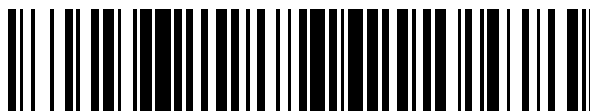


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 906**

51 Int. Cl.:

C07H 19/04 (2006.01)

C07H 17/02 (2006.01)

C07H 19/044 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2014** **PCT/US2014/060882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015** **WO15057953**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2014** **E 14796332 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018** **EP 3057971**

54 Título: **Compuestos de 1-(beta-d-glucopiranosil)-1h-indol**

30 Prioridad:

17.10.2013 US 201361891995 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.05.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FIELDS, TODD

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 711 906 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

Compuestos de 1-(beta-d-glucopiranosil)-1h-indol

Novedosos compuestos de urea.

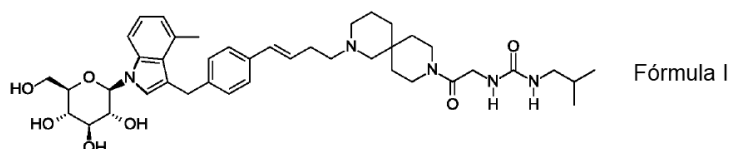
La presente invención se refiere a novedosos compuestos de urea, a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, a métodos para usar los compuestos para tratar trastornos fisiológicos, y a productos intermedios y procesos útiles en la síntesis de los compuestos.

La presente invención se encuentra en el campo del tratamiento de la diabetes y otras enfermedades y trastornos asociados con la hiperglucemia. La diabetes es un grupo de enfermedades que se caracteriza por altos niveles de glucosa en la sangre. Afecta a aproximadamente 25 millones de personas en los Estados Unidos y también es la séptima causa de muerte en los EE. UU. De acuerdo con la Hoja informativa nacional sobre la diabetes de 2011 2011 National Diabetes Fact Sheet (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention). Los cotransportadores de glucosa acoplados al sodio (SGLT) son uno de los transportadores conocidos como responsables de la absorción de carbohidratos, tal como la glucosa. Más específicamente, SGLT1 es responsable del transporte de glucosa a través de la membrana del borde en cepillo del intestino delgado. La inhibición de SGLT1 puede dar como resultado absorción reducida de glucosa en el intestino delgado, proporcionando así un enfoque útil para tratar la diabetes.

La Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2008/0139484 A1 divulga compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno de 1-(β-D-glicopiranosil)-3-sustituidos que tienen actividad inhibidora de SGLT1 y/o SGLT2 que se divulgan adicionalmente como útiles para la prevención o el tratamiento de enfermedad asociada a la hiperglucemia, tal como la diabetes. Además, la Patente U.S. No. 7.851.617 divulga derivados de indol que son inhibidores de SGLT y se divulgan adicionalmente como útiles para el tratamiento o prevención de diabetes y condiciones relacionadas.

Existe la necesidad de medicamentos alternativos y tratamiento para la diabetes. La presente invención proporciona ciertos novedosos inhibidores de SGLT1 que pueden ser adecuados para el tratamiento de la diabetes.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también proporciona un método para tratar la diabetes en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La presente invención proporciona además un método para tratar la diabetes tipo 1 en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Además, la presente invención proporciona un método para tratar la diabetes tipo 2 en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La presente invención también proporciona un método para tratar la tolerancia alterada a la glucosa (IGT), la glucosa alterada en ayunas (IFG) o el síndrome metabólico en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en terapia, en particular para el tratamiento de diabetes. Además, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1. Además, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el tratamiento de la diabetes tipo 2. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes. Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo 1. La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo 2. La invención también proporciona el uso de un compuesto de

Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de IGT, IFG o síndrome metabólico.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La presente invención también abarca novedosos intermedios y procesos para la síntesis del compuesto de Fórmula I.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "para tratar" incluyen restringir, hacer más lento, detener o revertir la progresión o gravedad de un síntoma o trastorno existente.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un mamífero, tal como un ratón, un cobayo, una rata, un perro o un humano. Se entiende que el paciente preferido es un humano.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o dosis del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que, después de la administración de una dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.

El especialista a cargo del diagnóstico, como experto en la técnica, puede determinar fácilmente una cantidad efectiva mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos bajo circunstancias análogas. Al determinar la cantidad efectiva para un paciente, el médico encargado del tratamiento considera varios factores, entre los que se incluyen, pero no se limitan a: la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado de o implicación o la gravedad 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.

Los compuestos de Fórmula I son generalmente efectivos en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente caen dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario perjudicial, y por lo tanto el intervalo de dosificación anterior no pretende limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Los compuestos de la invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas administradas por cualquier vía que hace que el compuesto sea biodisponible. Lo más preferiblemente, tales composiciones son para administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y procedimientos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition., Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

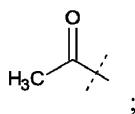
En un aspecto adicional de la invención, los presentes compuestos se administran en combinación con uno o más agentes terapéuticos, tales como agentes antidiabéticos. Administración en combinación incluye administración simultánea o secuencial. Además, la administración simultánea de la combinación puede ser como una dosis de combinación única o dosis separadas de cada agente terapéutico. Ejemplos de agentes antidiabéticos incluyen metformina; un inhibidor de la DPPIV, tal como sitagliptina o linagliptina; una sulfonilurea, tal como glimepirida; una tiazolidindiona, tal como pioglitazona; una insulina basal, tal como glargina; una insulina de acción rápida, tal como HUMALOG o NOVOLOG; Un agonista de GLP-1, tal como exenatida o liraglutida; un inhibidor de SGLT2, tal como dapagliflozina o empagliflozina; un antagonista del receptor de glucagón, tal como LY2409021; y similares.

Los compuestos de Fórmula I se preparan como se ilustra en las preparaciones, ejemplos y esquemas a continuación. Los reactivos y los materiales de partida están fácilmente disponibles para un experto en la técnica. Todos los sustituyentes, a menos que se especifique otra cosa, son como se definió previamente. Se entiende que estos esquemas, preparaciones y ejemplos no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la invención.

Ejemplos de resoluciones incluyen técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral. (Véase, por ejemplo, J. J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, and E.I. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Un experto en la técnica debe dejar en claro que la separación y el aislamiento, por cromatografía, cromatografía quiral o cristalización selectiva, de diastereómeros individuales o isómeros geométricos de Fórmula I o diastereómeros individuales o isómeros geométricos de intermedios que conducen a la Fórmula I, pueden presentarse en cualquier punto conveniente de la síntesis.

Como se usa en el presente documento, "δ" se refiere a parte por millón de campo descendente de tetrametilsilano; "min" se refiere a minutos o minutos; "hrs" se refiere a horas; "THF" se refiere a ácido tetrahidrofurano; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "MeOH" se refiere a metanol o alcohol metílico; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; "DPPA" se refiere a difenilfosforilazida; "HATU" se refiere a hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio; "CDI" se refiere a 1,1'-carbonildiimidazol; "DDQ" se refiere a 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona "Xphos" se refiere a 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenilo; "MTBE" se refiere a metil tert-butil

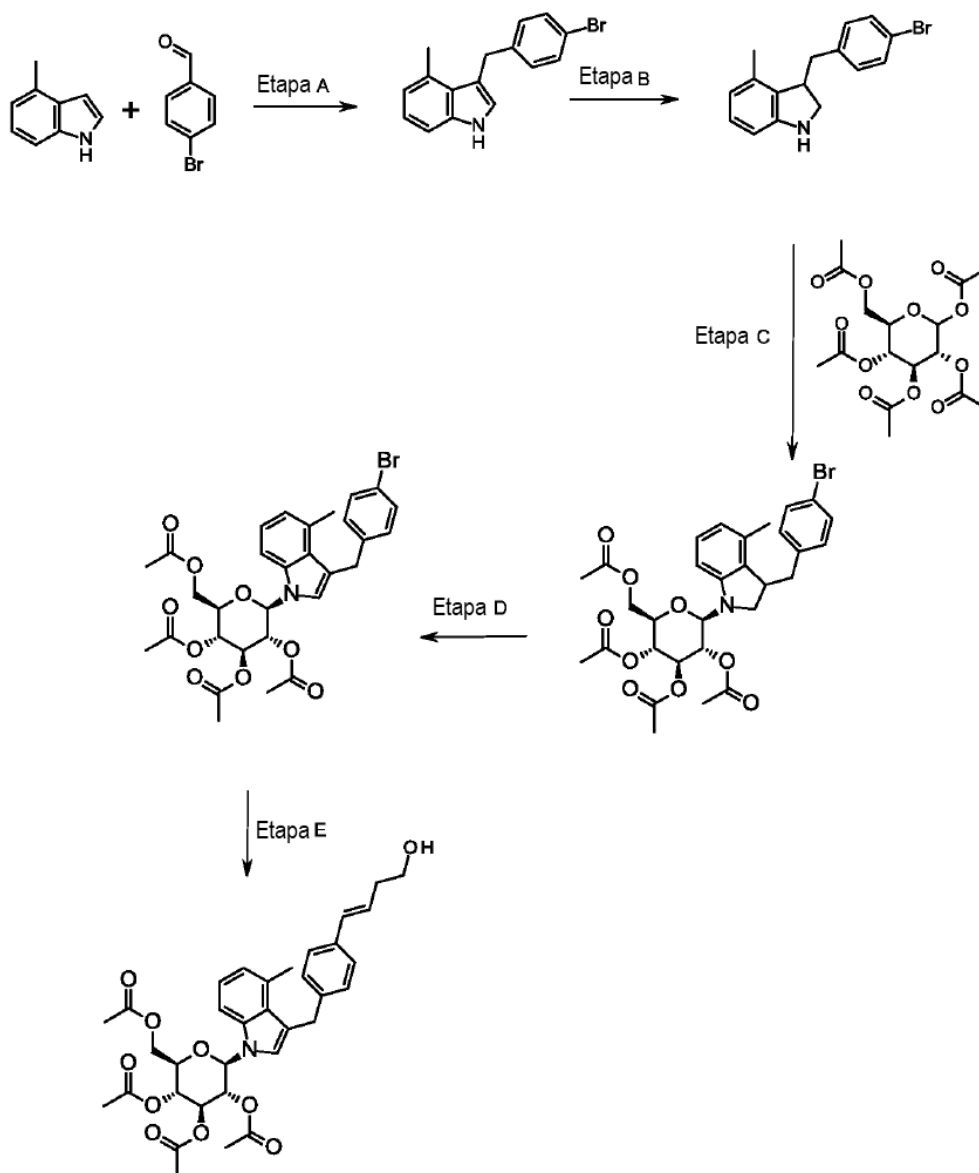
éter; "mins" se refiere a minutos; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; "Ac" se refiere a un sustituyente acetilo de la siguiente estructura:



y el término "BOC" se refiere a un grupo protector t-butiloxicarbonilo.

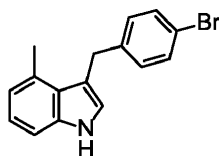
- 5 Las sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Gould, P.I., "Salt selection for basic drugs," International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); Bastin et al. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000); and S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977. Un experto en la técnica de la síntesis apreciará que los
- 10 compuestos de Fórmula I como aminas son bases orgánicas, y que se convierten y aíslan fácilmente como sales farmacéuticamente aceptables usando técnicas y condiciones bien conocidas por una persona de experiencia en la técnica.

Esquema I



Preparación 1

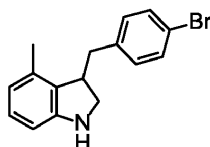
3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-1H-indol.



- Esquema I, Etapa A: Se agregan TFA (114,4 mmol) a una solución de 4-bromobenzaldehído (76,2 mmol), 4-metilindol (76,2 mmol) y trietilsilano (228,4 mmol) en diclorometano (10 ml) previamente enfriado en un baño de hielo. Se deja que la mezcla se caliente hasta temperatura ambiente y se agita durante 2 horas. Se añade trietilsilano adicional (228,4 mmol) y se calienta la mezcla hasta 30 °C durante la noche en un baño de aceite. Se diluye la reacción con agua (100 ml) y se extrae con diclorometano (2 x 100 ml). Se separa y lava la fase orgánica con agua (2 x 100 ml) y salmuera (100 ml). Se seca la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra bajo presión reducida. Se purifica el residuo mediante cromatografía instantánea sobre sílica gel (120 g de cartucho) eluyendo con acetato de etilo al 0-10 % en éter de petróleo para producir el compuesto del título (8 g, 26,6 mmol): MS (m/z): 301 (M+1)

Preparación 2

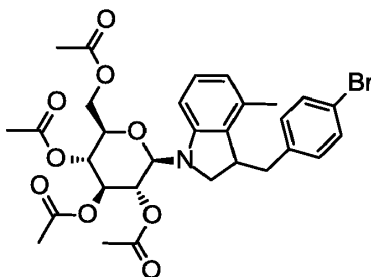
3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-indolina.



- Esquema I, Etapa B: Se agregan cianoborohidruro de sodio (13,3 mmol) a una solución de 3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-1H-indol (26,6 mmol) en ácido acético (20 ml) y se agita a temperatura ambiente durante la noche. Diluir la reacción con agua (200 ml) y se agregan bicarbonato de sodio hasta lograr un pH = 6. Extraer con acetato de etilo (3 x 100 ml) y se lavan los extractos orgánicos combinados con agua (2 x 100 ml) y salmuera (100 ml). Se secan los compuestos orgánicos sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran bajo presión reducida. Se purifica por cromatografía instantánea (120 g de cartucho de sílica gel) eluyendo con acetato de etilo al 0-15 % en éter de petróleo para producir el compuesto del título (2,2 g, 7,3 mmol): MS (m/z): 302 (M+1).

Preparación 3

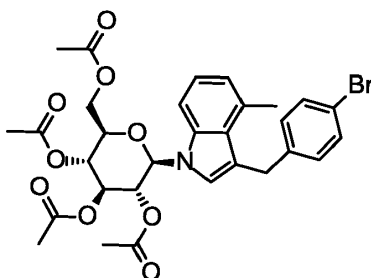
Acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-indolin-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo.



- Esquema I, Etapa C: Se agregan acetato de [(2R,4S,5R,6S)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidropiran-2-il]metilo (10,6 mmol) y 3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-indolina (10,6 mmol) a una solución de ácido acético (69,8 mmol) en metanol (80 ml). Se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se filtra la mezcla de reacción a través de una frita de vidrio y se lava la torta del filtro con metanol (2 x 10 ml). Se seca la torta del filtro bajo vacío para obtener el compuesto del título (2,3 g, 3,6 mmol): MS (m/z): 632 (M+H).

Preparación 4

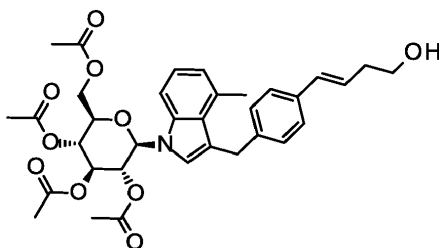
Acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo.



Esquema I, Etapa D: Se agregan óxido de manganeso (IV) (172,5 mmol) a una solución de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-indolin-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (5,85 mmol) en diclorometano (20 ml). Se agita a temperatura ambiente durante 48 horas. Se filtra la reacción a través de tierra de diatomeas y se concentra bajo presión reducida. Tratar el producto crudo con diclorometano/metanol (30 ml de 10:1) y se agita durante 15 minutos. Se filtra el precipitado resultante y enjuagar la torta del filtro con metanol (2 x 10 ml). Se seca la torta del filtro bajo vacío para producir el compuesto del título como un sólido incoloro (2,5 g 3,97 mmol): MS (m/z): 630 (M+H).

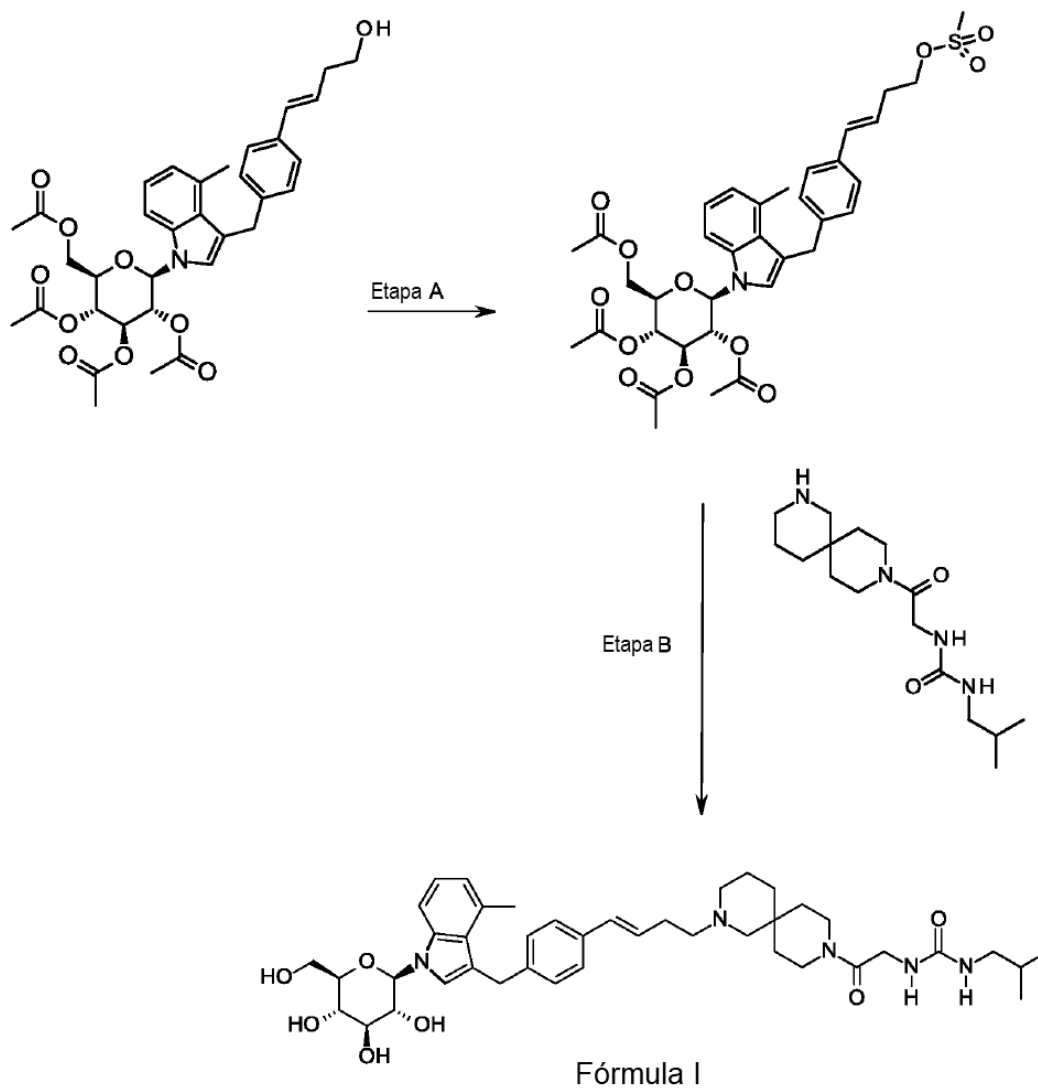
Preparación 5

10 Aceto de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[[4-[(E)-4-hidroxibut-1-enil]fenil]metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo.



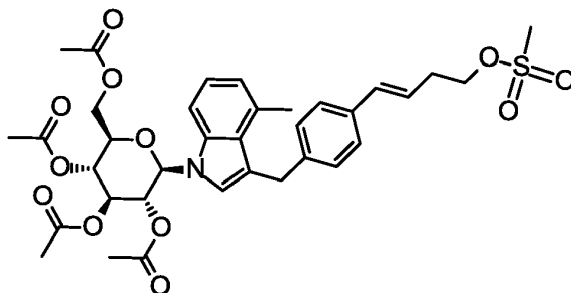
Esquema I, Etapa E: Se combina acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il] metilo (1,67 mmol), 3-buten-1-ol (5 mmol), trietilamina (35,8 mmol) y acetonitrilo (10 ml) y se purga con nitrógeno durante 10 minutos. A esta mezcla, se agrega acetato de paladio (0,17 mmol) y tri-*o*-toluilsulfina (0,33 mmol). Se calienta esta mezcla a 80 °C durante 2 horas, luego se enfria hasta temperatura ambiente. Se diluye con acetato de etilo (50 ml) y agua (50 ml). Se separa y lava la fase orgánica con salmuera (50 ml). Se secan los compuestos orgánicos sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran bajo presión reducida. Se purifica por cromatografía instantánea (40 g de cartucho de sílica gel) eluyendo con 5-80 % de acetato de etilo en diclorometano para producir el compuesto del título en forma de una espuma de color bronce (0,8 g, 1,2 mmol): MS (m/z): 622,0 (M+H).

Esquema II



Preparación 6

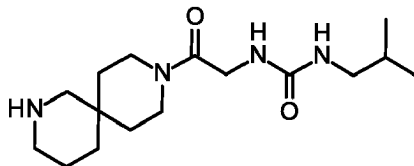
5 Acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[4-metil-3-[[4-[(E)-4-metilsulfoniloxibut-1-enil]fenil]metil]indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo.



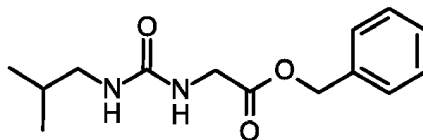
Esquema II, Etapa A: A una solución de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[[4-[(E)-4-hidroxibut-1-enil]fenil]metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (1,2 mmol) en diclorometano (50 ml) y trietilamina (3,6 mmol) a temperatura ambiente, se agrega cloruro de metanosulfonilo (1,56 mmol) gota a gota durante 5 minutos. Se agita a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se diluye la reacción con diclorometano (100 ml). Se lavan los extractos orgánicos con agua (2 x 100 ml) seguido de salmuera (100 ml). Se secan los compuestos orgánicos sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran bajo presión reducida para producir el compuesto del título en forma de una espuma de color amarillo claro (0,84 g, 1,2 mmol). Se usa este material en la siguiente etapa (Esquema II, etapa B) sin purificación adicional.

Preparación 7

1-[2-(4,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-il)-2-oxo-etil]-3-isobutil-urea.

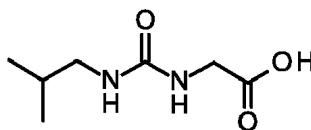


Preparación de 2-(isobutilcarbamoilamino) acetato de bencilo.



Se carga ácido 3-metilbutanoico (106,36 g), tolueno (800 ml) y trietilamina (126,46 g) en un matraz de 3 bocas (R1). Se calienta R1 hasta 90 °C. Se agrega una solución de DPPA (289,3g) en tolueno (400 ml) lentamente (Cuidado: N₂ liberado). Se agita R1 a 90 °C durante 30-60 minutos, luego se enfría hasta 20-30 °C. En un matraz separado (R2), se carga hidrócloruro de 2-aminoacetato de bencilo (200 g), trietilamina (150,54 g) y tolueno (1000 ml) y se agita a 20-30 °C durante 1-2 horas. Se agrega la mezcla R1 en R2 gota a gota lentamente a través de un embudo de adición a 20-30 °C y se agita durante 1-2 horas. Se agrega lentamente la mezcla de reacción al agua (2000 ml) con agitación vigorosa. Se separa la capa orgánica y se extrae la capa acuosa con EtOAc (2 x 1000 ml). Se combina las capas orgánicas y se lava con ácido clorhídrico 1 N (1000 ml), luego con 7 % de NaHCO₃ ac. (1000 ml), luego con agua (1000 ml), luego con 15 % de salmuera (1000 ml). Se concentra bajo presión reducida. Se suspende el residuo con heptano (1000 ml) y luego se filtra el sólido. Se seca la torta del filtro bajo presión reducida por debajo de 40 °C para dar acetato de 2-(isobutilcarbamoilamino)bencilo (218 g; ensayo del 98,1 %; rendimiento del 81,5 %).

Preparación de ácido 2-(isobutilcarbamoilamino)acético.



Se carga acetato de 2-(isobutilcarbamoilamino)acetato de bencilo (200 g; ensayo del 98,1 %), Pd/C seco (20 g; 10 % p/p) y alcohol isopropílico (2000 ml) en un autoclave. Se desgasifica bajo vacío y se purga con hidrógeno tres veces. Se agita a 60 °C bajo 50-60 psi de H₂ durante 4 horas. Se enfría la mezcla hasta 20-30 °C y se filtra a través de tierra de diatomeas y se concentra el filtrado bajo presión reducida a 45-50 °C a 1-2Vol. Se añade acetonitrilo (1000 ml) y se concentra bajo presión reducida a 45-50 °C a 2-3Vol. Se enfría la mezcla hasta 5-10 °C y se filtra. Se seca la torta bajo presión reducida a 45-50 °C para obtener ácido 2-(isobutilcarbamoilamino)acético (112 g; ensayo del 95,2 %; rendimiento del 82,5 %).

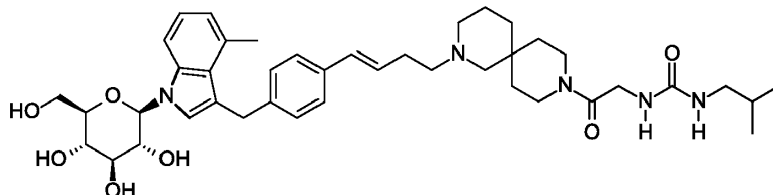
Preparación del compuesto del título final.

A un matraz de fondo redondo se agrega clorhidrato de 4,9-diazaespiro [5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo (1,38 mmol), ácido 2-(isobutilcarbamoilamino)acético (1,15 mmol), dimetilformamida (3,8 ml), trietilamina (1,72 mmol) y HATU (1.26 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 16 horas, luego se diluye con agua (50 ml) y acetato de etilo (50 ml). Se lava la fase orgánica con cloruro de amonio concentrado (50 ml) y salmuera (50 ml). Se secan los compuestos orgánicos sobre sulfato de sodio, se filtran y concentran bajo presión reducida. Se purifica el intermedio mediante cromatografía instantánea (40 g de cartucho de sílica gel) eluyendo con metanol al 0-10 % en acetato de etilo para obtener 9-[2-(isobutilcarbamoilamino)acetil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-4-carboxilato de tert-butilo (0,38 g, 0,93 mmol): MS (m/z): 411,2 (M+H).

A una solución de 9-[2-(isobutilcarbamoilamino)acetil]-4,9-diazaespiro [5.5]undecano-4-carboxilato de tert-butilo (0,38 g, 0,93 mmol) en 1,4-dioxano (1,75 ml), se agrega HCl 4 M en 1,4-dioxano (8,77 mmol). Se agita la reacción a temperatura ambiente durante 5 horas, luego se concentra bajo presión reducida. Se purifica el residuo disolviéndolo en metanol y cargando en una columna SCX (intercambio iónico). Se enjuaga la columna cargada con metanol (3 x 25 ml) y luego se enjuaga la columna con amoniaco 2N en metanol. Se combinan y concentran los lavados de amoniaco para obtener el compuesto del título final, 1-[2-(4,9-diazaespiro [5.5]undecan-9-il)-2-oxo-etil]-3-isobutil-urea (0,25g, 0,81 mmol): MS (m/z): 311,0 (M+H).

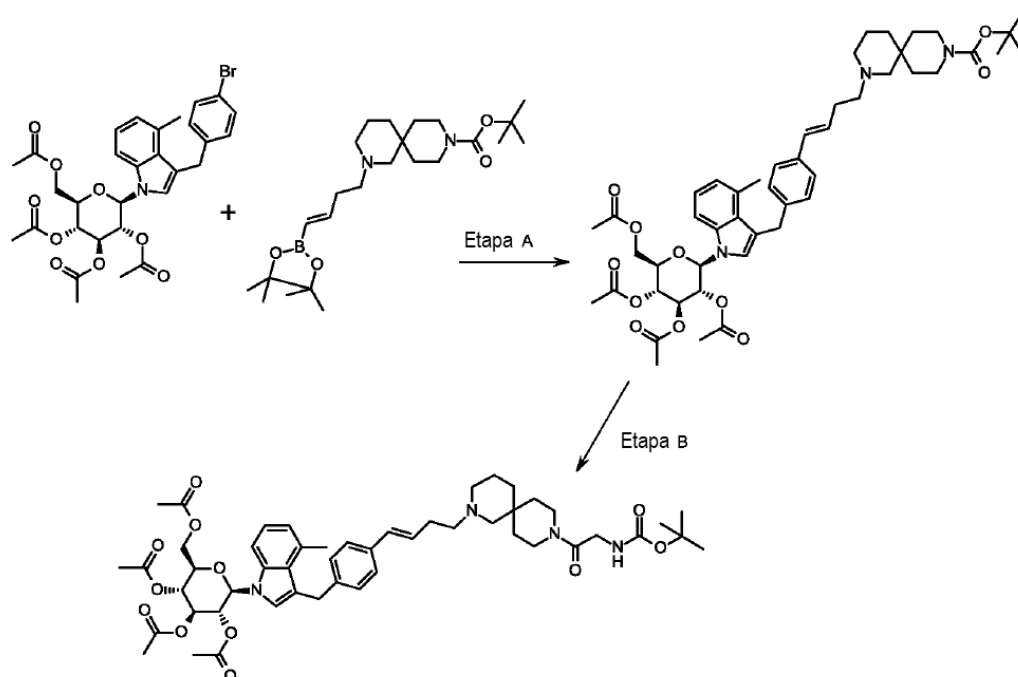
Ejemplo 1a

1-isobutil-3-[2-[4-[(E)-4-[4-metil-1-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]indol-3-il]metil]fenil]but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-il]-2-oxo-etil]urea.

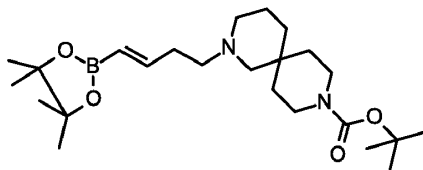


Esquema II, Etapa B: A una solución de 1-[2-(4,9-diazaespiro [5.5]undecan-9-il)-2-oxo-etil]-3-isobutil-urea (0,21 mmol) en acetonitrilo (2,5 ml), se agregan acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[4-metil-3-[[4-[(E)-4-metilsulfoniloxibut-1-enil]fenil]metil]indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (0,17 mmol) seguido de diisopropiletilamina (0,69 mmol). Se calienta la mezcla de reacción sellada a 80 °C durante 16 horas. Se concentra la reacción cruda bajo presión reducida, luego se disuelve el intermedio crudo en metanol (5 ml) y se agrega metóxido de sodio (0,53 mmol como una solución al 30 % en metanol). Se agita a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se inactiva la reacción agregando un pequeño trozo de hielo seco. Se concentra la reacción cruda bajo presión reducida. Se purifica por cromatografía instantánea (120 g de columna C18) eluyendo con 5 - 70 % de agua (0,1 % de ácido fórmico)/acetonitrilo (0,1 % de ácido fórmico). Se combina el producto que contiene fracciones y se concentra bajo presión reducida. Se disuelve el producto en agua (50 ml) y se neutraliza la solución acuosa con bicarbonato de sodio concentrado. Se decanta la fase acuosa y se disuelve el aceite restante en diclorometano/metanol (50 ml de 10: 1). Se secan los compuestos orgánicos sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran bajo presión reducida para producir el compuesto del título como una espuma blanquecina (0,08 g, 0,63 mmol): MS (m/z): 746,5 (M+1).

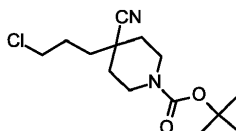
Esquema III



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 tert-butilo.



Preparación de 4-(3-cloropropil)-4-ciano-piperidin-1-carboxilato de tert-butilo.

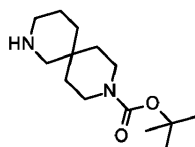


5

Se cargan 1780 g de THF y 86,6 g de diisopropilamina a R1. Se enfría la mezcla en R1 hasta -40 °C ~ -60 °C. Se agregan gota a gota 210,5 g de n-BuLi (1,6 eq) en R1 y se agita la mezcla durante 0,5~ 1 hora. Se cargan 890 g de THF y luego 100,0 g de 4-cianopiperidin-1-carboxilato de tert-butilo en R2. Se agrega la solución de 4-cianopiperidin-1-carboxilato de tert-butilo en R2 gota a gota a R1, controlando la temperatura a -40 °C ~ -60 °C. Se agita la mezcla en R1 durante 1~ 2 horas. Se cargan 890 g de THF y 130,5 g de 1-bromo-3-cloropropano en R2. Se agrega la solución de 1-bromo-3-cloro-propano en R2 gota a gota a R1, se controla la temperatura a -40~ -60 °C. Se agita la mezcla en R1 durante 3 horas a -40~ -60 °C, luego se calienta lentamente la mezcla hasta 20~25 °C y se agita durante 13~16 horas. Se enfría la mezcla a 0~5 °C. Se agregan gota a gota 525 g de NH₄Cl (solución acuosa saturada) y luego 500 g de agua en R1. Se concentra la mezcla hasta un peso total de 1000 ~ 1100 g por debajo de 40 °C y luego se agregan 380 g de MTBE. Se agita la mezcla a 10~20 °C durante 20-40 minutos y luego se deja reposar durante 30~60 minutos. Se separa la capa acuosa y se lava la capa orgánica con 2 x 500 g de H₂O. Se concentra la mezcla a 300 g de peso total por debajo de 50 °C. Se agrega 136 g de n-heptano y luego concentre la mezcla hasta 300 g de peso total por debajo de 50 °C. Se enfría la mezcla a 0~5 °C, luego se agregan gota a gota 340 g de n-heptano. Se agita la mezcla durante 5~10 horas, luego se filtra la suspensión. Se enjuaga el matraz con 68,0 g de n-heptano, luego se lava la torta para obtener 4-(3-cloropropil)-4-ciano-piperidin-1-carboxilato de tert-butilo (118 g, 87,2 % de Ensayo, 75,4 % de rendimiento): espectro de masas (m/z): 231 (M+H-tBu). Se transfiere la torta a un matraz y se agregan 610,0 g de tolueno. Se concentra la mezcla hasta 500 g de peso total por debajo de 50 °C. El producto se almacena como una solución de tolueno hasta que es requerida.

20

Preparación de 4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo.

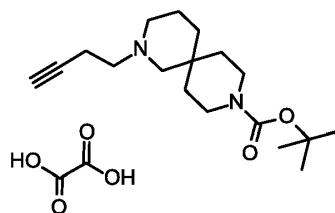


25

Se cargan 435 g de tolueno y luego 302,1 g de hidruro de sodio bis (2-metoxietoxi) aluminio a R1. Se enfría la mezcla hasta -5 °C~5 °C. Se cargan 652,5 g de tolueno y 50 g de 4-(3-cloropropil)-4-ciano-piperidin-1-carboxilato de tert-butilo en R2 y se agita la mezcla hasta que esté transparente. Se agrega la solución de 4-(3-cloropropil)-4-ciano-piperidin-1-carboxilato de tert-butilo en R2 gota a gota a R1, se controla la temperatura por debajo de 5 °C. Se agita la mezcla en R1 durante 0,5 horas a -5 °C ~5 °C, luego se calienta la mezcla hasta 15~20 °C y se agita durante 1~3 horas. Se cargan 25 g de carbonato de sodio en R2, luego se agregan 1500 g de agua y se enfría la mezcla hasta 0~10 °C. Se agrega la mezcla en R1 gota a gota a R2, controlando la temperatura por debajo de 10 °C. Se calienta la mezcla hasta 20~40 °C y se agita durante 10-20 minutos, luego se deja reposar durante 40-60 minutos. Se separa la capa acuosa y se lava la capa orgánica con 2 x 250 g de agua, luego 297,5 g de una solución acuosa de cloruro de sodio al 25 %. Se concentra la capa orgánica hasta 100 g de peso total por debajo de 50 °C y luego se agregan 273,0 g de acetonitrilo. Se concentra la capa orgánica hasta 250 g de peso total por debajo de 50 °C del compuesto del título, 4,9-diazaespiro [5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo, que se almacena como una solución: espectro de masas (m/z): 255 (M+H).

35

Preparación de 4-but-3-inil-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo; ácido oxálico.



Se cargan en orden, 23,7 g de CH_3CN , 10 g de tert-butil 4,9-diazaespiro [5.5]undecano-9-carboxilato, 9,2 g de K_2CO_3 y luego 8,4 g de 4-bromobut-1-ino a R1. Se calienta la mezcla hasta 65-70 °C y se agita la mezcla a 65-70 °C durante 12-18 horas. Se concentra la mezcla hasta un peso total de 30-40 g por debajo de 50 °C, luego se agregan 76 g de MTBE y 50 g de agua. Se agita la mezcla a 20-25 °C durante 30 minutos y luego se deja reposar hasta 30 minutos. Se separa la capa acuosa. Se prepara una solución de 1 g de KOH en 49 g de agua y se agrega esta a la capa orgánica a 20-25 °C. Se agita la mezcla a 20-25 °C durante 30 minutos y luego se deja reposar durante 20-30 minutos a 20-25 °C. Se separa la capa acuosa y se lava la fase orgánica con 50 g de agua. Se concentra la fase orgánica a 40-50 g de peso total por debajo de 50 °C en R1. Se prepara una solución de 7,4 g de dihidrato de ácido oxálico en 39,5 g de acetona, luego se agregan gota a gota la solución de ácido oxálico/acetona en R1 a 20-25 °C. Se agita la suspensión a 20-25 °C durante 2-3 horas y luego se filtra. Se lava la torta con 15,2 g de MTBE. Se suspende la torta en 89 g de THF y se agita la mezcla a 50 °C durante 6-8 horas. Se enfría la mezcla hasta 20-25 °C y se filtra. Se lava la torta con 17,8 g de THF. Nuevamente, se suspende la torta en 89 g de THF y se agita la mezcla a 50 °C durante 6-8 horas. Se enfría la mezcla hasta 20-25 °C y se filtra. Se lava la torta con 17,8 g de THF. Se seca la torta bajo vacío a 50-60 °C durante 16-18 horas para proporcionar el compuesto del título, 4-but-3-inil-4,9-diazaespiro [5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo; ácido oxálico.

Preparación del compuesto del título final.

Se cargan un recipiente de 20 l equipado con una válvula de salida inferior con 4-but-3-inil-4,9-diazaespiro [5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo; ácido oxálico (2,56 moles; 1,02 kg), hidróxido de potasio (solución acuosa al 10 % p/p; 7,69 moles; 4,31 kg) y MTBE (34,19 moles; 4,06 l; 3,01 kg). Se agita la mezcla hasta que se formen dos fases claras. Se retira la capa orgánica y se extrae la capa acuosa con MTBE (1,5 l). Se combinan las capas orgánicas y se lavan con agua (4 l), luego con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (4 l) y se concentran bajo presión reducida. Se añade tolueno (2 l) al residuo y se concentra bajo presión reducida. De nuevo, se agrega tolueno (2 l) al residuo y se concentra bajo presión reducida para obtener 8-but-3-inil-3,8-diazaespiro[5.5]undecano-3-carboxilato de tert-butilo (787 g; contiene aproximadamente 2 % p/p tolueno; rendimiento del 98 %).

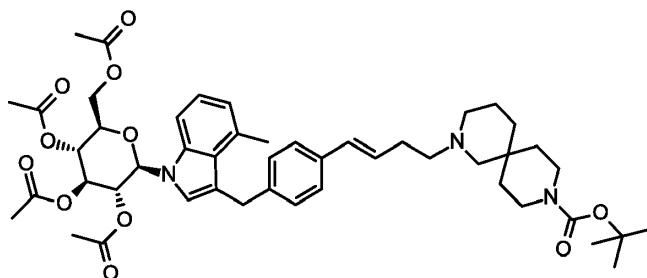
A una mezcla de 8-but-3-inil-3,8-diazaespiro [5.5]undecano-3-carboxilato de tert-butilo (2,41 moles; 750,86 g), cloruro de zirconoceno (240,73 mmole; 62,08 g), trietilamina (240,73 mmole; 33,55 ml; 24,36 g), y 2-metiltetrahidrofurano (738 ml), se agregan 4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (2,53 moles; 323,49 g). Se calienta la mezcla hasta 60 °C y se agita durante la noche. Se enfría la mezcla y se pasa a través de un tapón de sílica eluyendo con diclorometano. Se concentra el filtrado bajo presión reducida para obtener el compuesto del título final, 4-[(E)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo (1072 g, aproximadamente 94 % de pureza, 96 % de rendimiento).

Preparación alternativa del compuesto del título final.

Se añade clorhidrato de 4,9-diazaespiro [5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo (46,07 mmol) y carbonato de cesio (115,2 mmol) a una solución de acetonitrilo (200 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, se agregan 4-bromobutina (69,1 mmol) y se calienta la mezcla hasta reflujo con agitación durante la noche. Se enfría a temperatura ambiente y se diluye con acetato de etilo (200 ml). Se filtra la reacción a través de una frita de vidrio enjuagando con acetato de etilo (2 x 100 ml). Se concentra la mezcla cruda bajo presión reducida, luego se agregan acetato de etilo (200 ml) y se lavan los extractos orgánicos con agua (200 ml) y salmuera (200 ml). Se secan los compuestos orgánicos sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran bajo presión reducida para producir 4-but-3-inil-4,9-diazaespiro [5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo crudo (13,6 g, 44,4 mmol): MS (m/z): 307,2 (M+H). A un matraz de fondo redondo bajo nitrógeno, se agregan 4-but-3-inil-4,9-diazaespiro [5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo (44,4 mmol), trietilamina (4,44 mmol), cloruro de zirconoceno (4,44 mmol) y 4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (48,8 mmol). Se calienta esta mezcla hasta 60 °C durante 3 horas, luego se agita durante la noche a temperatura ambiente. Se disuelve la mezcla en diclorometano (20 ml) y se purifica por cromatografía instantánea (330 g de cartucho de sílica gel) eluyendo con acetato de etilo al 15 - 85 % en hexanos para producir el compuesto del título final, 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 tert-butilo (29,9 mmol) como aceite de color amarillo claro: MS (m/z): 435,2 (M+H).

Preparación 10

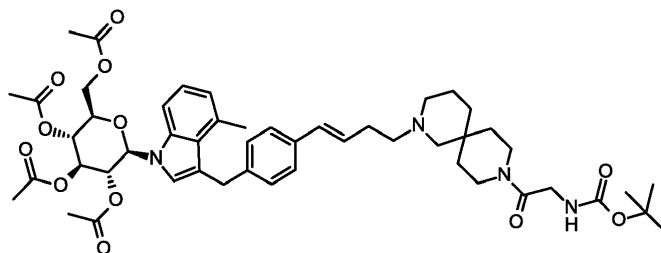
4-[(E)-4-[4-[4-metil-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]indol-3-il]metil]fenil]but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo.



Esquema III, Etapa A: Se añaden acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (27,8 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 tert-butilo (29,9 mmol) y carbonato de potasio (83,3 mmol) a una solución de THF (150 ml) y agua (20 ml). Se purga la solución con nitrógeno, luego se agregan acetato de paladio (1,1 mmol) y Xphos (1,1 mmol). Se calienta la mezcla hasta 65 °C durante 16 horas. Se enfría hasta temperatura ambiente y se diluye con acetato de etilo (200 ml) y agua (200 ml). Se separa y se lava la fase orgánica con agua (200 ml) y salmuera (200 ml). Se secan los compuestos orgánicos sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran bajo presión reducida. Se purifica el residuo mediante cromatografía instantánea (330 g de cartucho de sílica gel) eluyendo con acetato de etilo al 10 - 100 % en diclorometano para producir el compuesto del título (19,4 g, 22,6 mmol): MS (m/z): 858,0 (M+H).

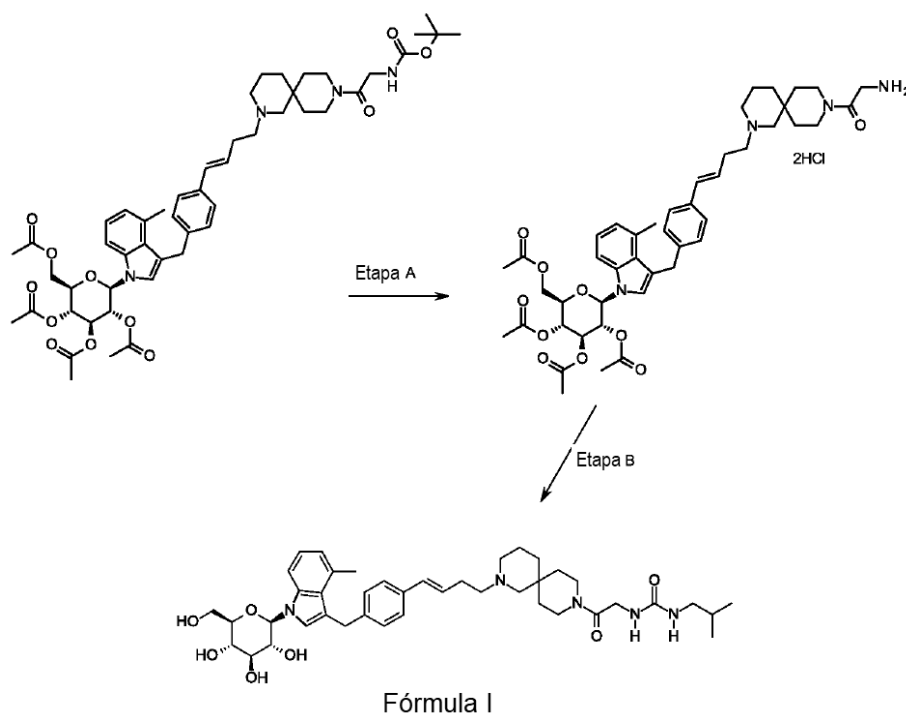
Preparación 11

Acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[[4-[(E)-4-[9-[2-(tert-butoxicarbonilamino)acetil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecan-4-il]but-1-enil]fenil]metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo.



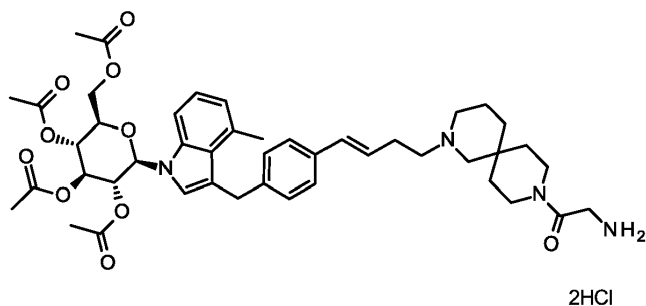
Esquema III, Etapa B: Se agregan HCl 4N en 1,4-dioxano (112,5 mmol) a una solución de 4-[(E)-4-[4-[4-metil-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]indol-3-il]metil]fenil]but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo (22,5 mmol) en diclorometano (200 ml) a temperatura ambiente. Se agita durante 3 horas, luego se concentra bajo presión reducida para producir clorhidrato de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[[4-[(E)-4-(4,9-diazaespiro[5.5]undecan-4-il]but-1-enil]fenil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (22,5 mmol): MS (m/z): 758,0 (M+H). Se añade trietilamina (112,5 mmol) a una solución de clorhidrato de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[[4-[(E)-4-(4,9-diazaespiro[5.5]undecan-4-il]but-1-enil]fenil]metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (22,5 mmol) en diclorometano (200 ml). En un matraz separado, se agregan CDI (28,1 mmol) en porciones a una solución de ácido 2-(tert-butoxicarbonilamino)acético (27 mmol) en diclorometano (50 ml). Después de agitar durante 45 minutos a temperatura ambiente, se agrega la solución a la solución de amina preparada previamente y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lava con una solución concentrada de bicarbonato de sodio (200 ml) y salmuera (200 ml). Se secan los compuestos orgánicos sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran bajo presión reducida para producir el compuesto del título crudo (21,6 g, 22,5 mmol): MS (m/z): 915,2 (M+H).

Esquema IV



Preparación 12

Clorhidrato de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[[4-[(E)-4-[9-(2-aminoacetil)-4,9-diazaespiro[5.5]undecan-4-il]but-1-enil]fenil]metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo.



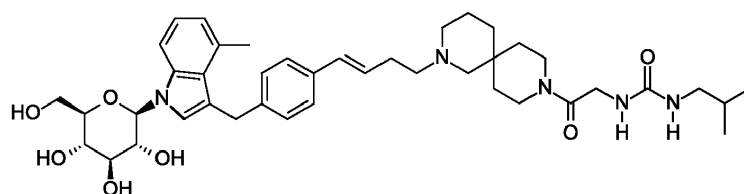
5

Esquema IV, Etapa A: Se agregan HCl 4N 1,4-dioxano (113,3 mmol) a una solución de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[[4-[(E)-4-[9-(2-tert-butoxicarbonilamino)acetil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecan-4-il]but-1-enil]fenil]metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (22,5 mmol) en diclorometano (200 ml). Se agita a temperatura ambiente durante 4,5 horas, luego se concentra bajo presión reducida para producir el compuesto del título crudo (22,6 g, 22,5 mmol) como un sólido color bronce: MS (m/z): 815,2 (M+H).

10

Ejemplo 1b

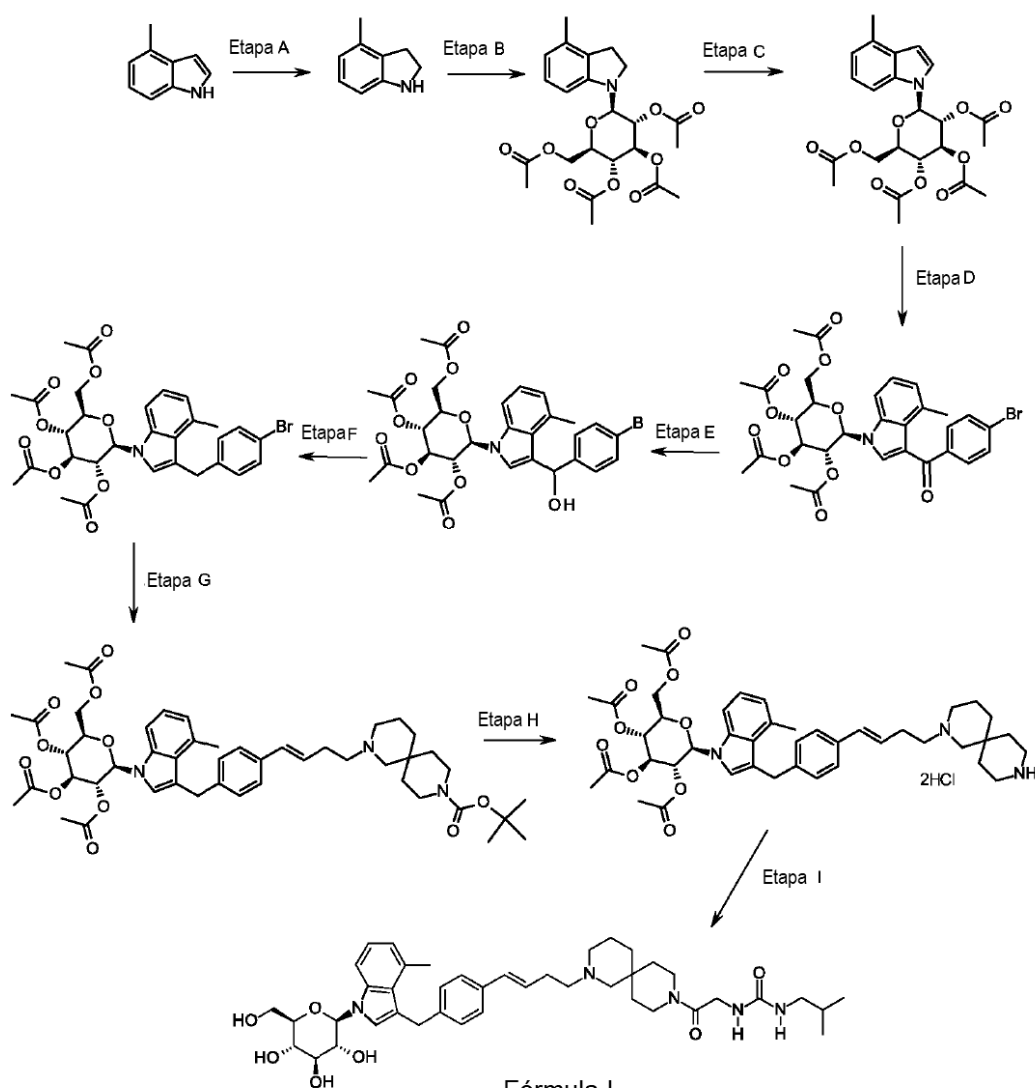
Síntesis alternativa de 1-isobutil-3-[2-[4-[(E)-4-[4-[4-metil-1-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]indol-3-il]metil]fenil]but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-il]-2-oxo-etil]urea.



Esquema IV, Etapa B: Se agregan isocianato de isobutilo (30,6 mmol) a una solución de clorhidrato de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[[4-[(E)-4-[9-(2-aminoacetil)-4,9-diazaespiro[5.5]undecan-4-il]but-1-enil]fenil]metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (22,5 mmol) y diisopropiletilamina (113,3 mmol) en diclorometano (300 ml) y se enfría hasta 0 °C. Se calienta hasta temperatura ambiente y se agita durante 2 horas.

Se diluye con agua (200 ml) y se separa la fase orgánica. Se lava la fase orgánica con salmuera (200 ml). Se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra bajo presión reducida. Se añade metanol (100 ml) y metóxido de sodio (11,3 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 16 horas, luego se inactiva agregando un pequeño trozo de hielo seco. Se concentra bajo presión reducida. Se purifica por cromatografía instantánea (400 g de cartucho C18) eluyendo con 5 - 80 % de acetonitrilo (0,1 % de ácido fórmico) en agua (0,1 % de ácido fórmico) en tres porciones. Se concentra bajo presión reducida para obtener el compuesto del título (13,4 g, 18 mmol) como una sal de ácido fórmico que contiene pequeñas impurezas. Se disuelve la sal (12 g) en agua (500 ml). Se neutraliza la solución con una solución concentrada de bicarbonato de sodio. Se recoge el precipitado resultante en una frita de vidrio y se enjuaga con agua (2 x 100 ml). Se purifica por cromatografía instantánea (330 g de cartucho de sílica gel) eluyendo con metanol al 15 % en diclorometano. Se concentran las fracciones del producto bajo presión reducida para producir el compuesto del título (8,8 g, 11,8 mmol): MS (m/z): 746,6 (M+H). H1 RMN (400,31 MHz, DMSO-d6): δ 7,29 (d, J=8,0 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,07 (s, 1H), 7,06 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,93 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 6,65 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,35 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 6,26 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 6,15 (dt, J = 16,0, 6,4 Hz, 1H), 5,88 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 5,29 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 5,09 (dd, J = 11,6, 6,0 Hz, 2H), 5,01 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 4,47 (t, 5,6 Hz, 1H), 4,13 (bs, 2H), 3,78 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 3,63 (m, 2H), 3,59 - 3,15 (m, 11H), 3,12 (d, 5,2 Hz, 1H), 2,76 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,35 (s, 3H), 2,34 - 2,08 (m, 9H), 1,61 - 1,17 (m, 10H), 0,78 (d, J = 6,8 Hz, 6H)

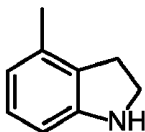
Esquema V



Fórmula I

Preparación 13

4-metilindolina



Método A

- 5 Esquema V, Etapa A: Se cargan 4-metil-1H-indol (500 g; 1,0 equiv; 3,811 moles) y ácido acético (2000 ml) a un matraz de 20 l a temperatura ambiente. Se enfría la solución hasta 0 °C (temperatura interna) y luego se agregan cianoborohidruro de sodio (359,2 g; 1,5 equiv; 5,71 moles) en 5 porciones iguales, mientras que no se permite que la mezcla de reacción se caliente por encima de 10 °C. Cuando se completa la adición, se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se enfría la mezcla de reacción hasta 0 °C y se agrega hielo (5 Kg). Se
- 10 agrega una solución de hidróxido de sodio (4 M) previamente enfriada (5 °C) muy lentamente para lograr un pH de mezcla de reacción de 14. Se extrae la mezcla de reacción con acetato de etilo (2X10L). Se combinan las capas orgánicas y se lavan con agua (1 X 10 l) y salmuera (1 X 10 l). Se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra bajo presión reducida para obtener el compuesto del título (460 g, 90 % de rendimiento): espectro de masas (m/z): 134 (M+1).

15 Método B

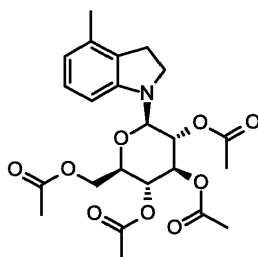
- Esquema V, Etapa A: Se cargan ácido trifluoroacético (7,62 moles; 576,42 ml) en un matraz de 3 ml de 2000 ml, equipado con termómetro, agitador magnético, línea de nitrógeno y embudo de goteo. Se coloca el matraz en un baño de hielo/agua y se enfría la mezcla hasta 13 °C (temperatura interna). Se agrega 4-metil-1H-indol (762,33 mmoles; 94,25 ml; 100,00 g) durante 3 minutos, sin permitir que la temperatura de la mezcla de reacción exceda los
- 20 25 °C. Se agita la mezcla durante aproximadamente 1 minuto después de que se complete la adición, permitiendo que la temperatura de la mezcla de reacción alcance los 20 °C, luego se retira el matraz del baño de hielo y se agita durante 10 minutos a 20 °C. Se agrega trietilsilano (876,68 mmoles; 140,47 ml; 101,94 g) gota a gota a la reacción durante 41 minutos, permitiendo que la temperatura suba hasta 25 °C, luego se mantiene la temperatura entre 25 °C y 30 °C usando un baño de agua fría según sea necesario. Cuando la adición esté completa, se agita la mezcla de
- 25 reacción durante 80 minutos. Se enfría la mezcla de reacción hasta 10 °C, luego se vierte en una mezcla de hielo (1000 g), ácido clorhídrico 5M (800 ml) y MTBE (2000 ml) con agitación. Tenga en cuenta que es importante inactivar en un sistema bifásico para evitar la formación de impurezas. Se separa la fase acuosa y se extraen los extractos orgánicos con ácido clorhídrico (400 ml; 2 M), luego ácido clorhídrico (2 x 200 ml; 2 M). Se combinan los extractos acuosos y se enfrían en agua helada. Se agrega 50 % p/p de NaOH para lograr un pH > 10 manteniendo la
- 30 temperatura por debajo de 30 °C. Se extrae la mezcla acuosa con MTBE (1000 ml, luego 200 ml). Se combinan los extractos orgánicos, se secan sobre sulfato de sodio anhidro, se filtran y se concentran bajo presión reducida para obtener el compuesto del título (73 g; 68 % de rendimiento): espectro de masas (m/z): 134 (M+1).

Método C

- Esquema V, Etapa A: se agrega una solución de 4-metil-1H-indol, (114,35 mmoles; 15,00 g) en tetrahidrofurano
- 35 (75,00 ml) a una solución de monohidrato de ácido p-toluensulfónico (137,22 mmoles; 23,63 g) en agua (75,00 ml) con agitación a temperatura ambiente. Se agrega un 5 % de platino sobre carbono (Johnson Matthey Type 103; 1,50 g) bajo una manta de dióxido de carbono. Se coloca la mezcla bajo una atmósfera de hidrógeno (4,2 bar) y se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se diluye la mezcla de reacción con hidróxido de sodio (solución acuosa 2 M; 148,65 mmoles; 74,33 ml) y se agita con MTBE (150,00 ml). Se filtra la mezcla a través de tierra de diatomeas y
- 40 se lava la almohadilla con MTBE (50 ml). Se separa el filtrado y se extrae el acuoso con MTBE (100 ml). Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtran y concentran bajo presión reducida para obtener el compuesto del título (14,80 g; 97,17 % de rendimiento): espectro de masas (m/z): 134 (M+1).

Preparación 14

- 45 Acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(4-metilindolin-1-il) tetrahidropiran-2-il]metilo.



Método A

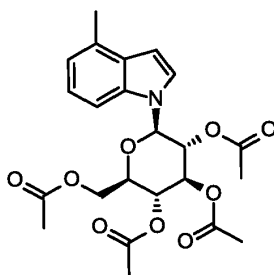
Esquema V, Etapa B: Se carga en un matraz de tres bocas de 20 litros una solución de 4-metilindolina (1000 g; 7,51 moles) en etanol:agua (8000 ml: 1000 ml) y D-glucosa (1480 g; 8,25 moles). Se calienta la mezcla durante 6 horas a 80 °C. Se concentra la mezcla bajo presión reducida y se disuelve el residuo en piridina: diclorometano (8000 ml: 8000 ml). Se añade dimetilaminopiridina (91,79 g; 0,75 moles) y se enfría la mezcla de reacción hasta 10 °C (temperatura interna). Se añade anhídrido acético (9000 ml) gota a gota. Cuando se complete la adición, se agita la mezcla de reacción durante 1 hora a 45 °C y luego se agita durante la noche a temperatura ambiente. Se concentra la mezcla bajo presión reducida. Se añade acetato de etilo (20 l) y agua (10 l) al residuo. Se separa la capa orgánica y se extrae la capa acuosa con acetato de etilo (2 X 10 l). Se combinan las capas orgánicas y se lavan con una solución saturada de ácido cítrico (5 Kg) en agua. Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra bajo presión reducida. Se cristaliza el residuo en etanol para dar el compuesto del título (3205,5 g; rendimiento del 92,11 %): espectro de masas (m/z): 464,2 (M+1).

Método B

Esquema V, Etapa B: D-glucosa húmeda (517,30 mmoles; 93,20 g) con agua (66 ml) y luego se agregan 4-metilindolina (65,62 g; 492,67 mmoles) en etanol (394 ml). Se purga la mezcla con nitrógeno y se calienta hasta reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. Luego se enfría hasta temperatura ambiente y se concentra bajo presión reducida. Al residuo resultante, se agregan diclorometano (394 ml), trietilamina (2,82 moles; 393,72 ml) y N,N-dimetil-4-piridinamina (24,63 mmoles; 3,01 g). Se enfría la mezcla en un baño de hielo y luego se agrega anhídrido de ácido acético (3,94 moles; 372,57 ml) gota a gota durante 30 minutos. Se concentra la mezcla bajo presión reducida, se diluye el residuo con acetato de etilo (984 ml) y se lava la mezcla con ácido cítrico (solución acuosa saturada; 50 ml) en agua (200 ml). Se separan las capas y se extrae la capa acuosa con acetato de etilo (600 ml y luego 300 ml). Se combinan los compuestos orgánicos, se lava con salmuera (600 ml) y se concentra bajo presión reducida. Se añade etanol (656 ml) y se mezcla a 50 °C durante 10 minutos. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente y luego en hielo/agua. Se filtra la mezcla resultante y se seca bajo presión reducida para obtener el compuesto del título (112,2 g; 49,14 % de rendimiento): espectro de masas (m/z): 464,2 (M+1).

Preparación 15

Acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(4-metilindol-1-il)tetrahidropiran-2-il]metilo.



Método A

Esquema V, Etapa C: Se carga acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(4-metilindolin-1-il) tetrahidropiran-2-il]metilo (4200 g; 9,08 moles) a un matraz de 20 l. Se añade 1,4 dioxano (42000 ml) y se enfría la solución hasta 10 °C. Se agrega DDQ (2057 g; 9,08 moles) en 5 porciones iguales manteniendo la temperatura a 10 °C. Después de completar la adición, se calienta la mezcla hasta temperatura ambiente y se agita durante 2 horas. Se filtra la mezcla de reacción y se lava el sólido con 1,4-dioxano (3 veces). Se concentra el filtrado bajo presión reducida y se purifica el residuo mediante cromatografía de columna eluyendo con acetato de etilo al 0 % -20 % en hexano. Se combinan fracciones puras con un lote separado de material preparado de manera similar a partir de 2500 g de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(4-metilindolin-1-il)tetrahidropiran-2-il]metilo y se concentra bajo presión reducida. Se disuelve el residuo en acetato de etilo (50 l) y se lava con una solución saturada de bicarbonato de sodio (2 x 20 l) y luego agua (1 x 10 l). Se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, se concentra bajo presión

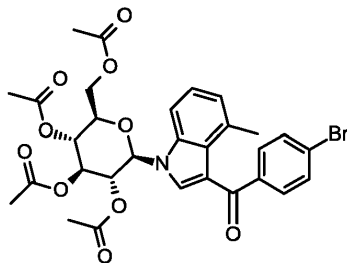
reducida y se cristaliza en etanol (10 l) para dar el compuesto del título (4,632 kg; rendimiento 69 %): espectro de masas (m/z): 462,5 (M+1).

Método B

- Esquema V, Etapa C: Se disuelve acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(4-metilindolin-1-il)tetrahidropiran-2-il]metilo (112,2 g ; 242,08 mmoles) en 1,4-dioxano (1,68 l) a temperatura ambiente. Se enfría la mezcla en un baño de hielo/agua, luego se agrega 4,5-dicloro-3,6-dioxo-ciclohexa-1,4-dieno-1,2-dicarbonitrilo (244,50 mmoles; 55,50 g) en porciones manteniendo la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 15 °C. Cuando la adición está completa, se agita la mezcla durante 5 minutos, luego se retira del baño de hielo y se agita durante 5 minutos adicionales. Se filtra la mezcla y se lava el sólido con 1,4-dioxano (561,00 mL). Se concentra el filtrado bajo presión reducida, luego se agrega etanol (561,00 mL) al residuo y se agita a 40 °C durante 20 minutos. Se enfría la mezcla en agua con hielo durante 15 min, se filtra y se lava el sólido obtenido con etanol frío (100 ml). Se seca el sólido bajo presión reducida para dar el compuesto del título (82,5 g; rendimiento del 73,9 %): espectro de masas (m/z): 462,0 (M+1).

Preparación 16

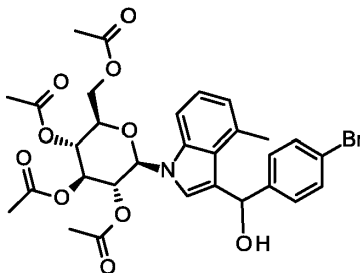
- Acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-(4-bromobenzoil)-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo.



- Esquema V, Etapa D: A un reactor agitado de 20 l, purgado con nitrógeno, se carga en orden: tricloruro de aluminio (4,42 moles; 589,45 g) y diclorometano (3,40 l). Se enfría la camisa del reactor hasta 0 °C, luego se deja que la mezcla de reacción se enfríe por debajo de 10 °C. Se añade cloruro de 4-bromobenzoil (1,77 moles; 388,07 g) manteniendo la temperatura por debajo de 10 °C. Se agrega lentamente una solución de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(4-metilindol-1-il) tetrahidropiran-2-il]metilo (1,47 moles; 680,00 g) en diclorometano (3,40 l) manteniendo la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 15 °C. Cuando se complete la adición, se calienta la camisa del reactor hasta temperatura ambiente. Después de 8 horas, se enfría la camisa del reactor hasta 4 °C y se agita la mezcla durante la noche. Se enfría la camisa hasta 0 °C y se bombea lentamente la mezcla en un segundo recipiente agitado que contiene agua helada (6,80 kg). Una vez completada la adición, se deja que las fases se separen. Se concentra la fase orgánica bajo presión reducida. Al residuo resultante, se agrega MTBE (7,48 l) y se lava con ácido clorhídrico (0,5 M; 5,10 l), luego con agua (7,48 l) y luego con bicarbonato de sodio (solución al 5 % p/p en agua; 3,40 l). Se filtra la capa orgánica a través de una capa de tierra de diatomeas (200 g), luego se concentra el filtrado bajo presión reducida. Se diluye el residuo con MTBE para obtener un volumen total de 4000 ml, luego se agrega esta solución con agitación rápida, a una tasa de 35 ml/min a iso-hexano frío (0 °C) (13,60 l). Cuando la adición está completa, se agita la mezcla durante 15 minutos, luego se filtra. Se deja que el producto se seque con aire aspirado a través de la torta del producto durante la noche. Se seca adicionalmente el sólido bajo presión reducida para dar el compuesto del título con una pureza del 63 % según lo juzgado por LCMS (898,4 g; 59,60 % de rendimiento): espectro de masas (m/z): 644,2/646,2 (M+1).

Preparación 17

Acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[(4-bromofenil)-hidroxi-metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo

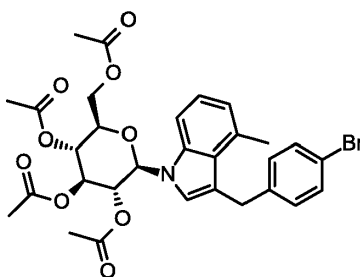


- Esquema V, Etapa E: En un reactor agitado de 20 l, purgado con nitrógeno, se carga tetrahidroborato de sodio (2,15 moles; 81,36 g), luego tetrahydrofurano (3,50 l). Se colca la camisa del reactor hasta 0 °C y, cuando la mezcla de

reacción está en 2 °C, se carga cloruro de cerio (III) heptahidratado (2,15 moles; 530 g). Se agrega lentamente una solución de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-(4-bromobenzoil)-4-metil-indol-1-il]tetrahidropirano-2-il]metilo (716,86 mmoles; 700,00 g) en tetrahidrofurano (3,01 l) no permitiendo que la temperatura de la mezcla de reacción exceda los 10 °C. Se agrega una mezcla de tetrahidrofurano (504,00 mL) y etanol (504,00 mL) lentamente, luego se agregan etanol (504,00 mL) lentamente con la temperatura de la mezcla de reacción que no exceda los 10 °C. (Nota: ambas adiciones de etanol deben hacerse lentamente y con cuidado, ya que puede verse una exotermia latente). Se agita la mezcla durante 10 minutos. En un recipiente separado, cargar ácido clorhídrico (2M; 7,00 l), agua (10,5 l) y hielo (10,5 kg), luego se bombea lentamente la mezcla de reacción en la mezcla fría de ácido clorhídrico. Se extrae la mezcla con acetato de etilo (5,07 l, luego 2,66 l) y se combinan los extractos orgánicos. Se lavan los extractos orgánicos combinados con bicarbonato de sodio (solución acuosa al 5 % p/v; 3,50 l), luego cloruro de sodio (solución acuosa al 10 % p/v; 3,50 l), se secan sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentran bajo presión reducida. Se disuelve el residuo resultante en MTBE (1,00 l) y se concentra bajo presión reducida para obtener el compuesto del título en forma de una mezcla de diastereómeros con suficiente pureza para usarlos sin purificación adicional en la siguiente etapa: espectro de masas (m/z): 628,2/630,2 (M+1-18).

Preparación 18

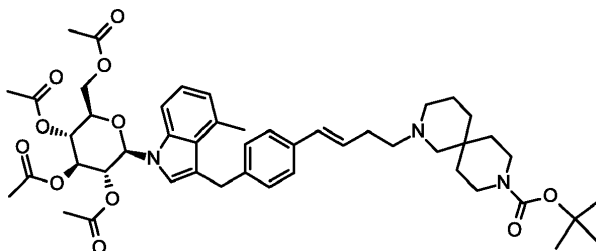
Acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo.



Esquema V, Etapa F: A un reactor de temperatura controlada de 20 l cargar acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[(4-bromofenil)-hidroxi-metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (1492,5 g; pureza del 65 %; 1,506 moles), luego acetonitrilo (4,87 l) y luego diclorometano (4,87 l). Se enfría la mezcla hasta 0 °C. Se añade trietilsilano (3,77 moles; 437,83 g) durante 5 minutos. Ajustar la camisa del reactor hasta -5 °C. Cuando la temperatura de la mezcla de reacción sea de -2 °C, se comienza la adición de eterato de trifluoruro de boro (3,77 moles; 534,4 g). Nota: al comienzo, esta adición da como resultado una exotermia significativa (la temperatura aumenta hasta 8 °C durante los primeros ~10 ml de adición). Una vez que el evento exotérmico inicial haya tenido lugar, se agrega el resto del eterato de trifluoruro de boro a una tasa para mantener la temperatura entre 5 °C y 7 °C. Cuando la adición está completa, se agita la mezcla de reacción a 5 °C durante 50 minutos. Se carga un matraz de vidrio de 50 l equipado con una válvula de salida inferior con hielo (6 kg) y luego agua (~15°C; 3,74 Kg). Se añade bicarbonato de sodio (11,16 moles; 937,55 g) y se agita la mezcla durante 5 minutos. Se bombea la mezcla de reacción en la mezcla de bicarbonato de sodio durante aproximadamente 5 minutos. Se observa un poco de efervescencia, pero no hay tendencia a formar espuma. Se añade acetato de etilo (17,04 l) y se agita la mezcla durante 10 minutos. Se detiene la agitación y se deja reposar la mezcla durante 30 minutos. Se separan las capas, se lava la fase orgánica con salmuera (4,87 l) y se concentra bajo presión reducida. Se divide la mezcla en dos porciones aproximadamente iguales y se purifica cada una a través de una almohadilla de sílica de 4,5 kg eluyendo con diclorometano. Se concentran las fracciones apropiadas para obtener el compuesto del título (990 g, aproximadamente 70 % de pureza (según lo determinado por RMN cuantitativa; 73 % de rendimiento de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-(4-bromobenzoil)-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo): espectro de masas (m/z): 630,2/632,2 (M+1).

Preparación 19

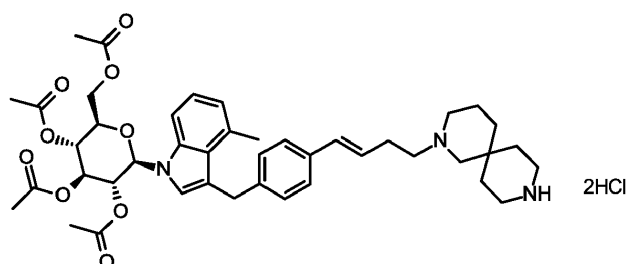
4-[(E)-4-[4-[4-metil-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]indol-3-il]metil]fenil]but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo.



Esquema V, Etapa G: A un reactor de temperatura controlada de 20 l cargar acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[(4-bromofenil)metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (1,37 moles; 1,18 kg; 73 % de pureza), 8-[(E)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)but-3-enil]-3,8-diazaespiro[5.5]undecano-3-carboxilato (1,79 moles; 776,46 g), carbonato de potasio (3,85 moles; 532,03 g), THF (11,80 l) y agua (1,18 l). Se desgasifica la mezcla por purga subsuperficial con nitrógeno durante 30 minutos y luego se agregan Pd(OAc)₂ (54,99 mmoles; 12,35 g) y XPhos (54,99 mmoles; 26,22 g). Se calienta la mezcla hasta 65 °C y se agita durante la noche. Se cargan XPhos (13,75 mmoles; 6,55 g) y Pd(OAc)₂ (13,75 mmoles; 3,09 g) adicionales y se continúa agitando a 65 °C durante aproximadamente 1 hora. Se prepara una solución de 8-[(E)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) but-3-enil]-3,8-diazaespiro [5.5]undecano-3-carboxilato de tert-butilo (343,71 mmoles; 149,32 g) en THF (500 ml) y se desgasifica mediante purga subsuperficial con nitrógeno durante 5 minutos. Se agrega esta solución a la mezcla de reacción principal y se continúa agitando a 65 °C durante aproximadamente 3 horas. Se enfría la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se bombea en un recipiente de 50 l equipado con una válvula de salida inferior. Se diluye la mezcla con isohexano (11,80 l) y se lava con salmuera (11,80 l). Se separan las capas y se filtra la fase orgánica a través de una almohadilla de sílica gel (2,95 kg). Se lava la almohadilla dos veces con una mezcla de THF (5,90 l) e iso-hexano (5,90 l). Se concentra el filtrado bajo presión reducida para obtener el compuesto del título (1,695 kg; pureza del 62 % según la RMN cuantitativa; rendimiento del 88 %), espectro de masas (m/z): 858,4 (M+1).

Preparación 20

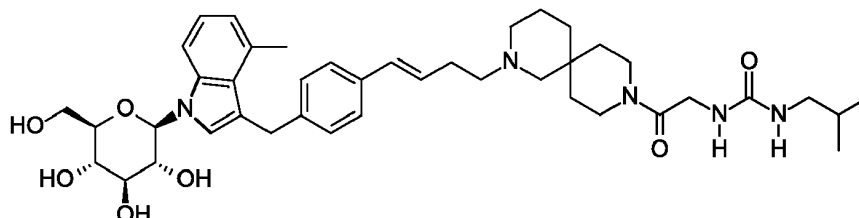
Dihidrocloruro de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[[4-[(E)-4-(4,9-diazoniaspiro[5.5]undecan-4-il)but-1-enil]fenil]metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo.



Esquema V, Etapa H: Se disuelve 4-[(E)-4-[4-[4-metil-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi -6-(acetoximetil) tetrahidropiran-2-il]indol-3-il]metil]fenil]but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecano-9-carboxilato de tert-butilo (1,22 moles; 1,68 kg) en diclorometano (8,36 l) y se agrega cloruro de hidrógeno (4M en dioxano; 8,52 moles; 2,13 l) manteniendo la reacción por debajo de 30 °C. Se agita la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se concentra la mezcla bajo presión reducida. Al residuo se agrega diclorometano (1,04 l) con agitación. Se agrega la solución resultante lentamente a MTBE (10,45 l) con agitación. Se recoge el sólido resultante por filtración y se lava la torta con MTBE (2 l). Se seca el sólido bajo presión reducida para dar el compuesto del título (1,49 kg, 66 % de pureza; 97,19 % de rendimiento): espectro de masas (m/z): 758,4 [M (base libre)+1].

Ejemplo 1c

Síntesis alternativa de 1-isobutil-3-[2-[4-[(E)-4-[4-[4-metil-1-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]indol-3-il]metil]fenil]but-3-enil]-4,9-diazaespiro [5 .5]undecan-9-il]-2-oxo-etil]urea.



Esquema V, Etapa I: a un reactor de 10 l con camisa ajustada a 25 °C, se agrega: dihidrocloruro de acetato de [(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-[3-[[4-[(E)-4-(4,9-diazoniaspiro[5.5]undecan-4-il)but-1-enil]fenil]metil]-4-metil-indol-1-il]tetrahidropiran-2-il]metilo (782,34 mmoles; 650,0 g), diclorometano (2,35 l) y luego trietilamina (3,91 moles; 545,22 ml). Se agita la mezcla durante 10 minutos. Se marca este reactor A. Se carga un matraz de 20 l separado con ácido 2-(isobutilcarbamoilamino)acético (899,69 mmoles; 183,30 g) y diclorometano (2,35 l), y luego se agrega 1,1'-carbonildiimidazol (938,80 mmoles) durante 1 minuto. Nota: Hay una cierta evolución del gas en la adición de CDI. Se agita la mezcla durante 5 minutos. Se marca este reactor B. Se bombea la mezcla en el reactor B al reactor

A a una tasa de ~3800 ml/min. Se agita la reacción a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. En un matraz limpio, se agregan ácido 2-(isobutylcarbamoylamino)acético (89,97 mmoles; 18,33 g) y diclorometano (234,7 ml) y luego 1,1'-carbonyldiimidazol (93,88 mmoles; 15,22 g). Se agita la mezcla durante 5 minutos y luego se agrega al reactor A. Se agita la mezcla durante aproximadamente 10 minutos. Se bombea la mezcla de reacción en agua (5,04 l) y se agita. Se detiene la agitación, se separa la fase orgánica y se concentra bajo presión reducida. Se disuelve el residuo en metanol (38,66 moles; 1,56 l; 1,24 kg) y se agrega metóxido de sodio (25 % p/p en MeOH; 1,56 moles; 352,21 ml) durante 10 minutos. Se agita la mezcla durante 30 minutos. Se concentra la mezcla de reacción bajo presión reducida. Se disuelve el residuo en metanol (250,00 ml) y se agrega diclorometano (1,50 l). Se agrega la solución a MTBE agitado rápidamente (10,00 l) durante 5 minutos. Se filtra la suspensión resultante y se seca al aire durante la noche. Se disuelve el sólido en MeOH al 20 % en diclorometano (5 l) y se pasa a través de una almohadilla de sílica de 6 kg eluyendo con MeOH al 15 % v/v en diclorometano. Se combinan las fracciones apropiadas y se concentran bajo presión reducida. Luego, se purifica el residuo por cromatografía instantánea (columna C18) eluyendo con acetonitrilo al 25 - 80 % en hidrogenocarbonato de amonio acuoso (10 mM) y luego se combinan las fracciones apropiadas para obtener el compuesto del título; $[\alpha]_D^{20} = -6,6^\circ$ (C = 0,976, metanol).

15 Ensayos de transportador 1 de glucosa dependiente de sodio (SGLT1)

El ADNc que codifica SGLT1 humano (*slc5a1*, NM 000343) y SGLT1 de ratón (*slc5a1*, NM 019810.4) se adquieren de Openbiosystems. El ADNc se clona en pcDNA3.1 + para la expresión en mamíferos y se transfecta de manera estable en células de ovario de hámster chino (CHO)-K1 utilizando procedimientos estándar de transfección en mamíferos. Se selecciona un subclon que expresa SGLT de cada línea celular que sobreexpresa con base en la resistencia a la neomicina (Geneticin, Invitrogen) y la actividad en el ensayo de captación de ^{14}C -a-metil-D-glucopiranosida (^{14}C -AMG) (véase más abajo). Las células estables que expresan SGLT se mantienen utilizando técnicas estándar de cultivo celular.

La actividad de SGLT se mide como la captación de ^{14}C -AMG dependiente de sodio en las líneas celulares anteriores que se describen a continuación. Se siembran cien ml de medio de cultivo que contiene 30.000 células en cada pocillo de una placa BioCoat poli-D-lisina de 96 pocillos (Becton Dickson) y se cultivan a 37 °C durante la noche. El medio de cultivo se aspira y las células se lavan dos veces con 200 ml de tampón de reacción (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , MgCl_2 y 14 mM ácido N-2-hidroetilpiperrazina-N'-2-etanosulfónico (Hepes), pH 7,5). El exceso de tampón se extrae sobre toallas de papel. Se añaden treinta y cinco ml de tampón de reacción a cada pocillo. Se dispensan cinco ml de un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) en tampón de reacción que contiene concentraciones variables de compuesto de prueba o ningún compuesto como control, en cada pocillo. La reacción se inicia al agregar 10 ml de ^{14}C -AMG en el tampón de reacción para obtener una concentración final de 4 mM. La placa se incuba a 37 °C durante 125 minutos. La reacción se termina aspirando el tampón de reacción y luego se lava tres veces con 200 ml de tampón de reacción enfriado con hielo. La aspiración manual se aplica para garantizar la eliminación completa del tampón de reacción. Se añaden diez ml de NaOH 0,1 N a cada pocillo y luego se agregan 100 ml de cóctel de centelleo Supermix (PerkinElmer). Después de mezclar, la señal de centelleo en la placa se cuenta en un MicroBeta (PerkinElmer). Se ajusta una curva de respuesta de diez dosis a un modelo empírico de cuatro parámetros utilizando ActivityBase (ID Business Solution) para determinar la concentración de inhibidor en la inhibición media máxima (IC_{50}).

El compuesto del Ejemplo 1 de este documento se prueba esencialmente como se describe anteriormente y muestra una IC_{50} para SGLT1 humano de $17,4 \pm 14,6$ nM (n = 9) y una IC_{50} para SGLT1 de ratón de $13,6 \pm 7,3$ nM (n = 6). Estos datos demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe SGLT1 humano y de ratón in vitro.

Efectos reductores de la glucosa en la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT)

El compuesto de prueba se formula agregando un vehículo de hidroxietilcelulosa al 1 %, Tween® 80 al 0,25 % p/antiespumante al 0,05 % al compuesto de prueba previamente pesado para obtener una solución de 1 mg/ml. La mezcla se somete a sonicación con sonda durante aproximadamente 1 minuto. Se agrega una barra de agitación, y la suspensión resultante se agita continuamente a lo largo de la dosificación.

Uno de los dos conjuntos de ratones C57B1/6 alojados en una única unidad se pesaron y los pesos corporales se utilizaron para determinar los grupos de estudio (n = 5), dentro de un intervalo de trabajo de 26-30 g. Después del agrupamiento, los ratones se alimentan por vía oral con 10 ml/kg de preparación de compuesto de prueba o vehículo, separados por treinta segundos. Estos ratones se utilizan para demostrar los efectos del compuesto en un OGTT, 18 horas después. Ambos conjuntos de ratones se ponen en ayunas durante la noche al eliminar el acceso a los alimentos, al final de la tarde, antes del día de la prueba. A la mañana siguiente, los ratones restantes, se pesan y se sangran (a través de un corte de cola) para la glucosa. Los grupos de estudio (n = 5) se determinan utilizando valores de glucosa en ayunas, dentro de un intervalo de trabajo de 80-100 mg/dl. Después del agrupamiento, los ratones son alimentados por vía oral utilizando el mismo protocolo que el día anterior.

A las ocho y a las dieciocho horas después de comenzar cada tratamiento con el compuesto respectivo, se toma una muestra de sangre de línea base para medir la glucosa (del primer animal). El animal recibe inmediatamente una dosis oral de dextrosa al 50 % (Hospira®) a 3 g/kg. Las muestras de sangre se toman para la glucosa,

exactamente treinta segundos de diferencia, por la vena de la cola, de tal manera que la sangre se recoge en cada animal a los 20, 40 y 60 minutos después de la dosis de dextrosa.

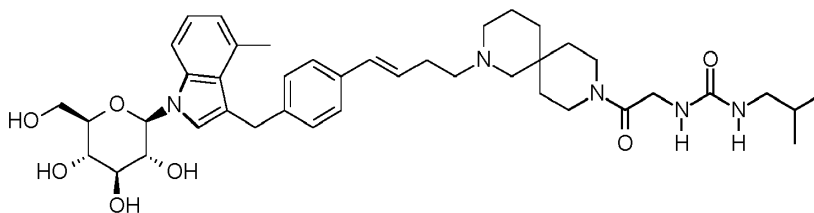
Tabla 1. Efectos reductores de la glucosa en OGTT.

Resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa oral Media $\pm$ SEM				
ANOVA / Dunnett de 1 vía en comparación con el vehículo *p<0,05, **p<0,01				
	Vehículo @ 8 horas después de la dosis	Ejemplo 1 10 mg/kg @ 8 horas después de la dosis	Vehículo @ 18 horas después de la dosis	Ejemplo 1 10 mg/kg @ 18 horas después de la dosis
Glucosa (mg/dl)				
0 Minutos	72,10 $\pm$ 5,47	70,2 $\pm$ 5,47	79,0 $\pm$ 1,17	87,7 $\pm$ 3,36
20 Minutos	327,9 $\pm$ 39,1	119,1 $\pm$ 11,4**	257,8 $\pm$ 19,1	116,1 $\pm$ 2,71**
40 Minutos	271,1 $\pm$ 47,7	127,7 $\pm$ 8,32**	202,8 $\pm$ 5,38	130,7 $\pm$ 4,47**
60 Minutos	176,5 $\pm$ 11,8	132,6 $\pm$ 8,85*	154,7 $\pm$ 5,32	124,1 $\pm$ 1,42**
AUC ajustada a la línea base	10140 $\pm$ 1662	2752 $\pm$ 507**	6809 $\pm$ 419	1792 $\pm$ 254**
Glucosa (mg/dl)				
Glucosa Cmax	334,7 $\pm$ 40,9	134,7 $\pm$ 8,31**	261 $\pm$ 16,3	132,7 $\pm$ 3,27**
Tiempo (minutos)				
Glucosa Tmax	24 $\pm$ 4	48 $\pm$ 8*	24 $\pm$ 4	48 $\pm$ 4.9

- 5 Como se muestra en la tabla 1, el compuesto del Ejemplo 1 proporciona una disminución en la excursión de la glucosa cuando se administra un bolo oral de dextrosa al 50 % (Hospira®) a un ratón glicémico normal C57B1/6 ocho o dieciocho horas después de la administración. El ejemplo 1 también demuestra una disminución en el área de glucosa ajustada en la línea base bajo la curva (AUC) durante ambas OGTT. Además, el Ejemplo 1 reduce la concentración máxima promedio de glucosa en plasma (Cmax) durante las OGTT mientras aumenta el tiempo promedio que tarda la glucosa en alcanzar la concentración máxima (Tmax).
- 10

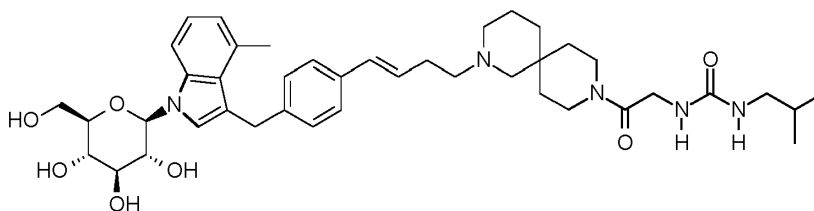
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es:



3. Un compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en terapia.

4. Un compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en el tratamiento de la diabetes.

10 5. Un compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1.

6. Un compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

15 7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.