 1H), 3,42-3,29 (m, 4H), 2,40-2,27 (m, 6H), 2,25-2,08 (m, 2H), 1,70-1,13 (m, 29H).
- 10

Preparación 16

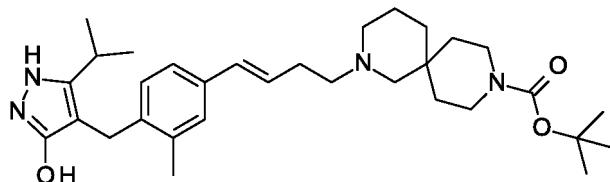
2-{(3*E*)-4-[3-metil-4-({5-(propan-2-il)-3-beta-D-glucopiranosil}oxi)-1*H*-pirazol-4-il]metil}fenil]but-3-en-1-il}-2,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo



- 15 Esquema 3, etapa C: Una solución de 4-(4-bromo-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranoso (20 g, 31,3 mmol), 4-[*(E*)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo (16,3 g, 37,5 mmol) y carbonato potásico (12,97 g, 93,82 mmol) en tetrahidrofurano (200 ml) y agua (40 ml), se desgasificó durante 15 minutos mediante borboteo de gas nitrógeno a través de la misma. Se agregaron $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (140 mg, 625 μmol) y 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-tri-i-propil-1,1'-bifenilo (0,596 g, 1,25 mmol) y la reacción se calentó a refluo durante 16 horas. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se agregó metanol (200 ml). Después de 30 minutos, el disolvente se separó mediante presión reducida. La mezcla se repartió entre acetato de etilo (500 ml) y salmuera (500 ml), agregándose MgSO_4 (1 M, 500 ml) para ayudar a la separación de la fase. Las capas se separaron y la capa orgánica se secó sobre MgSO_4 y se filtró a través de un lecho de gel de sílice de 10 cm, eluyéndose con acetato de etilo (~1,5 litros). El filtrado se descartó y el lecho de gel de sílice se fluidificó con MeOH al 5% en THF (2 litros). El filtrado metanólico se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto del epígrafe (20,1 g, 92%). MS (m/z): 699 (M+1).
- 20
- 25

Esquema 4Preparación 17

5 4-[(E)-4-[4-[(3-hidroxi-5-isopropil-1H-pirazol-4-il)metil]-3-metilfenil]but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo

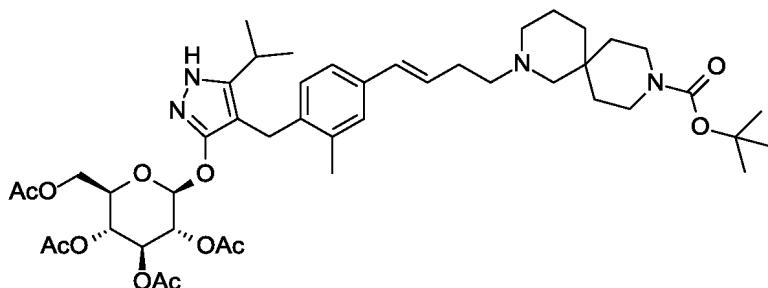


Esquema 4, etapa A: Agregar 4-[(E)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]-undecano-9-carboxilato de terc-butilo (35,8 kg, 82,4 mol) en metanol (130 litros) a una solución de (4-[4-bromo-2-metil-fenil]metil)-5-isopropil-1H-pirazol-3-ol (23,9 kg, 77,3 mol) en metanol (440 litros) a temperatura ambiente. Agregar agua (590 litros) y fosfato tripotásico (100 kg, 471,7 mol) y colocar la reacción bajo atmósfera de nitrógeno. A la solución en agitación, agregar una suspensión de tris(dibencilidenoacetona) dipaladio (1,42 kg, 1,55 mol) y tetrafluoroborato de di-terc-butilmetilfosfonio (775 g, 3,12 mol) en metanol (15 litros). La mezcla resultante se calentó a 75°C durante 2 horas. Enfriar la mezcla y filtrarla sobre tierra de diatomeas. Lavar la torta del filtro con metanol (60 litros) y concentrar el filtrado bajo presión reducida. Agregar acetato de etilo (300 litros), separar las capas, y lavar la capa orgánica con salmuera al 15% (3 x 120 litros). Concentrar la capa orgánica bajo presión reducida, agregar acetato de etilo (300 litros), y agitar la mezcla durante 18 a 20 horas. Agregar heptano (300 litros) enfriar la mezcla a 10°C, y agitar la mezcla durante un tiempo adicional de 18 a 20 horas. Recoger los sólidos resultantes mediante filtración, lavar la torta con acetato de etilo/heptano (2:3, 2 x 90 litros), y secar bajo vacío a 40°C para dar el compuesto del epígrafe (29,3 kg, 70,6% de rendimiento) en forma de un sólido de color blanco. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,14

(s, 1H), 7,07 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 6,92 (d, J= 7,6 Hz, 1H), 6,39 (d, J= 16,0 Hz, 1H), 6,25-6,12 (m, 1H), 3,63 (s, 2H), 3,45-3,38 (bs, 3H), 3,34 (s, 3H), 3,33 (s, 3H), 2,85-2,75 (m, 1H), 2,49-2,40 (m, 5H), 2,33 (s, 3H), 1,68-1,62 (m, 2H), 1,60-1,36 (m, 15H), 1,11 (s, 3H), 1,10 (s, 3H).

Preparación 12b

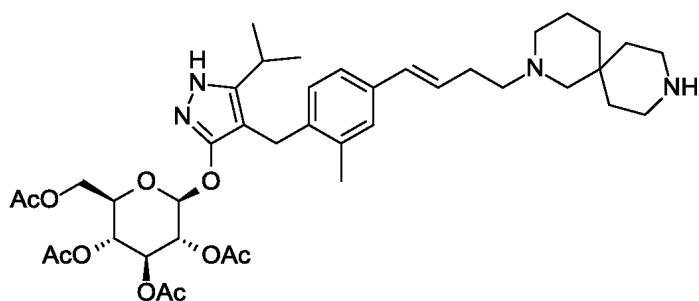
- 5 Preparación alternativa de 2-{(3E)-4-[3-metil-4-({5-(propan-2-il)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopiranosil)oxi]-1H-pirazol-4-il}metil)fenil]but-3-en-1il}-2,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo



- 10 Esquema 4, etapa B: Combinar 4-[{(E)-4-[4-[(3-hidroxi-5-isopropil-1H-pirazol-4-il)metil]-3-metilfenil]but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo (17,83 kg, 33,2 mol), acetonitrilo (180 ml), y cloruro de bencilmotrilamonio (1,52 kg, 4,87 mol) a temperatura ambiente. Agregar lentamente carbonato potásico (27,6 kg, 199,7 mol) y agitar la mezcla durante 2 horas. Agregar bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-alfa-D-glucopiranosilo (24,9 kg, 60,55 mol), calentar la mezcla de reacción a 30°C y agitar durante 18 horas. Concentrar la mezcla bajo presión reducida y agregar acetato de etilo (180 litros), seguido de agua (90 litros). Separar las capas, lavar la fase orgánica con salmuera al 15% (3 x 90 litros), concentrar la mezcla, y purificar usando cromatografía de columna sobre gel de sílice (63 kg, acetato de etilo/heptanos como eluyente (1:2 → 1:0)) para proporcionar el compuesto (19,8 kg, 94% de pureza, 68,8% de rendimiento) en forma de una espuma de color amarillo. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,13 (s, 1H), 7,03 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 6,78 (d, J= 8,0, 1H), 6,36 (d, J= 16,0, 1H), 6,25-6,13 (m, 1H), 5,64 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 5,45-5,25 (m, 2H), 5,13-4,95 (m, 2H), 4,84-4,76 (m, 1H), 4,25-4,13 (m, 2H), 4,10-4,00 (m, 2H), 3,90-3,86 (m, 1H), 3,58-3,50 (m, 2H), 3,40-3,22 (m, 4H), 2,89-2,79 (m, 1H), 2,10-1,90 (m, 18H), 1,82 (s, 3H), 1,62-0,82 (m, 22H).
- 15

Preparación 18

- 20 2-{(3E)-4-[3-metil-4-({5-(propan-2-il)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopiranosil)oxi]-1H-pirazol-4-il}metil)fenil]but-3-en-1il}-2,9-diazaespiro[5.5]undecano

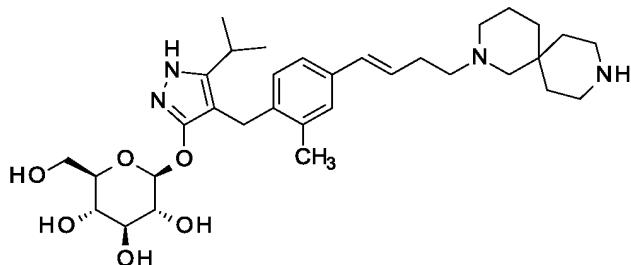


- 25 Esquema 4, etapa C: Combinar 2-{(3E)-4-[3-metil-4-({5-(propan-2-il)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopiranosil)oxi]-1H-pirazol-4-il}metil)fenil]but-3-en-1il}-2,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo (19,6 kg, 22,6 mol) con diclorometano (120 litros) y enfriar a 0°C. Agregar lentamente ácido trifluoroacético (34,6 litros, 51,6 kg, 452 mol) y agitar durante 9 horas. Interrumpir la reacción con agua/hielo (80 litros), y agregar hidróxido amónico (85-90 litros) para ajustar la mezcla de reacción a pH (8-9). Agregar diclorometano (120 litros), calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, y separar las capas. Lavar la capa orgánica con agua (75 litros), salmuera, y concentrar bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del epígrafe (16,2 kg, 95,0% de pureza, 93% de rendimiento) en forma de un sólido de color amarillo. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,08 (s, 1H), 6,99 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 6,76 (d, J= 7,6 Hz, 1H), 6,38 (d, J= 15,6 Hz, 1H), 6,00-5,83 (m, 1H), 5,31 (d, J= 7,6 Hz, 1H), 5,25-5,13 (m, 4H), 4,32 (dd, J= 12,8, 9,2 Hz, 1H), 4,14 (d, J= 11,2 Hz, 1H), 3,90 (d, J= 10,0 Hz, 1H), 3,75-3,50 (m, 3H), 3,30-3,00 (m, 5H), 2,85-2,75 (m, 1H), 2,70-2,48 (m, 3H), 2,25 (s, 1H), 2,13-1,63 (m, 19H), 1,32,1,21 (m, 1H), 1,14 (s, 3H), 1,13 (s, 3H), 1,12 (s, 3H), 1,10 (s, 3H).
- 30
- 35

Ejemplo 1

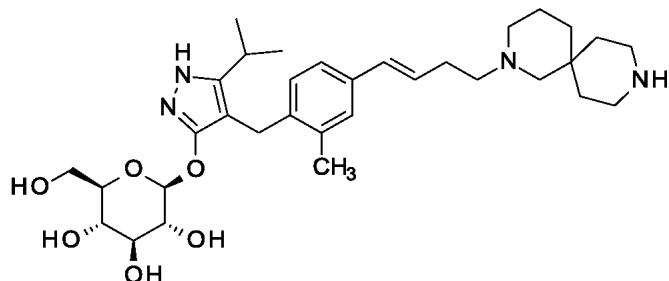
Acetato de 4-{4-[{(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il}2-metilbencil]-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado

Primera preparación alternativa de 4-{(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il}-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido (base libre)



Esquema 1, etapa I: Agregar hidróxido sódico (0,05 ml, 0,5 mmol, solución 1,0 M) a una solución de dihidrocloruro de 4-{(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il}-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranosido (258 mg, 0,24 mmol) en metanol (2 ml). Después de 2 horas a 40°C, concentrar para separar el disolvente bajo presión reducida para dar un residuo, el cual se purificó mediante procedimiento de HPLC preparativa: pH alto, 25% de B durante 4 min, 25-40% de B durante 4 min @ 85 ml/min usando una columna C18XBridge OBD de 30 x 75 mm, 5 µm, disolvente A - H₂O con NH₄HCO₃ @ pH 10, disolvente B - MeCN para proporcionar el compuesto del epígrafe (base libre) en forma de un sólido (46 mg, 0,08 mmol). MS m/z: 598,8 (M+1), 596,8 (M-1).

Segunda preparación alternativa de 4-{(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il}-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido (base libre)

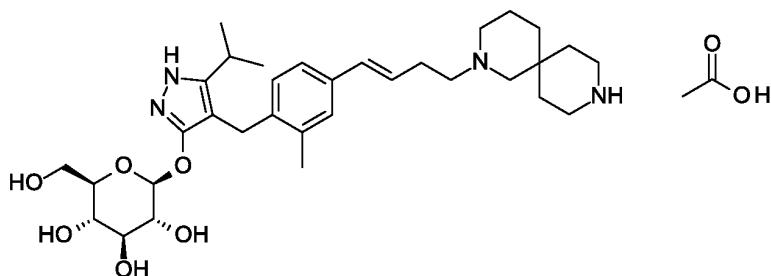


Esquema 2, etapa F: Agregar metanol (5 ml), trietilamina (3 ml), y agua (3 ml) a dihidrocloruro de 4-{(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il}-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopiranosido (480 mg, 0,24 mmol). Después de 18 horas (una noche) a temperatura ambiente, concentrar a sequedad bajo presión reducida. Purificar el residuo resultante mediante procedimiento de HPLC preparativa: pH alto, 25% de B durante 4 min, 25-40% de B durante 4 min @ 85 ml/min usando una columna C18XBridge OBD de 30 x 75 mm, 5 µm, disolvente A - H₂O con NH₄HCO₃ @ pH 10, disolvente B - MeCN para proporcionar el compuesto del epígrafe (base libre) en forma de un sólido (50 mg, 0,08 mmol). MS m/z: 598,8 (M+1), 596,8 (M-1). ¹H-NMR (400,31 MHz, CD₃OD): δ 7,11 (d, J= 1,3 Hz, 1H), 7,04 (dd, J= 1,3, 8,0 Hz, 1H), 6,87 (d, J= 8,0 Hz, 1H), 6,36 (d, J= 15,8 Hz, 1H), 6,16, (dt, J= 15,8, 6,3 , 1H), 5,02 (m, 1H), 3,81 (d, J= 11,7 Hz, 1H), 3,72 (d, J= 16,8 Hz, 1H), 3,68 (d, J= 16,8 Hz, 1H), 3,64, (m, 1H), 3,37-3,29 (m, 4H), 2,79 (m, 1H), 2,72 (t, J= 5,8 Hz, 4H), 2,44-2,33 (m, 6H), 2,30 (s, 3H), 2,26 (s ancho, 1,59), 1,50 (m, 2H), 1,43 (m, 2H), 1,36 (m, 2H), 1,11 (d, J= 7,0 Hz, 3H), 1,10 (d, J= 7,0 Hz, 3H).

Tercera preparación alternativa de 4-{(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il}-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido

Esquema 3, etapa D: Se agregó ácido trifluoroacético (32,2 ml, 0,426 mol) a una solución de 2-{(3*E*)-4-[3-metil-4-(5-(propan-2-il)-3-beta-D-glucopiranosiloxy]-1*H*-pirazol-4-il}metilfenil]but-3-en-1-il}-2,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de terc-butilo (14,87 g, 21,28 mmol) en diclorometano (149 ml) enfriado en agua/hielo. La solución se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, la mezcla se agregó lentamente a amoníaco en MeOH (2 M, 300 ml) aplicando enfriamiento cuando fue necesario para mantener una temperatura constante. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó usando resina SCX-2. El filtrado básico se concentró bajo presión reducida y el residuo se trituró/ultrasonidos en acetato de etilo, se filtró y se secó. El sólido resultante se disolvió en MeOH (200 ml) y se concentró en vacío. Esto se repitió varias veces para dar el compuesto del epígrafe (base libre) (12,22 g, 96% de rendimiento). MS (m/z): 599 (M+1); [α]_D²⁰ = -12° (C=0,2, MeOH).

Preparación del compuesto del epígrafe final, acetato de 4-{(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il}-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado



Se introdujo 4-{(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il}-2-metilbencil]-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido (902 mg) en un matraz de fondo redondo (100 ml) y se trató co acetato de etilo húmedo (18 ml). [Nota - el acetato de etilo húmedo se preparó mezclando acetato de etilo (100 ml) y agua desionizada (100 ml)].

5 Después del mezclado, las capas se dejaron separar, y la capa de acetato de etilo húmeda de la parte superior se retiró para su uso. El ácido acético es un producto de hidrólisis del acetato de etilo y está presente en el acetato de etilo húmedo]. El compuesto se disolvió, aunque no completamente, conforme se agregaba el acetato de etilo húmedo. Después de varios minutos, se formó un precipitado de color blanco. Se agregó una cantidad adicional de acetato de etilo húmedo (2 ml) para disolver el compuesto remanente. La solución se dejó en agitación sin tapar 10 durante una noche a temperatura ambiente durante cuyo tiempo el disolvente se evaporó parcialmente. El disolvente remanente procedente de la lechada de producto se separó bajo vacío, y el sólido resultante se secó bajo una corriente de nitrógeno, para proporcionar el compuesto del epígrafe final en forma de un sólido cristalino. Una pequeña cantidad de material amorfó se identificó en el producto mediante RMN de estado sólido. Este compuesto del epígrafe final cristalino puede usarse como cristales de siembra para preparar compuesto del epígrafe final cristalino adicional.

15

Preparación alternativa del compuesto del epígrafe final, acetato de 4-{(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il}-2-metilbencil]-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado

Bajo una corriente de nitrógeno, combinar 4-{(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il}-2-metilbencil]-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranosido (2,1 kg, 2,74 mol), metanol (4,4 litros), tetrahidrofurano (4,2 litros), y agua (210 ml). Agregar carbonato potásico (460 g, 3,33 moles) y agitar durante cuatro a seis horas y, a continuación, filtrar la mezcla de reacción para separar los sólidos. Concentrar el filtrado bajo presión reducida y, a continuación, agregar etanol (9,0 litros) seguido de ácido acético (237 ml, 4,13 mol) y agitar a temperatura ambiente durante una hora. A la solución en agitación agregar acetato de etilo (10 litros, conteniendo aproximadamente 3% p/p de agua) lentamente durante cinco horas, seguido de agua (500 ml). Agitar la suspensión durante doce horas y agregar acetato de etilo húmedo (4,95 litros, conteniendo aproximadamente 3% p/p de agua) durante un periodo de ocho horas. Agitar la suspensión durante doce horas y agregar acetato de etilo húmedo adicional (11,5 litros conteniendo aproximadamente 3% p/p de agua) lentamente durante diecisésis horas. Agitar la suspensión durante doce horas, recoger los sólidos mediante filtración y lavar los sólidos con acetato de etilo húmedo (3,3 litros conteniendo aproximadamente 3% p/p de agua). Secar en una estufa bajo presión reducida por debajo de 30°C para dar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido cristalino de color blanquecino (1,55 kg, 2,35 mol, 96,7% de pureza, 72,4% p/p de potencia, 68,0% de rendimiento en base a su potencia). HRMS (m/z): 599,3798(M+1).

Difracción de polvo por rayos X (XRD)

Los diagramas de XRD de los sólidos cristalinos se obtuvieron sobre un difractómetro de polvo por rayos X Bruker D8 Advance, equipado con una fuente CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) y un detector Linkeye, operando a 40 kV y 40 mA. La muestra se escaneó entre 4 y 40° en 2-teta, con un tamaño de etapa de 0,0084° en 2-teta y una velocidad de escaneo de 0,5 segundo/etapa, y con una rendija de divergencia de 0,2 mm. El polvo seco se empaquetó sobre un soporte de muestras de bajo contenido en sílice y se obtuvo una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. Los diagramas de difracción de la forma cristalina se recogieron a 22°C y una humedad relativa del 42%. Es bien sabido en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma cristalina dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida como resultado de diversos factores, tales como la morfología del cristal. En los casos en que están presentes los efectos de la orientación preferida, las intensidades de los picos están alteradas, pero las posiciones de los picos característicos del polimorfo no cambian. Véase, por ejemplo, The United States Pharmacopoeia #23, National Formulary #18, págs. 1843-1844, (1995). Además, es bien sabido en la técnica cristalográfica que para cualquier forma cristalina dada, las posiciones de los picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden desplazarse debido a una variación en la temperatura o humedad a la cual se analiza una muestra, a desplazamiento de la muestra, o a la presencia o ausencia de un patrón interno. En el presente caso, una variabilidad en la posición del pico de $\pm 0,2$ en 2-teta tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin estorbar la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de la forma cristalina puede hacerse en base a cualquier combinación única de distinción de picos (en unidades de ° 2-teta), típicamente los picos más prominentes. Los diagramas de difracción de la forma cristalina, recogidos a temperatura y humedad relativa ambiente, están ajustados en base al National Bureau of Standards (NBS) 675 picos estándar a 8,853 y 26,774 grados 2-teta.

Una muestra preparada de acetato de 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado se caracterizó mediante un diagrama de XRD usando radiación CuK conteniendo picos de difracción (valores 2°-teta) tal como se describe en la Tabla 1 más adelante, y en particular conteniendo picos a 5,2° en combinación con uno o más de los picos seleccionados entre el grupo que consiste en 7,8°, 8,0° y 10,7° ($\pm 0,2^\circ$, respectivamente).

5 Picos de difracción de polvo por rayos X de 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado

Tabla 1

Pico	Angulo (2°-teta) +/-0,2°	Intensidad relativa (% del pico el más intenso)
1	5,2	100
2	7,8	22,6
3	8,0	30,4
4	10,1	25,6
5	10,5	29,8
6	10,7	63,8
7	12,0	12,8
8	15,0	14,3
9	15,8	16,7
10	18,6	32,4
11	19,8	26,5
12	20,9	18,2

10 ¹³C-RMN de estado sólido (¹³C-RMNss)

Los espectros de ¹³C-RMN de polarización cruzada/giro de ángulo mágico (RMN de estado sólido o RMNss) se obtuvieron usando un espectrómetro de RMN de 400 MHz Bruker Advance operando a una frecuencia del carbono de 100,622 MHz y frecuencia del protón de 400,131 MHz y equipado con una sonda de resonancia doble Bruker de 4 mm. La supresión de la banda lateral TOSS se usó conjuntamente con polarización cruzada usando desacoplamiento SPINAL64 y una RAMP100 conformada con pulso CP de núcleo H. Los parámetros de registro fueron los siguientes: anchura de 2,6 μ s del pulso de r.f. del protón de 90°, tiempo de contacto de 2,0 ms, tiempo de repetición del pulso de 3 s, frecuencia MAS de 10 kHz, anchura espectral de 30 kHz, tiempo de registro de 34 ms y el número de escáner de 18.661. Los desplazamientos químicos se referenciaron al adamantano ($\delta = 29,5$ ppm) en un experimento separado.

20 Las resonancias ¹³C-RMNss representativas para el acetato de 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-il beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado incluyen: 181,8, 161,2, 160,0, 147,6, 137,4, 135,9, 135,3, 132,6, 131,6, 129,4, 127,3, 126,4, 122,2, 101,9, 99,7, 98,5, 97,9, 78,3, 77,7, 77,2, 76,3, 75,6, 69,1, 68,1, 64,2, 62,6, 60,1, 56,1, 54,2, 41,7, 40,5, 39,1, 34,7, 32,3, 31,5, 31,0, 29,2, 27,8, 26,4, 23,8, 20,8, 19,9, 18,4, y 16,9 ppm ($\pm 0,2$ ppm, respectivamente).

25 Ensayos del transportador de glucosa dependiente de sodio 1 (SGLT1) y SGLT2

El ADNc de codificación del SGLT1 humano (*slc5a1*, NM 000343), del SGLT2 humano (*slc5a2*, NM 003041) y del SGLT1 de ratón (*slc5a1*, NM 019810.4) se adquirieron de Openbiosystems, Invitrogen y Openbiosystems, respectivamente. El ADNc se clonó en pcDNA3.1+ para expresión mamífera y se transfeció de manera estable en células de ovarios de hámster chino (CHO)-K1 usando procedimientos de transfección de mamíferos convencionales. De cada línea de células de sobre-expresión se seleccionó un sub-clón de expresión del SGLT, en base a la resistencia a la neomicina (Geneticin, Invitrogen) y a la actividad en el ensayo de retención de ¹⁴C- α -metil-D-glucopiranosido (¹⁴C-AMG) (véase más adelante). Las células que expresan SGLT de manera estable se mantuvieron usando tecnologías de cultivo de células convencionales.

La actividad del SGLT se midió como retención de ^{14}C -AMG dependiente de sodio en las líneas de células anteriores, tal como se describe más adelante. Cien μl de medio de cultivo conteniendo 30.000 células se sembraron en cada pocillo de una placa de poli-D-lisina BioCoat de 96 pocillos (Becton Dickson) y se cultivaron a 37°C durante una noche. El medio de cultivo se aspiró y las células se lavaron dos veces con 200 μl de Tampón de Reacción (NaCl 140 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1mM, MgCl₂, y ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanosulfónico 14 mM (Hepes), pH 7,5). El exceso de tampón se eliminó sobre toallas de papel. A cada pocillo se agregaron treinta y cinco μl de Tampón de Reacción. Dentro de cada pocillo se dispensaron cinco μl de un dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en Tampón de Reacción conteniendo concentraciones variables del compuesto de ensayo o sin compuesto como un control. La reacción se inició mediante la adición de 10 μl de ^{14}C -AMG en Tampón de Reacción, para obtener una concentración final de 4 μM . La placa se incubó a 37°C durante 125 minutos. La reacción se terminó mediante la retirada por aspiración del Tampón de Reacción y, a continuación, se lavó tres veces con 200 μl de tampón de reacción enfriado en hielo. Se aplicó aspiración manual con el fin de asegurar la completa retirada del Tampón de Reacción. A cada pocillo se agregaron diez μl de NaOH 0,1 N y, a continuación, se agregaron 100 μl de cóctel de centelleo Supermix (Perkin Elmer). Después de mezclados, se contó la señal de centelleo en la placa en un Microbeta (Perkin Elmer). Se ajustó una curva de dosis-respuesta a un modelo de cuatro parámetros empírico usando Activity-Base (ID Business Solution) para determinar la concentración del inhibidor a la inhibición semi-máxima (IC₅₀). La base libre del Ejemplo 1 se ensayó esencialmente tal como se ha descrito anteriormente.

Tabla 2: Potencia *in vitro* de la base libre del Ejemplo 1 contra SGLT1 y SGLT2

Compuesto de ensayo	SGLT1 humano IC ₅₀ , nM	SGLT2 humano IC ₅₀ , nM	SGLT1 de ratón IC ₅₀ , nM
Ejemplo 1 (base libre)	26 ± 20 (n=10)	6100 ± 1200 (n=10)	10 ± 2 (n=9)

Más específicamente, los datos en la Tabla 2 demuestran que la base libre del Ejemplo 1 inhibe el SGLT1 humano y de ratón *in vitro*, y es más potente en el SGLT1 humano y de ratón que en el SGLT2 humano *in vitro*.

Efectos de la reducción de glucosa en el ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT)

El compuesto de ensayo se formuló mediante la adición de un vehículo de hidroxietilcelulosa al 1%, Tween®_80 w al 0,25%/antiespuma al 0,05% al compuesto de ensayo previamente pesado para obtener una solución de 1 mg/ml. La mezcla se trató con una sonda de ultrasonidos durante aproximadamente 30 segundos. La solución resultante se usó como una solución patrón a partir de la cual las soluciones de dosis de concentración más bajas se prepararon mediante dilución con el vehículo.

Ratones C57Bl/6 alojados individualmente se mantuvieron en ayunas durante una noche, retirando el acceso a la comida la última tarde antes del día del ensayo. A la mañana siguiente, los ratones se pesaron y se tomó una muestra de sangre en ayunas individual mediante corte en la cola para medir la glucosa mediante un glucómetro (Roche AccuChek). Se determinaron grupos de estudio (n=5) en base a la glucosa en sangre en ayunas y comprende preferiblemente animales dentro del intervalo de 80-100 mg/dl de glucosa.

Después de agruparlos, los primeros ratones se sobrealimentaron por sonda oralmente con 10 mg/kg de preparación del compuesto de ensayo y se puso en marcha un reloj. Cada animal subsiguiente se dosificó con un minuto y medio de separación. Tres horas después del comienzo del primer tratamiento con el compuesto, se tomó una muestra de sangre de la línea basal para medición de la glucosa (procedente del primer animal, mediante corte en la cola). A continuación, al animal se le administró inmediatamente una dosis oral de dextrosa al 50% (Hospira) a una proporción de 3 g/kg. Se tomaron muestras de sangre para determinación de glucosa, exactamente un minuto y medio de separación, mediante corte en la cola, de manera tal que la sangre se recolectó en cada animal a los 20, 40, 60 y 120 minutos después de la dosis de dextrosa.

Tabla 3: Efectos de la reducción de glucosa en el OGTT

Resultados del ensayo de tolerancia a la glucosa oral, media ± SE					
2 vías ANOVA /Bonferroni's **p<0,01, ***p<0,001 comparado con el vehículo					
	Vehículo	Ejemplo 1 (base libre) 0,3 mg/kg	Ejemplo 1 (base libre) 1 mg/kg	Ejemplo 1 (base libre) 3 mg/kg	Ejemplo 1 (base libre) 10 mg/kg
Glucosa (mg/dl)					
0 minutos	84 ± 8,4	78 ± 4,2	76 ± 3,3	72 ± 2,6	78 ± 5,4
20 minutos	268 ± 49,3	185 ± 13,7***	147 ± 8,3***	133 ± 7,1***	124 ± 1,2***
40 minutos	192 ± 26,8	197 ± 14,7	171 ± 11,1	150 ± 7,5	137 ± 5,4**
60 minutos	139 ± 6,2	164 ± 6,3	162 ± 5,8	155 ± 7,2	138 ± 6,1
120 minutos	105 ± 5,1	121 ± 11,8	109 ± 7,3	115 ± 10	114 ± 4,3
1 vía ANOVA /Dunnett's *p<0,05, **p<0,01 comparado con el vehículo					
Línea basal ajustada a AUCI	6408 ± 1500	5400 ± 519	4158 ± 374	3606 ± 421*	2693 ± 309**
Glucosa (mg/dl)					
Glucosa Cmax	268 ± 49,3	199 ± 14,1	174 ± 9,38**	161 ± 5,00**	141 ± 5,67**
Tiempo (minutos)					
Glucosa Cmax	20 ± 0	32 ± 5	48 ± 5	64 ± 13**	44 ± 7

Tal como se muestra en la Tabla 3 anterior, la base libre del Ejemplo 1 suministra una dosis que depende de la disminución en el curso de la glucosa después de un bolo oral de dextrosa al 50% (Hospira®) en el ratón C57B1/6 glucémico normal. Igualmente, la base libre del Ejemplo 1 demuestra una disminución que depende de la dosis en la línea basal ajustada al área de glucosa bajo la curva (AUC) durante un OGTT. Además, la base libre del Ejemplo 1 disminuye de manera que depende de la dosis, la concentración máxima promedio de glucosa en plasma (Cmax) durante el OGTT.

Valores de glucosa en un ensayo de tolerancia a alimento mezclado en ratas macho con diabetes inducida con estreptozotocina

Ratas a las que se habían administrado estreptozotocina (STZ) desarrollan diabetes mellitus. Los agentes que modulan los niveles de glucosa en estos animales se estiman que son útiles en el tratamiento de la diabetes en humanos.

El compuesto de ensayo se formuló mediante la adición de un vehículo de hidroxietilcelulosa al 1% (HEC), Tween® 80 w al 0,25%/ antiespuma al 0,05% al compuesto de ensayo previamente pesado, para formar una solución de 2,5 mg/ml. La mezcla se trató con una sonda de ultrasonidos durante aproximadamente 30 segundos. La solución resultante se usó como una solución madre, a partir de la cual se prepararon las soluciones de dosis de concentración más baja mediante dilución con el vehículo. El STZ, 45 mg/kg, se formuló disolviendo en tampón de citrato 0,1 M en partes alícuotas de 3 ml y se almacenó en la oscuridad sobre hielo, cuando no estaba siendo administrado. Se usó un alimento mezclado de alto contenido en grasa (Bio-Serv® Rodent Diet F3282 High Fat) que comprendía calorías de grasas (60%), calorías de carbohidratos (26%) y calorías de proteínas (15%). Las ratas Sprague Dawley alojadas por separado se dejaron aclimatar durante un periodo de 3 a 7 días.

En un esfuerzo para asegurar que los animales no habían recibido alimento recientemente, el STZ se administró por la tarde, aproximadamente seis horas dentro del ciclo de luz (luz encendida a 6 am, luz apagada a 6 pm). Los animales se anestesiaron con isoflurano y el STZ se suministró mediante inyección en vena de cola. Una vez que los animales recuperaron la conciencia, se les devolvió a su alojamiento y se les dejó recuperarse durante 7 días.

En los dos días inmediatamente antes del ensayo de tolerancia al alimento (MTT), a todas las ratas se las administró una pequeña cantidad (2-4 g) de la dieta F3282, con el fin de que se aclimataran a la misma, antes de recibirla durante el experimento. En la tarde anterior del experimento, las ratas se trasladaron a jaulas limpias y su alimento se retiró. A la mañana siguiente, los animales se pesaron y se tomó una muestra de sangre mediante corte en la cola

para medición de glucosa (glucómetros Abbott AlphaTRAK™, código 29). Los animales se agruparon n=6 en base al peso del cuerpo en ayunas y la glucosa. Treinta minutos después de administrar oralmente el compuesto de ensayo, se recogieron dos mediciones de glucosa. A continuación, se las administró un gránulo de cinco gramos de Bio-Serv® diet 3282. Después de 20 minutos se retiró el alimento que quedaba y se pesaron. Se tomaron muestras de sangre a los 20, 40, 60 y 120 minutos para medición de glucosa.

5

Tabla 4. Valores de glucosa en un MTT mezclado en ratas macho con diabetes inducida por STZ

Tratamiento	Dosis	Valores de glucosa (mg/dl) Grupos n=5-6, Media ± SE					
		0 min.	20 min.	40 min.	60 min.	129 min.	Línea basal ajustada a AUC
Vehículo		113,6 ± 12,6	297,2 ± 26,6	427,6 ± 41	452,2 ± 37,3	544,7 ± 50,1	36429 ± 3155
Ejemplo 1 (base libre)	10 mg/kg	139 ± 16,1	221,2 ± 26,3	268,7 ± 29*	330 ± 36,7	490,8 ± 39,2	22432 ± 2234*
Ejemplo 1 (base libre)	30 mg/kg	137,4 ± 26,9	195,4 ± 44,8	232 ± 52,2**	263,9 ± 62,2*	355,3 ± 73,2*	14649 ± 3673**
Acarbosa	60 mg/kg	124 ± 16,9	181 ± 22,88	301,3 ± 51,2	371,5 ± 63,9	433,7 ± 83	23877 ± 4649*

2 vías ANOVA /Bonferroni's *p<0,05, **p<0,01

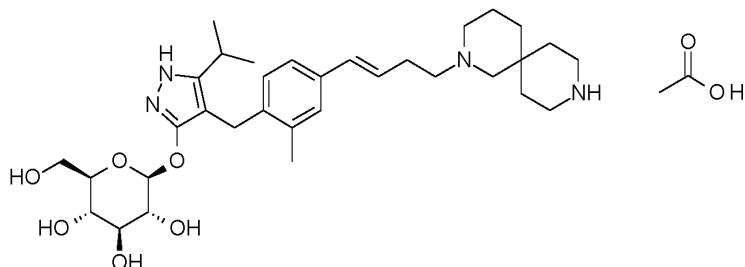
10

Tal como se muestra en la Tabla 4 anterior, la base libre del Ejemplo 1 disminuye de manera significativa y dependiente de la dosis la glucosa en el MTT en comparación con los controles del vehículo. La Acarbosa, que es un control positivo, no disminuye de manera significativa la glucosa en comparación con los controles en ningún punto de tiempo. Además, existe una disminución dependiente de la dosis en la línea basal ajustada a AUCs asociados con el tratamiento de la base libre del Ejemplo 1. La Acarbosa disminuye de manera significativa los AUCs de glucosa a niveles similares a los del Ejemplo 1 a 10 mg/kg. La Tabla 4 demuestra que la base libre del Ejemplo 1 modula los niveles de glucosa en la rata macho.

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



5 o hidrato del mismo.

2. Una forma cristalina del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 el cual está hidratado.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por** al menos uno de lo siguiente:

10 a. un diagrama de difracción de polvo por rayos X que usa radiación CuKa, que tiene un pico intenso en el ángulo de difracción 2-teta de 5,2°, en combinación con uno o más picos intensos seleccionados entre el grupo que consiste en 7,8°, 8,0° y 10,7° ($\pm 0,2^\circ$ respectivamente); y

b. un espectro ^{13}C -RMN de estado sólido que comprende picos intensos referenciados con respecto a la resonancia de alto campo de adamantano ($\delta = 29,5$ ppm) a: 181,8, 161,2, 160,0, 147,6 y 137,4 ppm ($\pm 0,2$ ppm respectivamente);

15 en el que el término pico intenso significa un pico que tiene una intensidad que es al menos 5% de la del pico el más intenso en el espectro o el diagrama de polvo adecuado.

4. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el contenido en agua a temperatura ambiente está dentro del intervalo de 9% a 12% en peso.

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en terapia.

20 6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de la diabetes.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la diabetes es diabetes de tipo 1.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la diabetes es diabetes de tipo 2.

9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes aceptables farmacéuticamente.