

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

NUEVO INHIBIDOR DE SGLT1

2 Datos del Solicitante

Nombre:	ELI LILLY AND COMPANY	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com
Dirección:	Lilly Corporate Center Indianapolis, Indiana 46285	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - INDIANA - INDIANAPOLIS

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA	☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA	☐ NIT
☐ PASAPORTE	

Número: 4099650-

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1. ELI LILLY AND COMPANY	NN	4099650

4 Datos del Inventor

Nombre:	Susan Marie REUTZEL-EDENS	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com
----------------	---------------------------	-------------------------------	-------------------------

Dirección:		P.O. BOX 6288 Indianapolis, Indiana 46206-6288	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - INDIANA - INDIANAPOLIS
Identificación:				
☐ CEDULA DE CIUDADANIA		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA		
☐ EMPRESA EXTRANJERA		☐ NIT		
☐ PASAPORTE		☒ No Aplica		
Número:		-		
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Domicilio		
1.	REUTZEL-EDENS Susan Marie		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	P.O. BOX 6288 Indianapolis, Indiana 46206- 6288
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		CARLOS R. OLARTE GARCIA	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com
Dirección:		patents@olartemoure.com	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación:				

☒ CEDULA DE CIUDADANIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

79782747-

Presentación de Poder

Año de Radicación

Número de Radicación

8

Datos Solicitud: PCT / WO

Número Solicitud:

PCT/US2014/063161

Fecha Solicitud:

30/10/2014

Número Publicacion:

WO2015/069541

Fecha Publicacion:

14/05/2015

9

Declaraciones de prioridad

☒ SI ☐ NO

1. (33) País de origen
ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

Codigo del país
US

(31) No. Solicitud
61/901,488

(32) Fecha
08/11/2013

10

Reivindicaciones

Número reivindicaciones:

12

Pago Reivindicaciones:

No

11

Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

- ☐ Micro, pequeñas y medianas empresas
☐ Universidades públicas o privadas
☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12

Documentos Anexos

- ☒ Reivindicaciones
☒ Descripción
☐ Dibujos y/o Figuras
☒ Resumen
☐ Certificado Depósito Material Biológico
☐ Uso de Conocimiento tradicional

- ☐ Listado de secuencias
- ☐ Artes finales 12 x 12 cm
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Otros Anexos

NUEVO INHIBIDOR DE SGLT1

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un nuevo
5 inhibidor de SGLT1 el cual es una sal de acetato de un
compuesto de pirazol, a composiciones farmacéuticas que
comprenden el compuesto, a métodos para usar el compuesto
para tratar trastornos fisiológicos, y a intermediarios y
procesos útiles en la síntesis de del compuesto.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención está en el campo de
tratamiento de diabetes y otras enfermedades y trastornos
asociados con hiperglicemia. La diabetes es un grupo de
15 enfermedades que está caracterizado por altos niveles de
glucosa en sangre. Afecta aproximadamente a 25 millones de
personas en los Estados Unidos y es también la 7ma. causa
conducente de muerte en los Estados Unidos de conformidad con
la Hoja Informativa de Diabetes Nacional 2011 (Departamento
20 Estadounidense de Salud y Servicios Humanos, Centros para
Control y Prevención de Enfermedades). Los cotransportadores
de glucosa acoplados a sodio (SGLT) son uno de los
transportadores conocidos por ser responsables de la
absorción de carbohidratos, tales como glucosa. Más
25 específicamente, el SGLT1 es responsable del transporte de

glucosa a través de la membrana del borde en cepillo del
intestino delgado. La inhibición de SGLT1 puede resultar en
absorción reducida de glucosa en el intestino delgado, de
este modo proporcionando un procedimiento útil para tratar
5 diabetes.

La Patente Estadounidense No. 7,655,632 describe
ciertos derivados de pirazol con actividad inhibidora de
SGLT1 humano, los cuales son además descritos como útiles
para la prevención o tratamiento de una enfermedad asociada
10 con hiperglicemia, tal como diabetes. Además, el documento WO
2011/039338 describe ciertos derivados de pirazol con
actividad inhibidora de SGLT1/SGLT2 los cuales son además
descritos por ser útiles para el tratamiento de enfermedades
óseas, tales como osteoporosis.

15

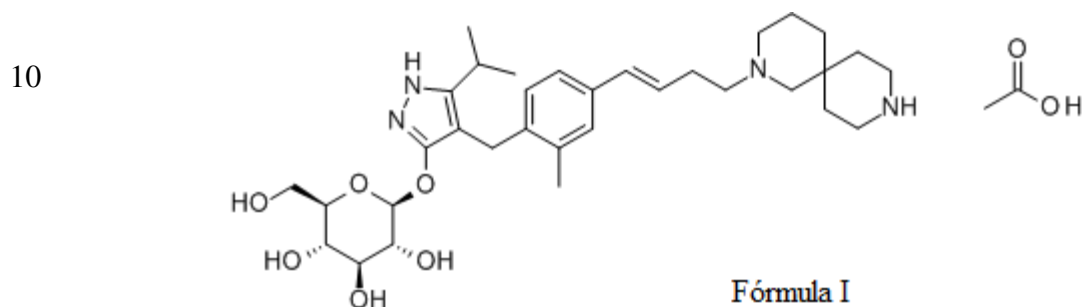
20

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

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



15 o hidrato del mismo.

La presente invención también proporciona una forma cristalina del compuesto de Fórmula I la cual es hidratada.

Además, la presente invención proporciona una forma cristalina de un compuesto de Fórmula I, la cual es
 20 hidratada, caracterizada por al menos uno de los siguientes:

a. un patrón de difracción en polvo de rayos-X usando radiación CuK α que tiene un pico intenso en un ángulo de difracción 2-theta de 5.2° en combinación con uno o más picos intensos seleccionados a partir del grupo que consiste
 25 de 7.8°, 8.0°, y 10.7° ($\pm$ 0.2° respectivamente); y

b. un espectro de NMR de estado sólido ^{13}C el cual comprende picos intensos referenciados con la resonancia de alto campo de adamantano ($\delta=29.5$ ppm) a: 181.8, 161.2, 160.0, 147.6 y 137.4 ppm (± 0.2 ppm respectivamente).

5 La presente invención además proporciona una forma cristalina de Fórmula I la cual es hidratada, en donde el contenido de agua a temperatura ambiental está en el intervalo de aproximadamente 9% hasta aproximadamente 12% en peso.

10 Además, la presente invención proporciona un método para tratar diabetes en un paciente que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo. La presente invención además proporciona un método para tratar

15 diabetes tipo 1 en un paciente que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo. Además, la presente invención proporciona un método para tratar diabetes tipo 2 en un paciente que comprende

20 administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo. La presente invención también proporciona un método para tratar tolerancia a la glucosa alterada (IGT), glucosa en ayunas alterada (IFG), síndrome metabólico en un paciente

25 que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal

tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo.

Además, esta invención proporciona un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para uso en terapia, en particular para el tratamiento de diabetes. Además, esta invención proporciona un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para uso en el tratamiento de diabetes tipo 1. Además, esta invención proporciona un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para uso en el tratamiento de diabetes tipo 2. La invención además proporciona un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para uso en el tratamiento de IGT, IFG, síndrome metabólico. Esta invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de diabetes. Además, esta invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de diabetes tipo 1. Esta invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de diabetes tipo 2. La invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de IGT, IFG, síndrome metabólico.

La invención además proporciona una composición

farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo con uno o más portadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una modalidad particular, la composición además comprende uno o más de
 5 otros agentes terapéuticos. Esta invención también abarca nuevos intermediarios y procesos para la síntesis del compuesto de Fórmula I o hidrato del mismo.

Además, la invención proporciona un proceso para preparar un inhibidor de SGLT1 cristalino, que comprende
 10 mezclar 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-ilo beta-D-glucopiranosido con acetato de etilo húmedo. La invención además proporciona un proceso para preparar un inhibidor de SGLT cristalino, que comprende mezclar 4-{4-
 15 [(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-ilo beta-D-glucopiranosido con acetato de etilo húmedo, y después recolectar el sólido resultante.

El aislamiento y purificación 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-ilo beta-D-glucopiranosido (base libre) el cual es un sólido amorfo, requiere el uso de cromatografía, la cual puede ser un recurso intensivo. El compuesto de Fórmula I permite el mejoramiento en aislamiento
 20 y purificación a través de la eliminación de cromatografía, y

proporciona una forma cristalina con propiedad de manejo y forma de estabilidad mejoradas para la formulación farmacéutica, en particular manufactura comercial y almacenamiento de composiciones farmacéuticas.

5 Como se usa en la presente, el término "pico intenso" significa un pico que tiene una intensidad que es al menos 5% aquella del pico más intenso en el espectro relevante o patrón en polvo.

 Como se usa en la presente, los términos "tratar" o
10 "trata" incluye restringir, disminuir, detener, o invertir el progreso o severidad de un síntoma o trastorno existente.

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

 Como se usa en la presente, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto de la invención el cual, después de la administración de dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado
20 en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.

 Una cantidad efectiva puede ser fácilmente determinada por el médico encargado, como un experto en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas y observando resultados obtenidos bajo circunstancias análogas.
25 Determinando la cantidad efectiva para un paciente, un número

de factores son considerados por el médico encargado, que incluyen, pero no se limitan a: las especies de mamíferos; si tamaño, edad, y salud general; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado de o involucramiento o la
5 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 dosificación seleccionado; el uso de medicación
10 concomitante; y otras circunstancias relevantes.

El compuesto de Fórmula I es en general efectivo sobre un amplio intervalo de dosificaciones. Por ejemplo, dosificaciones por día normalmente caen dentro del intervalo de aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 30 mg/kg de
15 peso corporal. En algunos casos los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras en otros casos todavía dosificaciones más grandes pueden ser empleadas sin causar algún efecto secundario nocivo, y por lo tanto el
20 intervalo de dosificación anterior no está propuesto para limitar el alcance de la invención en cualquier forma.

El compuesto de la invención es preferiblemente formulado como una composición farmacéutica administrada por cualquier ruta la cual hace al compuesto biodisponible. Muy
25 preferiblemente, tales composiciones son para administración

oral. Tales composiciones y procesos farmacéuticos para preparar los mismos son bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21ava. Edición., Lippincott, Williams & 5 Wilkins, 2006).

En un aspecto adicional de la invención, el compuesto de la presente invención puede ser administrado en combinación con uno o más agentes terapéuticos, tales como agentes antidiabéticos. La administración en combinación 10 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 DPPIV, tal como 15 sitagliptina o linagliptina; una sulfonilurea, tal como glimepirido; 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 exenátida o liraglutida; un inhibidor de SGLT2, tal como 20 dapagliflozina o empagliflozina; un antagonista del receptor de glucagón, tal como LY2409021; y similares.

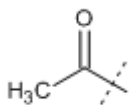
El compuesto de Fórmula I puede ser preparado como se ilustra en las preparaciones, ejemplos y esquemas de reacción expuestos abajo. Los reactivos y materiales de 25 partida son fácilmente disponibles para uno de habilidad

ordinaria en la técnica. Todos los sustituyentes, a menos que se especifique de otro modo, son como se definen previamente. Se entiende que estos esquemas de reacción, preparaciones, y ejemplos, no están propuestos para ser limitantes al alcance
5 de la invención en cualquier forma.

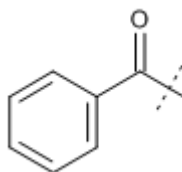
Ejemplos de resoluciones incluyen técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quirál. (Véase, por ejemplo, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel
10 and S.H. Wilen," Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Debe ser claro además para uno de habilidad ordinaria en la técnica que la separación y aislamiento, por cromatografía, cromatografía quirál o cristalización selectiva, de diastereómeros individuales o
15 isómeros geométricos puede ocurrir en cualquier punto conveniente en la síntesis.

Como se usa en la presente, " δ " se refiere a partes por millón de campo bajo a partir de tetrametilsilano; "min" se refiere a minuto o minutos; "THF" se refiere a
20 tetrahidrofurano; "MeOH" se refiere a metanol o alcohol metílico; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alta resolución;

El término "Ac" se refiere a un sustituyente acetilo de la siguiente estructura:



El término “Bz” se refiere a un sustituyente
5 benzoilo de la siguiente estructura:



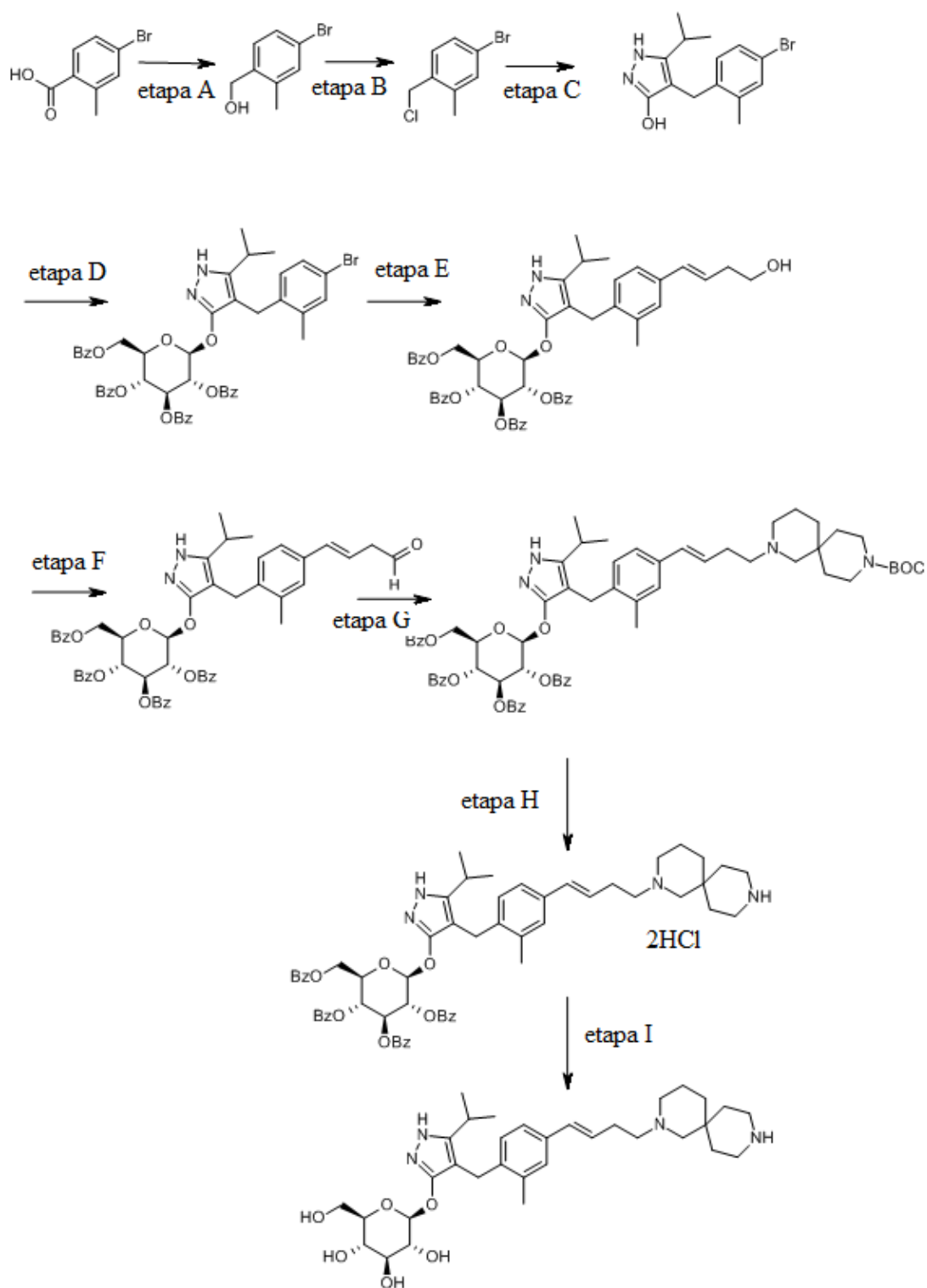
El término “BOC” se refiere a un grupo protector t-
10 butiloxicarbonilo.

15

20

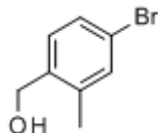
25

Esquema de reacción 1



Preparación 1

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



5 Esquema de reacción 1, etapa A: Se agregó complejo de borano-tetrahidrofurano (0.2 mol, 200 mL, 1.0 M de solución) a una solución de ácido 4-bromo-2-metilbenzoico (39 g, 0.18 mol) en tetrahidrofurano (200 mL). Después de 18 horas a temperatura ambiente, el solvente se removió bajo la

10 presión reducida para dar un sólido. Se purificó por cromatografía instantánea para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (32.9 g, 0.16 mol). ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.55 (s, 1H), 2.28 (s, 3H), 4.61 (s, 2H), 7.18–7.29 (m, 3H).

15

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

Complejo de borano-dimetilsulfuro (2M en THF; 116 mL, 0.232 mol) se agregó lentamente a una solución de ácido 4-bromo-2-metilbenzoico (24.3 g, 0.113 mol) en

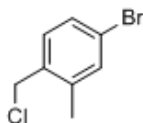
20 tetrahidrofurano anhidro (THF, 146 mL) a 3 °C. Después de la agitación en frío por 10 min el baño enfriante se removió y la reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la solución se enfrió a 5°C, y se agregó agua (100 mL) lentamente. Se agregó acetato de

25 etilo (100 mL) y las fases se separaron. La capa orgánica se

lavó con solución acuosa saturada de NaHCO_3 (200 mL) y se
 secó sobre Na_2SO_4 . La filtración y concentración bajo presión
 reducida proporcionó un residuo el cual se purificó por
 filtración a través de una almohadilla corta de sílice
 5 eluyendo con 15% de acetato de etilo/iso-hexano para dar el
 compuesto del título (20.7 g, 91.2% de rendimiento). MS
 (m/z): 183/185 ($M+1-18$).

Preparación 2

10 4-bromo-1-clorometil-2-metil-benceno



Esquema de reacción 1, etapa B: Se agregó cloruro
 de tionilo (14.31 mL, 0.2 mol,) a una solución de (4-bromo-2-
 15 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 se vertió la mezcla en agua
 helada (100 g), se extrajo con diclorometano (300 mL), el
 extracto se lavó con 5% de bicarbonato de sodio acuoso (30
 20 mL) y salmuera (200 mL), se secó sobre sulfato de sodio, y se
 concentró bajo presión reducida para dar el compuesto del
 título crudo como un sólido blanco (35.0 g, 0.16 mol). El
 material se usó para la siguiente etapa de reacción sin
 purificación adicional. ^1H NMR (CDCl_3): δ 2.38 (s, 3H), 4.52
 25 (s, 2H), 7.13–7.35 (m, 3H).

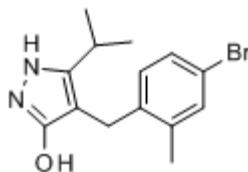
Síntesis alternativa de 4-bromo-1-clorometil-2-metil-benceno.

Cloruro de metansulfonilo (6.83 mL, 88.3 mmol) se agregó lentamente a una solución de (4-bromo-2-metil-fenil)metanol (16.14 g, 80.27 mmol) y trietilamina (16.78 mL; 5 120.4 mmol) en diclorometano (80.7 mL) se enfrió en hielo/agua. La mezcla se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se agitó por 16 horas. Además se agregó cloruro de metansulfonilo (1.24 mL; 16.1 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. Se agregó 10 agua (80mL) y las fases se separaron. La capa orgánica se lavó con ácido clorhídrico (1N; 80 mL) después con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (80 mL), después agua (80 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. La filtración y concentración bajo presión reducida proporcionó un residuo el 15 cual se purificó por cromatografía instantánea (eluyendo con hexano) para dar el compuesto del título (14.2 g; 80.5% de rendimiento). ¹H NMR (300.11 MHz, CDCl₃): δ 7.36–7.30 (m, 2H), 7.18 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 2.41 (s, 3H).

20

Preparación 3

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



25

Esquema de reacción 1, etapa C: Se agregó hidruro

de sodio (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 tetrahidrofurano a 0°C. Después de 30 min a temperatura ambiente, se agregó una solución de 4-bromo-1-
5 clorometil-2-metil-benceno (35.0 g, 0.16 mol) en tetrahidrofurano (50 mL). La mezcla resultante se calentó a 70 °C durante la noche (18 horas). Se agregó HCl 1.0 M (20 mL) para apagar la reacción. Se extrajo con acetato de etilo (200 mL), el extracto se lavó con agua (200 mL) y salmuera
10 (200 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se disolvió en tolueno (200 mL) y se agregó monohidrato de hidrazina (23.3 mL, 0.48 mol). La mezcla se calentó a 120 °C por 2 horas con un aparato Dean-Stark para remover el agua. Se enfrió y se
15 removió el solvente bajo la presión reducida, el residuo se disolvió con diclorometano (50 mL) y metanol (50 mL). Esta solución se vertió lentamente a un vaso de precipitado con agua (250 mL). El producto precipitado resultante se recolectó por filtración a vacío. Se secó *in vacuo* en un
20 horno durante la noche a 40 °C para proporcionar el compuesto del título como un sólido (48.0 g, 0.16 mol). MS (m/z): 311.0 (M+1), 309.0 (M-1).

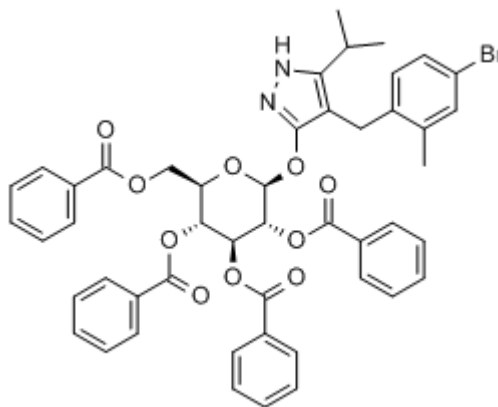
Síntesis alternativa de 4-[(4-bromo-2-metil-fenil)metil]-5-
25 isopropil-1H-pirazol-3-ol.

Se preparó una solución de 4-bromo-1-clorometil-2-metil-benceno (13.16 g, 59.95 mmoles) en acetonitrilo (65.8 mL). Se agregaron carbonato de potasio (24.86 g, 179.9 mmol), yoduro de potasio (11.94 g, 71.94 mmol) y 4-metil-3-oxovalerato de metilo (8.96 mL; 62.95 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 20 horas. Se agregó ácido clorhídrico (2N) para dar 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 se disolvió en tolueno (65.8 mL) y se agregó monohidrato de hidrazina (13.7 mL, 0.180 mol). La mezcla resultante se calentó a reflujo y se removió el agua usando un aparato Dean y Stark. Después de 3 horas la mezcla se enfrió a 90 °C y se agregó monohidrato de hidrazina adicional (13.7 mL; 0.180 mol) y la mezcla se calentó a reflujo por 1 hora. La mezcla se enfrió y concentró bajo presión reducida. El sólido resultante se trituroó con agua (200 mL), se filtró y secó en un horno a vacío sobre P₂O₅ a 60°C. El sólido se trituroó en iso-hexano (200 mL) y se filtró para dar el compuesto del título (14.3 g; 77.1% de rendimiento). MS (m/z): 309/311 (M+1).

Preparación 4

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

5



10

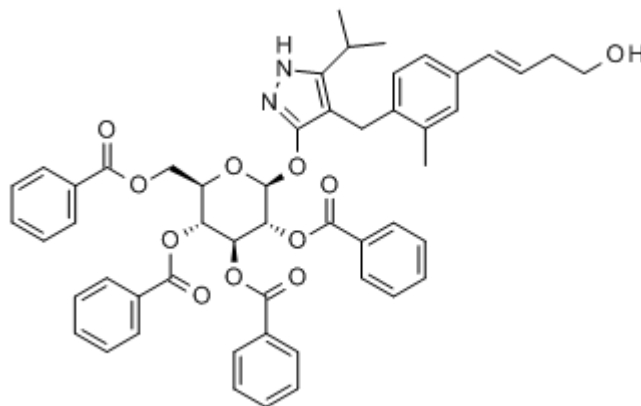
Esquema de reacción 1, etapa D: A un matraz de 1L , se agregó 4-[(4-bromo-2-metil-fenil)metil]-5-isopropil-1*H*-pirazol-3-ol (20 g, 64.7 mmol), tetrabenzoato de alfa-D-glucopiranosilo (50 g, 76 mmol), cloruro de benciltributilamonio (6 g, 19.4 mmol), diclorometano (500 mL), carbonato de potasio (44.7 g, 323 mmol) y agua (100 mL). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se extrajo con diclorometano (500mL). El extracto se lavó con agua (300 mL) y salmuera (500 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía instantánea para proporcionar el compuesto del título (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-ilo 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-beta-D-glucopiranosido

5



10

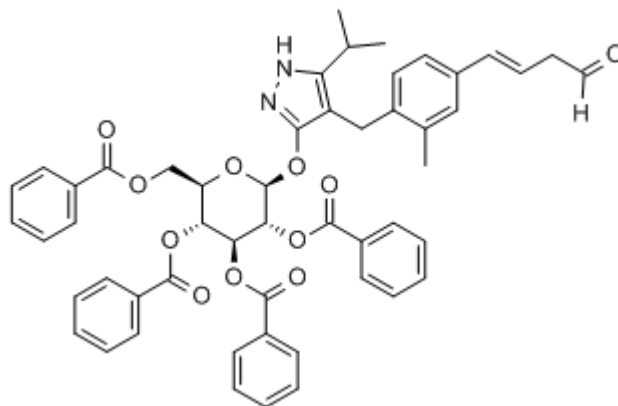
Esquema de reacción 1, etapa E: Se agregó 3-buten-1-ol (0.58 mL, 6.8 mmol) a una solución de 4-(4-bromo-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-ilo 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-beta-D-glucopiranosido (3 g, 3.4 mmol) en acetonitrilo (30 mL) y trietilamina (20 mL). La solución se desgasificó con nitrógeno durante 10 minutos. Se agregó tri-*o*-tolilfosfina (205 mg, 0.67 mmol) y acetato de paladio (76 mg, 0.34 mmol). Se sometió a reflujo a 90 °C por 2 horas. Se enfrió a temperatura ambiente y se concentró para remover el solvente bajo la presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía instantánea para proporcionar el compuesto del título (2.1 g, 2.4 mmol). MS (*m/z*): 878.4 (*M*+1).

25

Preparación 6

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

5



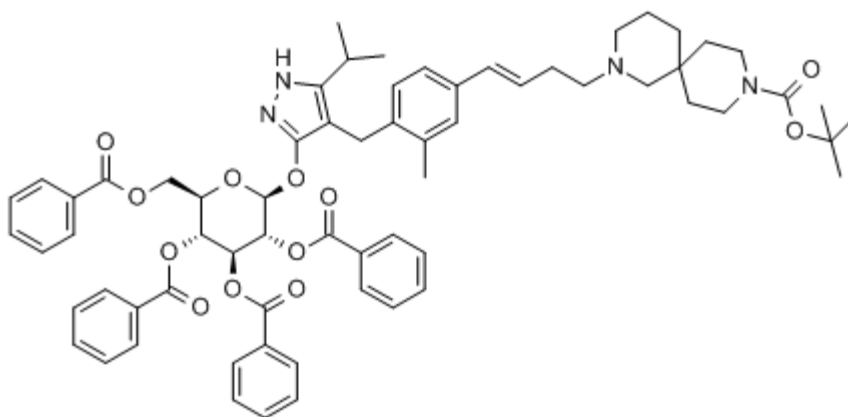
10

Esquema de reacción 1, etapa F: Se agregó 3,3,3-triacetoxi-3-yodoftaluro (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-ilo 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-beta-D-glucopiranosido (280 mg, 0.32 mmol) y bicarbonato de sodio (133.8 mg, 1.6 mmol) en diclorometano (20 mL) a 0 °C. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, la reacción se apagó con tiosulfato de sodio acuoso saturado (10 mL). Se extrajo con diclorometano (30 mL). El extracto se lavó con agua (30 mL) y salmuera (40 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía instantánea para proporcionar el compuesto del título (270 mg, 0.31 mmol). MS (*m/z*): 876.5 (*M*+1), 874.5 (*M*-1).

25

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]undecan-9-carboxilato de terc-butilo



Esquema de reacción 1, etapa G: Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (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-ilo 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-beta-D-glucopiranosido (270 mg, 0.31 mmol) y clorhidrato de 2,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-carboxilato de terc-butilo (179 mg, 0.62 mmol) en 1,2-dicloroetano (5 mL). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se apagó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (10 mL). Se extrajo con diclorometano (30 mL). El extracto se lavó con agua (30 mL) y salmuera (40 mL), la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía instantánea

para proporcionar el compuesto del título (275 mg, 0.25 mmol).

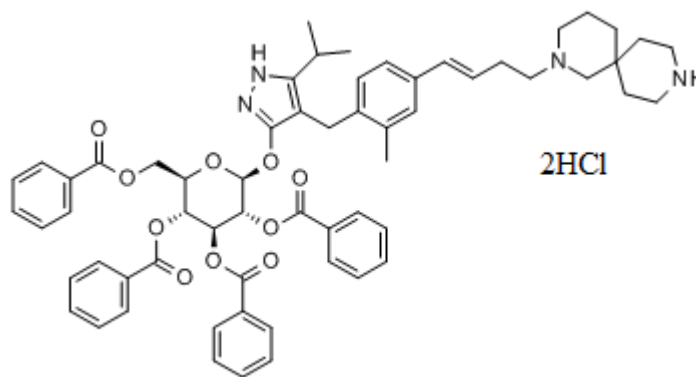
MS (m/z): 1115.6 (M+1).

5

Preparación 8

Diclorhidrato 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-ilo 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-beta-D-glucopiranosido

10



15

Esquema de reacción 1, etapa H: Se agregó cloruro de hidrógeno (4.0 M de solución en 1,4-dioxano, 0.6 mL, 2.4 mmol) a una solución de 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-

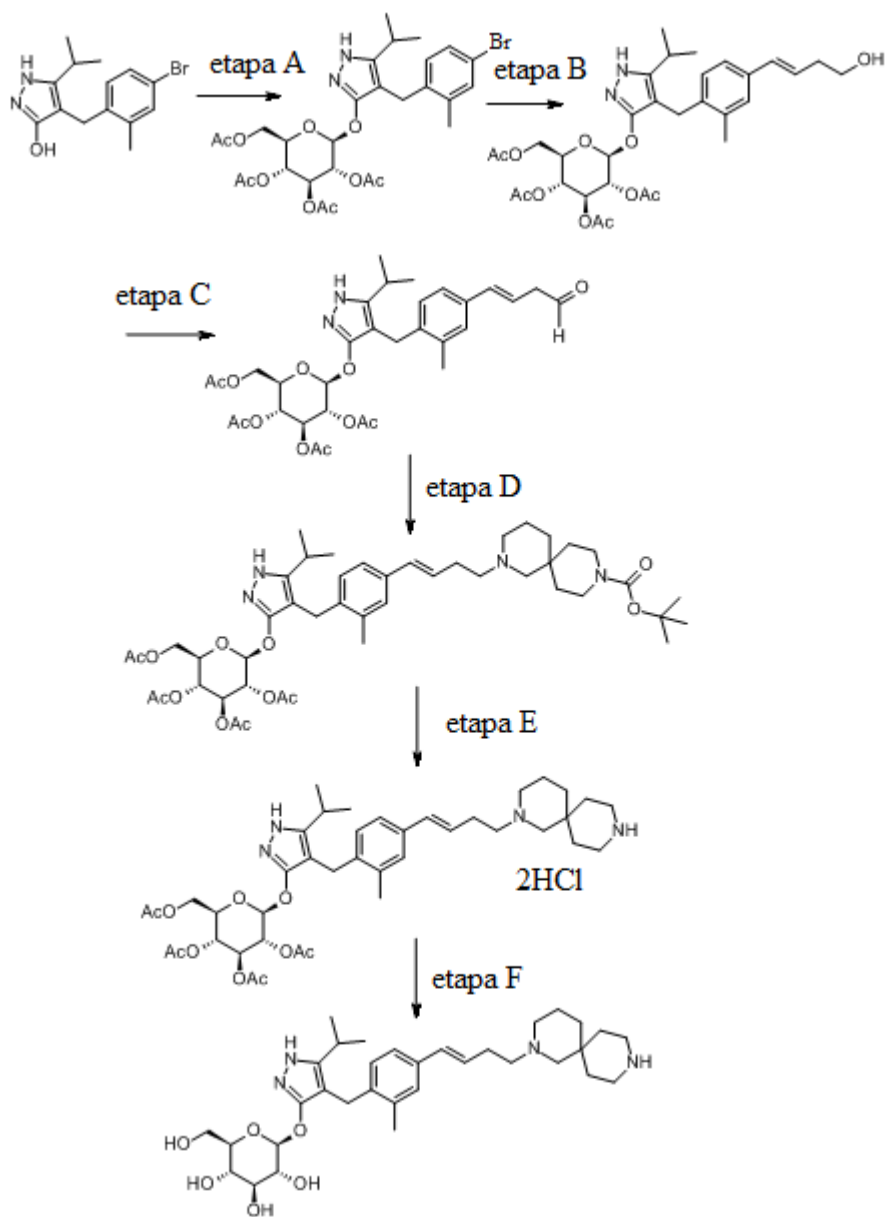
20

diazaespiro[5.5]undecan-9-carboxilato de terc-butilo (275 mg, 0.25 mmol) en diclorometano (5 mL). Después durante la noche (18 horas) a temperatura ambiente, se concentró para remover el solvente bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido (258 mg, 0.24 mmol). MS

25

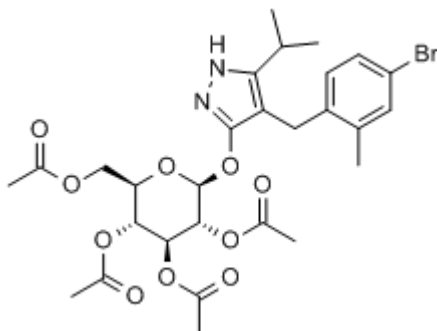
(m/z): 1015.6 (M+1).

Esquema de reacción 2



Preparación 9

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



5

Esquema de reacción 2, etapa A: A un matraz de 1L, se agregó 4-[(4-bromo-2-metil-fenil)metil]-5-isopropil-1H-pirazol-3-ol (24 g, 77.6 mmol), bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-alfa-D-glucopiranosilo (50.4 g, 116 mmol), cloruro de benciltributilamonio (5 g, 15.5 mmol), diclorometano (250 mL), carbonato de potasio (32 g, 323 mmol) y agua (120 mL). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se extrajo con diclorometano (450 mL). El extracto se lavó con agua (300 mL) y salmuera (500 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía instantánea para proporcionar el compuesto del título (36.5 g, 57 mmol). MS (m/z): 638.5 (M+1), 636.5 (M-1).

20

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

25

Los reactivos 4-[(4-bromo-2-metil-fenil)metil]-5-

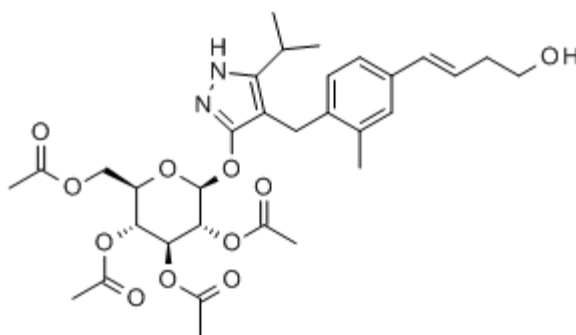
isopropil-1*H*-pirazol-3-ol (24.0 g, 77.6 mmol), bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-alfa-*D*-glucopiranosilo (50.4 g, 116 mmol), cloruro de benciltributilamonio (4.94 g, 15.52 mmol), carbonato de potasio (32.18 g, 232.9 mmol), diclorometano (250 mL) y agua (120 mL) se combinaron y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 18 horas. La mezcla se dividió 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 por cromatografía instantánea (eluyendo con 10% de acetato de etilo en diclorometano hasta 70% de acetato de etilo en diclorometano) para dar el compuesto del título (36.5 g, 74% de rendimiento). MS (*m/z*): 639/641 (*M*+1).

15

Preparación 10

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

20



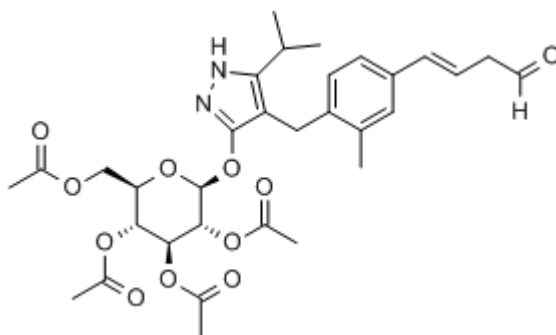
Esquema de reacción 2, etapa B: Se agregó 3-buten-1-ol (6.1 mL, 70 mmol) a una solución de 4-(4-bromo-2-

metilbencil)-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-ilo 2,3,4,6-tetra-
 O-acetil-beta-D-glucopiranosido (15 g, 23.5 mmol) en
 acetonitrilo (200 mL) y trietilamina (50 mL). La solución se
 desgasificó con nitrógeno durante 10 minutos. Se agregó tri-
 5 o-tolilfosfina (1.43 g, 4.7 mmol) y acetato de paladio (526
 mg, 2.35 mmol). Después de reflujo a 90 °C por 2 horas, se
 enfrió, y se concentró para remover el solvente bajo la
 presión reducida. El residuo resultante se purificó por
 cromatografía instantánea para proporcionar el compuesto del
 10 título (7.5 g, 11.9 mmol). MS (m/z): 631.2 (M+1), 629.2 (M-
 1).

Preparación 11

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

20



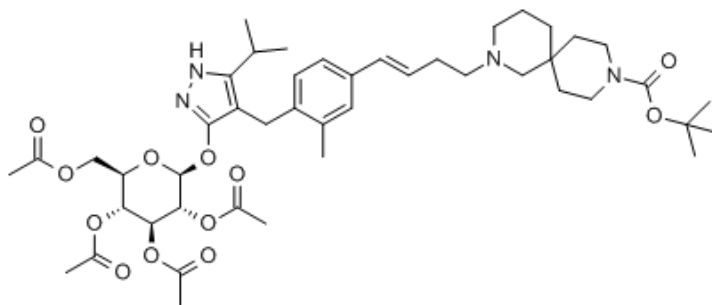
Esquema de reacción 2, etapa C: Se agregó 3,3,3-
 triacetoxi-3-yodoftaluro (2.1g, 4.76 mmol) a una solución de
 4-{4-[(1E)-4-hidroxibut-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-
 25 2-il)-1H-pirazol-3-ilo 2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-

glucopiranósido (1.5 g, 2.38 mmol) y bicarbonato de sodio (2 g, 23.8 mmol) en diclorometano (50 mL) a 0 °C. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, la reacción se apagó con tiosulfato de sodio acuoso saturado (10 mL). Se extrajo con
 5 diclorometano (30 mL), el extracto se lavó con agua (30 mL) y salmuera (40 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía instantánea para proporcionar el compuesto del título (0.95 g, 1.51
 10 mmol). MS (m/z): 628.8 (M+1), 626.8 (M-1).

Preparación 12a

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

20



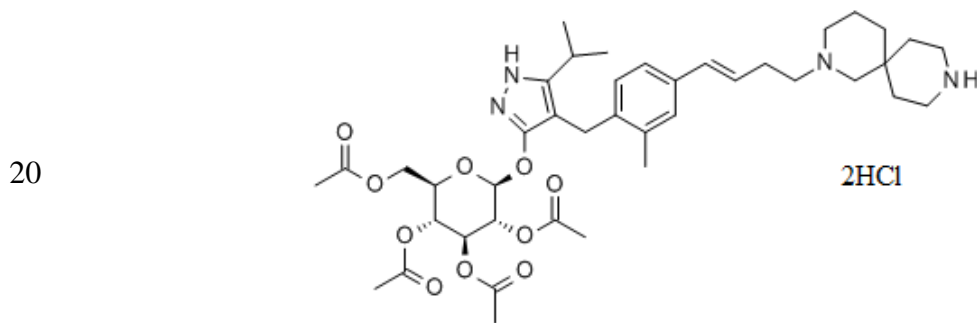
Esquema de reacción 2, Etapa D: Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (303 mg, 1.4 mmol) a una solución de 4-{4-[(1*E*)-4-oxibut-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-ilo 2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-
 25

glucopiranosido (600 mg, 0.95 mmol) y 2,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-carboxilato de clorhidrato de terc-butilo (333 mg, 1.2 mmol) en 1,2-dicloroetano (30 mL). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se
 5 apagó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (15 mL). Se extrajo con diclorometano (60 mL). El extracto se lavó con agua (30 mL) y salmuera (60 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía
 10 instantánea para proporcionar el compuesto del título (500 mg, 0.58 mmol).

MS (m/z): 866.8, 867.8 (M+1), 864.8, 865.8 (M-1).

Preparación 13

15 Diclorhidrato 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-ilo 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-beta-D-glucopiranosido



Esquema de reacción 2, etapa E: Se agregó cloruro de hidrógeno (4.0 M de solución en 1,4-dioxano, 1.5 mL, 5.8
 25 mmol) a una solución de 2-{(3*E*)-4-[3-metil-4-({5-(propan-2-

il)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranosil)oxi]-1H-pirazol-4-il}metil)fenil]but-3-en-1-il}-2,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-carboxilato de terc-butilo (500 mg, 0.58 mmol) en diclorometano (20 mL). Después de 2 horas a temperatura ambiente, se concentró para remover el solvente bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido (480 mg, 0.57 mmol). MS (m/z): 767.4 (M+1).

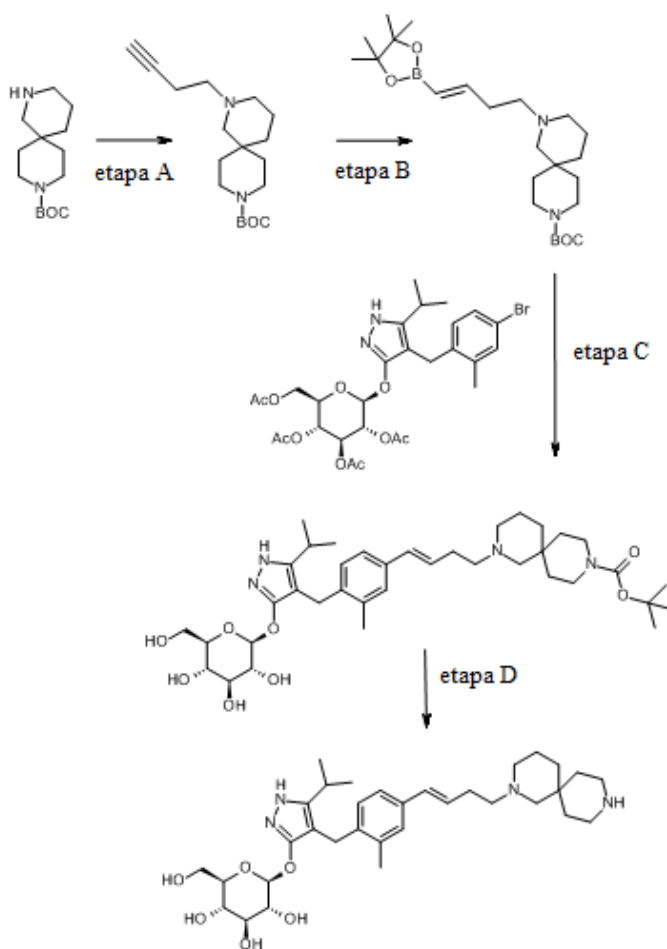
10

Esquema de reacción 3

15

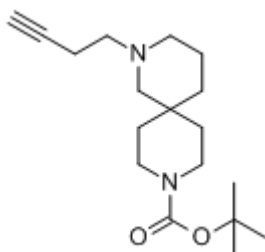
20

25



Preparación 14

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



5

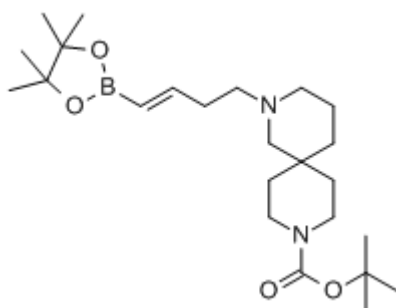
Esquema de reacción 3, etapa A: Se agregó carbonato de cesio (46.66 g, 143.21 mmol) a una suspensión de
10 clorhidrato de 4,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-carboxilato de
terc-butilo (16.66 g, 57.28 mmoles) en acetonitrilo (167 mL).
La mezcla se agitó por 10 minutos a temperatura ambiente
después se agregó 4-bromobutina (6.45 mL, 68.74 mmol). La
reacción se calentó a reflujo y se agitó por 18 horas. La
15 mezcla se enfrió y concentró bajo presión reducida. El
residuo se dividió 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), después salmuera (150 mL), se
20 secaron sobre MgSO_4 , se filtraron, y se concentraron bajo
presión reducida para dar el compuesto del título (17.2 g,
98% de rendimiento). ^1H NMR (300.11 MHz, CDCl_3): 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).

25

Preparación 15

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

5



10 Esquema de reacción 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 circonoceno (1.45 g, 5.62 mmoles) a 4-but-3-inil-4,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-carboxilato de terc-butilo (17.21 g, 56.16 mmoles). La mezcla resultante se calentó a 65 °C por 3.5 horas. La mezcla se enfrió y se disolvió en diclorometano (150 mL). La solución resultante se pasó a través de una almohadilla gruesa de ~4cm de gel de sílice, eluyendo con diclorometano (2 x 200 mL). Lo filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto del título (21.2 g, 87% de rendimiento). ¹H NMR (300.11 MHz, CDCl₃): 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).

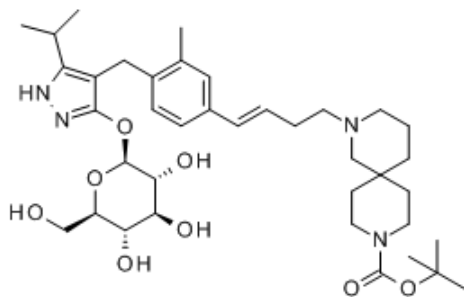
15

20

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]undecan-9-carboxilato de terc-butilo

5

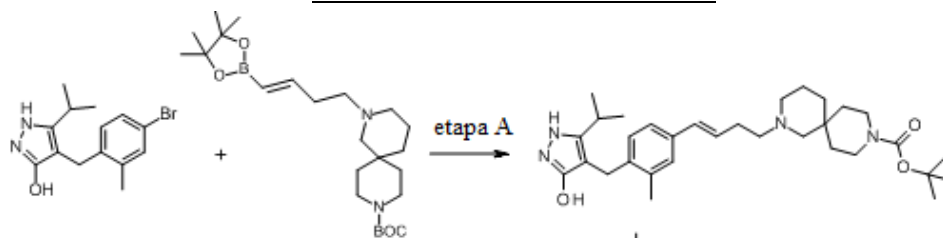


Esquema de reacción 3, etapa C: Una solución de 4-(4-bromo-2-metilbencil)-5-(propan-2-il)-1*H*-pirazol-3-ilo 2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranósido (20 g, 31.3 mmol), 4-[(*E*)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-carboxilato de terc-butilo (16.3 g, 37.5 mmol) y carbonato de potasio (12.97 g, 93.82 mmol) en tetrahidrofurano (200 mL) y agua (40 mL) se desgasificó por 15 min burbujeando gas de nitrógeno a través de ésta. Se agregaron Pd(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 reflujo por 16 h. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se agregó metanol (200 mL). Después de 30 minutos se removió el solvente bajo presión reducida. La mezcla se dividió entre acetato de etilo (500 mL) y salmuera (500 ml) agregando MgSO₄ acuoso (1M; 500 ml) para ayudar a la separación de fases. Las

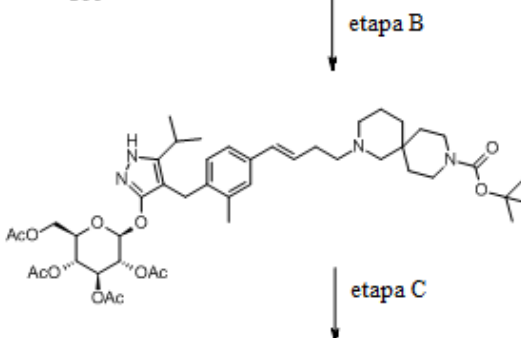
capas se separaron y la capa orgánica se secó sobre MgSO_4 y se filtró a través de una almohadilla de 10 cm de gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo (~1.5 L). Lo filtrado se desechó y la almohadilla de sílice se lavó a chorro con 5% de MeOH en THF (2 L). Lo filtrado metanólico se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto del título (20.1g, 92%). MS (m/z): 699 (M+1).

Esquema de reacción 4

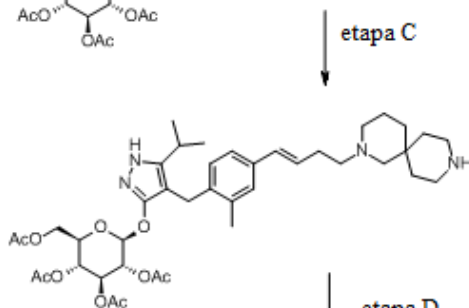
10



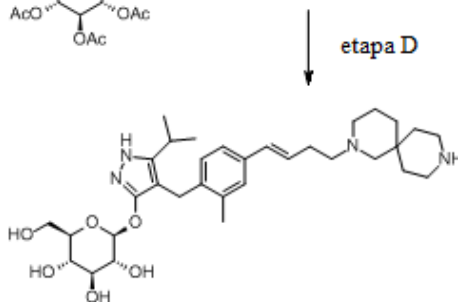
15



20



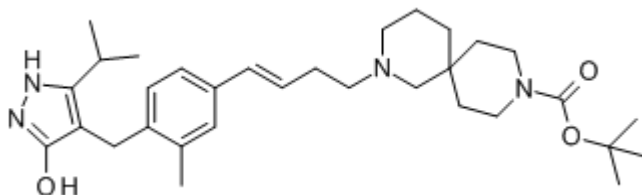
25



Preparación 17

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

5



Esquema de reacción 4, etapa A: Se agregó 4-[(E)-4-
 10 (4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-carboxilato de terc-butilo (35.8 kg, 82.4 mol) en metanol (130 L) 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 L) a temperatura ambiente. Se
 15 agregó agua (590 L) y fosfato tripotásico (100 kg, 471.7 mol) y la reacción se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. A la solución de agitación, se agregó una suspensión de tris(dibencilidenacetona)dipaladio (1.42 kg, 1.55 mol) y tetrafluoroborato de di-terc-butilmetilfosfonio (775 g, 3.12
 20 mol) en metanol (15 L). La mezcla resultante se calentó a 75 °C por 2 horas. Se enfrió la mezcla y se filtró sobre tierra diatomácea. La torta de filtro se enjuagó con metanol (60 L), y lo filtrado se concentró bajo presión reducida. Se agregó acetato de etilo (300 L), las capas se separaron, y la capa
 25 orgánica se lavó con 15% salmuera (3 x 120 L). La capa

orgánica se concentró bajo presión reducida, se agregó acetato de etilo (300 L), y la mezcla se agitó por 18 a 20 horas. Se agregó heptano (300 L), se enfrió la mezcla a 10 °C, y la mezcla se agitó por unas 18 a 20 horas adicionales.

5 Los sólidos resultantes se recolectaron por filtración, la torta se enjuagó con acetato de etilo/heptano (2:3, 2 x 90 L), y se secó bajo vacío a 40°C para dar el compuesto del título (29.3 kg, 70.6% de rendimiento) como un sólido blanco.

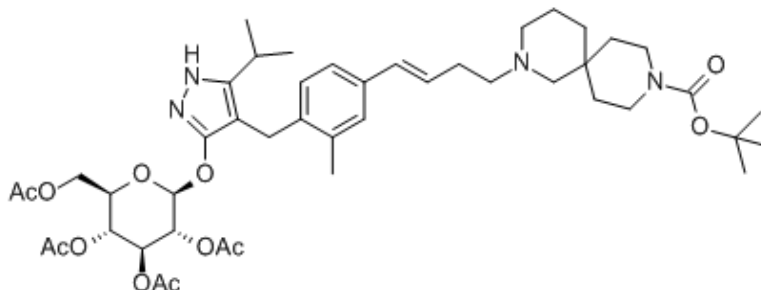
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.14 (s, 1H), 7.07 (d, J= 8.0 Hz, 10 1H), 6.92 (d, J= 7.6 Hz, 1H), 6.39 (d, J= 16.0 Hz, 1H), 6.25–6.12 (m, 1H), 3.63 (s, 2H), 3.45–3.38 (bs, 3H), 3.34 (s, 3 H), 3.33 (s, 3H), 2.85–2.75 (m, 1H), 2.49–2.40 (m, 5 H), 2.33 (s, 3H), 1.68–1.62 (m, 2H), 1.60–1.36 (m, 15H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H).

15

Preparación 12b

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

20



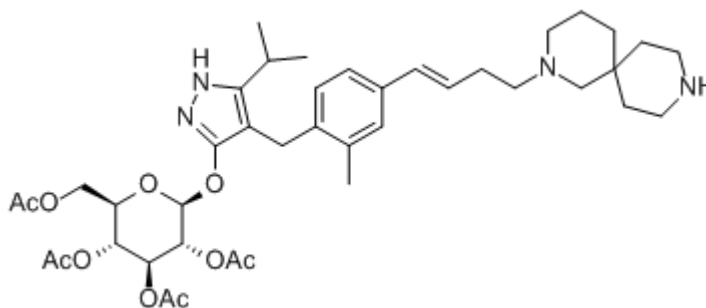
25

Esquema de reacción 4, etapa B: Se combinó 4-[(E)-4-[4-[(3-hidroxi-5-isopropil-1H-pirazol-4-il)metil]-3-metil-fenil]but-3-enil]-4,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-carboxilato de terc-butilo (17.83 kg, 33.2 moles), acetonitrilo (180 L), y cloruro de benciltributilamonio (1.52 kg, 4.87 moles) a temperatura ambiente. Lentamente se agregó carbonato de potasio (27.6 kg, 199.7 moles) y la mezcla se agitó por 2 horas. Se agregó bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-alfa-D-glucopiranosilo (24.9 kg, 60.55 mol), la mezcla de reacción se calentó a 30°C y se agitó por 18 horas. La mezcla se concentró bajo presión reducida y se agregó acetato de etilo (180 L), seguido por agua (90 L). Las capas se separaron, la fase orgánica se lavó con 15% salmuera (3 x 90 L), la mezcla se concentró, y se purificó usando cromatografía en columna sobre gel de sílice (63 kg, acetato de etilo/heptanos como eluyente (1:2→1:0)) para proporcionar el compuesto del título (19.8 kg, 94% de pureza, 68.8% de rendimiento) como una espuma amarilla. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.13 (s, 1H), 7.03 (d, J= 8.0 Hz, 1H), 6.78 (d, J= 8.0 Hz, 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, 18 H), 1.82 (s, 3H), 1.62-0.82 (m, 22H).

Preparación 18

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

5



10 Esquema de reacción 4, etapa C: Se combinó 2-{(3*E*)-4-[3-metil-4-({5-(propan-2-il)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranosil)oxi]-1*H*-pirazol-4-il}metil)fenil]but-3-en-1-il}-2,9-diazaespiro[5.5]undecan-9-carboxilato de terc-butilo (19.6 kg, 22.6 moles) con diclorometano (120 L) y se
15 enfrió a 0°C. Lentamente se agregó ácido trifluoroacético (34.6 L, 51.6 kg, 452 moles) y se agitó por 9 horas. La reacción se apagó con agua helada (80 L), y se agregó hidróxido de amonio (85-90 L) para ajustar la mezcla de reacción a pH (8-9). Se agregó diclorometano (120 L), la
20 mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente, y las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con agua (75 L), salmuera, y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (16.2 kg, 95.0% de pureza, 93% de rendimiento) como un sólido amarillo. ¹H NMR
25 (400 MHz, CDCl₃): δ 7.08 (s, 1H), 6.99 (d, J= 8.0 Hz, 1H),

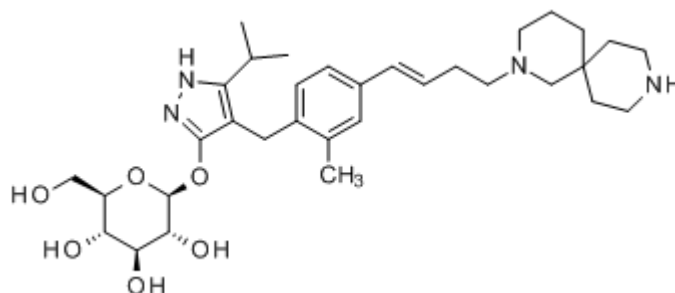
6.76 (d, J= 7.6 Hz, 1H), 6.38 (d, J=15.6 Hz, 1H), 6.00–5.83 (m, 1H), 5.31 (d, J= 7.6 Hz, 1H), 5.25–5.13 (m, 4H), 4.32 (dd, J= 12.8, 9.2 Hz, 1H), 4.14 (d, J= 11.2 Hz, 1H), 3.90 (d, J= 10.0 Hz, 1H), 3.75–3.50 (m, 3H), 3.30–3.00 (m, 5 H), 2.85–
 5 2.75 (m, 1H), 2.70–2.48 (m, 3H), 2.25 (s, 1H), 2.13–1.63 (m, 19H), 1.32–1.21 (m, 1H), 1.14 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.10 (s, 3H).

Ejemplo 1

10 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-ilo
 beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado

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

20

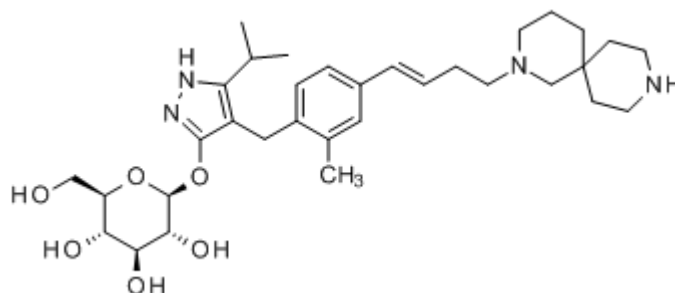


Esquema de reacción 1, etapa I: Se agregó hidróxido
 de sodio (0.5 mL, 0.5 mmol, 1.0 M de solución) a una solución
 25 de diclorhidrato de 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-

2-il)but-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1H-
 pirazol-3-ilo 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-beta-D-glucopiranosido
 (258 mg, 0.24 mmol) en metanol (2 mL). Después de 2 horas a
 40°C, se concentró para remover el solvente bajo presión
 5 reducida para dar un residuo, el cual se purificó por el
 método de HPLC preparativa: pH alto, 25% B por 4 min, 25-40 B
 % por 4 min @ 85 mL/min usando una columna OBD C18XBridge de
 5 µm de 30 x75 mm, solvente A - H₂O con NH₄HCO₃ @ pH 10,
 solvente B - MeCN para proporcionar el compuesto del título
 10 (base libre) como un sólido (46 mg, 0.08 mmol). MS (m/z):
 598.8 (M+1), 596.8 (M-1).

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

20



Esquema de reacción 2, etapa F: Se agregó metanol
 (5 mL), trietilamina (3 mL), y agua (3 mL) a diclorhidrato 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-ilo 2,3,4,6-

tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranosido (480 mg, 0.24 mmol). Después de 18 horas (durante la noche) a temperatura ambiente, se concentró a sequedad bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por el método de HPLC preparativa: pH alto, 25% B por 4 min, 25-40 B % por 4 min @ 85 mL/min usando una columna OBD C18XBridge de 5 µm de 30 x75 mm, solvente A - H₂O con NH₄HCO₃ @ pH 10, solvente B - MeCN para proporcionar el compuesto del título (base libre) como 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 Hz, 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 (amplio s, 2H), 1.59 (m, 2H), 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).

20

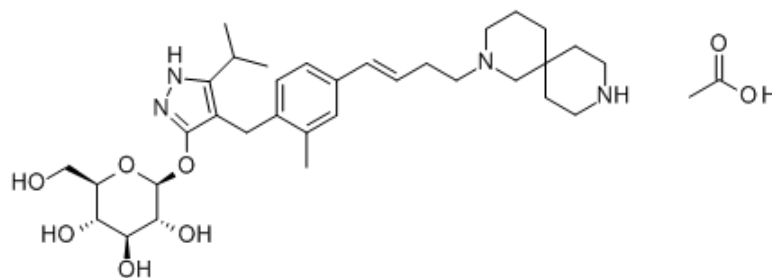
Tercera preparación alternativa de 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-il)but-1-en-1-il]-2-metilbencil}-5-(propan-2-il)-1H-pirazol-3-ilo beta-D-glucopiranosido.

Esquema de reacción 3, etapa D: Se agregó ácido trifluoroacético (32.2 mL; 0.426 mol) a una solución de 2-

25

{(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]undecan-9-carboxilato de terc-butilo (14.87 g; 21.28 mmol) en diclorometano (149 mL) se enfrió en
 5 agua helada. 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 como sea necesario para mantener una temperatura constante. La solución se agitó a temperatura ambiente por 15
 10 min. La mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó usando resina SCX-2. Lo filtrado básico se concentró bajo presión reducida y el residuo se trituro/sonicó en acetato de etilo, se filtró y secó. El sólido resultante se disolvió en MeOH (200mL) y se concentró
 15 *in vacuo*. Esto se repitió varias veces para dar el compuesto del título (base libre) (12.22 g, rendimiento 96%). MS (*m/z*): 599 (*M*+1); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -12^\circ$ (*C*=0.2, MeOH).

Preparación del compuesto del título final, acetato de 4-{4-
 20 [(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-ilo beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado.



5

4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaespiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-metilbencil}-5-(propan-2-yl)-1H-pirazol-3-ilo beta-D-glucopiranosido (902 mg) se colocó en un matraz de fondo redondo (100 mL) y se trató con acetato de etilo húmedo (18 mL). [Nota - se preparó acetato de etilo húmedo mezclando acetato de etilo (100 mL) y agua desionizada (100 mL). Después del mezclado, las capas se dejaron separar, y la capa superior de acetato de etilo húmeda se removi6 para uso. El ácido acético es un producto de hidrólisis de acetato de etilo y está presente en acetato de etilo húmedo.] El compuesto se disuelve, aunque no completamente conforme se agrega el acetato de etilo húmedo. Después de varios minutos, se forma un precipitado blanco. Una cantidad adicional de acetato de etilo húmedo (2 mL) se agregó para disolver el compuesto restante. La solución se dejó agitar no cubierta durante la noche a temperatura ambiente durante tal tiempo el solvente evapora parcialmente. El solvente restante a partir de la suspensión del producto se removi6 bajo vacío, y el sólido resultante se secó bajo una corriente de nitr6geno para proporcionar el compuesto del título final como un

25

sólido cristalino. Una pequeña cantidad de material amorfo se identificó en el producto por NMR de estado sólido. Este compuesto del título final cristalino puede ser usado como cristales sembrados para preparar el compuesto del título
 5 final cristalino adicional.

Preparación alternativa del compuesto del título final,
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-ilo
beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado.

10 Bajo una atmósfera de nitrógeno combinada 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-ilo 2,3,4,6-tetra-
 O-acetil-beta-D-glucopiranosido (2.1 kg, 2.74 mol), metanol
 (4.4 L), tetrahidrofurano (4.2 L), y agua (210 mL). Se agregó
 15 carbonato de potasio (460 g, 3.33 moles) y se agitó por
 cuatro a seis horas, después la mezcla de reacción se filtró
 para remover los sólidos. Lo filtrado se concentró bajo
 presión reducida, después se agregó etanol (9.0 L) seguido
 por ácido acético (237 mL, 4.13 mol) y se agitó a temperatura
 20 ambiente por una hora. A la solución de agitación se agregó
 acetato de etilo húmedo (10 L, que contiene aprox. 3 % en p/p
 de agua) lentamente durante cinco horas, seguido por agua
 (500 mL). La suspensión se agitó por doce horas y se agregó
 acetato de etilo húmedo (4.95 L, que contiene aproximadamente
 25 3% en p/p de agua) durante un periodo de ocho horas. La

suspensión se agitó por doce horas y se agregó acetato de etilo húmedo adicional (11.5 L, que contiene aproximadamente 3% en p/p de agua) lentamente durante dieciséis horas. La suspensión se agitó por doce horas, los sólidos se recolectaron por filtración y los sólidos se enjuagaron con acetato de etilo húmedo (3.3 L, que contiene aproximadamente 3% en p/p de agua). Se secó en un horno bajo presión reducida por debajo de 30°C para dar el compuesto del título como un sólido cristalino blancuzco (1.55 kg, 2.35 mol, 96.7% de pureza, 72.4 % en p/p de potencia, 68.0% de rendimiento con base en la potencia). HRMS (m/z): 599.3798 (M+1).

Difracción en Polvo de Rayos-X (XRD)

Se obtuvieron los patrones de XRD de los sólidos cristalinos en un difractómetro en polvo de rayos-X Bruker D8 Advance, equipado con una fuente $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) y un detector Linxeye, operando a 40 kV y 40 mA. La muestra se barrió entre 4 y 40° en 2-theta, con un tamaño de etapa de 0.0084° en 2-theta y una velocidad de barrido de 0.5 segundos/etapa, y con una división de divergencia de 0.2 mm. El polvo seco se envasó en un sujetador de muestra de sílice de bajo fondo y se obtuvo una superficie lisa usando una laminilla de vidrio. Los patrones de difracción en forma de cristal son recolectados a 22°C y a una humedad relativa de 42%. Es bien conocido en la técnica de cristalografía que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades

relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida resultante de ciertos factores, tales como morfología de cristal. Donde los efectos de la orientación preferida están presente, las intensidades pico son alteradas, pero las posiciones pico características del polimorfo están sin cambio. Véase, por ejemplo, La Farmacopea Estadounidense #23, Formulario Nacional #18, páginas 1843-1844, 1995. Además, también es bien conocido en la técnica de cristalografía que para cualquier forma de cristal dada las posiciones pico angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones pico pueden cambiar debido a la variación en la temperatura o humedad en la cual la muestra es analizada, desplazamiento de muestra, o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad de posición de pico de ± 0.2 en 2-theta tomará en cuenta estas variaciones potenciales sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma de cristal indicada. La confirmación de una forma de cristal puede hacerse con base en cualquier combinación única de picos de distinción (en unidades de $^{\circ}$ 2-theta), típicamente, los picos más prominentes. Los patrones de difracción de forma cristalina, recolectados a temperatura ambiente y humedad relativa, son ajustados con base en los picos estándares de la Oficina Nacional de Estándares (NBS) 675 a 8.853 y 26.774 grados 2-theta.

Una muestra preparada de 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-ilo beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado es caracterizada por un patrón de XRD usando radiación CuK α por tener picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 abajo, y en particular que tiene picos a 5.2° en combinación con uno o más de los picos seleccionados a partir del grupo que consiste de 7.8°, 8.0°, y 10.7° ($\pm 0.2^\circ$ respectivamente).

Picos de difracción en polvo de rayos-X de 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-ilo beta-D-glucopiranosido cristalino hidratado.

Tabla 1

Pico	Ángulo($^\circ$ 2-Theta) $\pm$ 0.2°	Intensidad relativa (% del pico 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

NMR de Estado Sólido ^{13}C (NMR ^{13}C)

Se obtuvieron espectro de NMR (NMR de estado sólido o ssNMR) de giro de ángulo mágico/polarización cruzada de ^{13}C usando un espectrómetro de NMR Bruker Avance II de 400 MHz

5 NMR operando a una frecuencia de carbono de 100.622 MHz y frecuencia de protón de 400.131 MHz y equipado con una sonda de doble resonancia Bruker de 4mm. La supresión de banda lateral TOSS se usó junto con la polarización cruzada empleando desacoplamiento SPINAL64 y un pulso CP de núcleo H

10 conformado RAMP100. Los parámetros de adquisición son como sigue: amplitud de pulso r.f. de protón de 90° de 2.6 μs , el tiempo de contacto fue 2.0 ms, tiempo de repetición de pulso de 3 x, frecuencia MAS de 10 kHz, amplitud espectral de 30 kHz, el tiempo de adquisición de 34 ms y el número de

15 barridos fue 18,661. Los cambios químicos son referenciados a adamantano ($\delta = 29.5$ ppm) en un experimento separado.

Las resonancias de ssNMR ^{13}C representativas para 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-ilo

20 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,

25 23.8, 20.8, 19.9, 18.4, y 16.9 ppm (± 0.2 ppm)

respectivamente).

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

5 El ADNc que codifica a SGLT1 humano (*slc5a1*, NM_000343), SGLT2 humano (*slc5a2*, NM_003041) y SGLT1 de ratón (*slc5a1*, NM_019810.4) se adquirieron de Openbiosystems, Invitrogen y Openbiosystems, respectivamente. El ADNc se clonó en pcDNA3.1+ para la expresión de mamífero y es
 10 establemente transfectado en células de ovario de hámster Chino (CHO)-K1 usando procedimientos de transfección de mamífero estándar. Un sub-clon que expresa SGLT de cada línea de células de sobre expresión se seleccionó con base en la resistencia a neomicina (Geneticina, Invitrogen) y actividad
 15 en el ensayo de absorción de ^{14}C - α -metil-D-glucopiranosido (^{14}C -AMG) (véase abajo). Las células que expresan SGLT estables son mantenidas usando técnicas estándares de cultivo celular.

La actividad de SGLT se mide como absorción de ^{14}C -
 20 AMG dependiente del sodio en las líneas celulares anteriores descritas como sigue. Cien μL de medio de cultivo que contiene 30,000 células se sembraron en cada cavidad de una placa de poli-D-lisina BioCoat de 96 cavidades (Becton Dickson) y se cultivaron a 37°C durante la noche. El medio de
 25 cultivo se aspiró y las células se lavaron dos veces con 200

μL de Amortiguador de Reacción (140 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1 mM de CaCl_2 , MgCl_2 , y 14 mM de ácido N-2-hidroetilpiperazin-N'-2-etansulfónico (Hepes), pH 7.5). El exceso de amortiguador se aprovecho sobre toallas de

5 papel. Treinta y cinco μL de Amortiguador de Reacción se agregaron a cada cavidad. Cinco μL de un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) en Amortiguador de Reacción que contiene concentraciones variantes del compuesto de prueba o no tiene compuesto como un control, se dispensaron en cada

10 cavidad. La reacción se inició agregando 10 μL de ^{14}C -AMG en Amortiguador de Reacción para hacer una concentración final de 4 μM . La placa se incubó a 37°C por 125 minutos. La reacción se terminó por aspiración del Amortiguador de Reacción y después se lavó tres veces con 200 μL de

15 Amortiguador de Reacción enfriado en hielo. La aspiración manual se aplicó para asegurar la remoción completa del Amortiguador de Reacción. Diez μL de 0.1 N de NaOH se agregaron a cada cavidad y después se agregaron 100 μL de cóctel de escintilación Supermix (PerkinElmer). Después del

20 mezclado, la señal de escintilación en la placa se contó en una MicroBeta (PerkinElmer). Una curva de respuesta de diez dosis se ajustó a un modelo de cuatro parámetros empírico usando ActivityBase (ID Business Solution) para determinar la concentración del inhibidor a inhibición media máxima (IC_{50}).

25 La base libre del Ejemplo 1 se probó esencialmente como se

describe anteriormente.

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

5	Compuesto de Ensayo	IC ₅₀ de GLT1 humano, nM	IC ₅₀ de SGLT2 humano, nM	IC ₅₀ de SGLT1 de ratón, 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 SGLT1 humano y de ratón que en SGLT2 humano *in vitro*.

Efectos de Disminución de Glucosa en Ensayo de Tolerancia a la Glucosa Oral (OGTT)

El compuesto de ensayo se formuló agregando un vehículo de 1% de hidroxietilcelulosa, 0.25% de Tween® 80 p/antiespuma al 0.05% al compuesto de ensayo prepesado para elaborar una solución de 1mg/ml. La mezcla se sonicó con sonda por aproximadamente 30 segundos. La solución resultante se usó como una solución base a partir de la cual las soluciones de dosis de concentración inferior son preparadas por dilución con el vehículo.

Ratones C57Bl/6 alojados individuales son ayunados durante la noche eliminando el acceso al alimento después de

la tarde antes del día del ensayo. A la mañana siguiente, los ratones son pesados y una muestra de sangre en ayunas se toma por recorte de la cola para medir la glucosa por glucómetro (Roche AccuChek). Los grupos de estudio (n=5) son
5 determinados con base en la glucosa en la sangre en ayunas y comprenden preferiblemente animales en el intervalo de 80-100 mg/dl de glucosa.

Después del agrupamiento, el primer ratón es alimentado de manera forzada oralmente con 10 ml/kg de la
10 preparación del compuesto de ensayo y un temporizador de inicio. Cada animal subsecuente se dosificó un minuto y medio aparte. Tres horas después se inició el tratamiento con el primer compuesto, se tomó una muestra de sangre con el valor de referencia para medición de la glucosa (del primer animal,
15 mediante recorte de la cola). El animal es inmediatamente entonces dado con una dosis oral de 50% de dextrosa (Hospira) a 3 g/kg. Las muestras de sangre son tomadas para determinar la glucosa, exactamente un minuto y medio a parte, por la vena de la cola de manera que la sangre se recolectó en cada
20 animal a 20, 40, 60 y 120 minutos después de la dosis de dextrosa.

Tabla 3. Efectos de disminución de glucosa en OGTT

Resultados de Ensayo de Tolerancia a la Glucosa Oral					
Media $\pm$ SE					
ANOVA de 2 formas/ **p<0.01, ***p<0.001 de Bonferroni 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 Minuto	84 $\pm$ 8.4	78 $\pm$ 4.2	76 $\pm$ 3.3	72 $\pm$ 2.6	78 $\pm$ 5.4
20 Minutos	268 $\pm$ 49.3	185 $\pm$ 13.7***	147 $\pm$ 8.3***	133 $\pm$ 7.1***	124 $\pm$ 1.2***
40 Minutos	192 $\pm$ 26.8	197 $\pm$ 14.7	171 $\pm$ 11.1	150 $\pm$ 7.5	137 $\pm$ 5.4**
60 Minutos	139 $\pm$ 6.2	164 $\pm$ 6.3	162 $\pm$ 5.8	155 $\pm$ 7.2	138 $\pm$ 6.1
120 Minutos	105 $\pm$ 5.1	121 $\pm$ 11.8	109 $\pm$ 7.3	115 $\pm$ 10	114 $\pm$ 4.3
ANOVA de 1 forma/ *p<0.05, **p<0.01 de Dunnett, comparado con el vehículo					
AUC ajustada al valor de referencia	6408 $\pm$ 1500	5400 $\pm$ 519	4158 $\pm$ 374	3606 $\pm$ 421*	2693 $\pm$ 309**
Glucosa (mg/dl)					
Cmax de Glucosa	268 $\pm$ 49.3	199 $\pm$ 14.1	174 $\pm$ 9.38**	161 $\pm$ 5.00**	141 $\pm$ 5.67**
Tiempo (minutos)					
Tmax de Glucosa	20 $\pm$ 0	32 $\pm$ 5	48 $\pm$ 5	64 $\pm$ 13**	44 $\pm$ 7

Como se muestra anteriormente en la Tabla 3, la base libre del Ejemplo 1 suministra una disminución dependiente de la dosis en la excusión de glucosa después de un bolo oral de 50% de dextrosa (Hospira®) en el ratón C57Bl/6 glicémico normal. La base libre del Ejemplo 1 también demuestra una disminución dependiente de la dosis en el área bajo la curva de glucosa ajustada con el valor de referencia (AUC) durante un OGTT. Además, la base libre del ejemplo 1 dependientemente de la dosis disminuye la concentración máxima promedio de glucosa en plasma (Cmax) durante el OGTT.

Valores de Glucosa en un Ensayo de Tolerancia a la Comida

Mezclado en Ratas Macho con Diabetes Inducida por

Estreptozotocina

Ratas las cuales han sido administradas con estreptozotocina (STZ) desarrollaron diabetes mellitus. Los agentes los cuales modulan los niveles de glucosa en estos animales se cree son útiles en el tratamiento de diabetes en humanos.

El compuesto de ensayo es formulado agregando un vehículo de 1% de hidroxietilcelulosa (HEC), 0.25% de Tween® 80 p/ de antiespuma al 0.05% al compuesto de ensayo prepresado para elaborar 2.5 mg/ml de una solución. La mezcla es sonicada en sonda por aproximadamente 30 segundos. La solución resultante es usada como una solución base, a partir

de la cual las soluciones de dosis de concentración inferior son preparadas por dilución con el vehículo. STZ, 45 mg/kg, es formulado por disolución en 0.1M de amortiguador de citrato en alícuotas de 3 ml y almacenadas en la oscuridad en hielo, cuando no es administrado. Se utiliza una comida mezclada de alto contenido en grasas (Bio-Serv® Dieta de Roedor F3282 Alta en Grasas) que comprende Calorías de Gras (60%), Calorías de Carbohidratos (26%) y Calorías de Proteínas (15%). Ratas Sprague Dawley alojadas individuales son dejadas aclimatar por un periodo de 3 a 7 días.

En un esfuerzo por asegurar que los animales no se han alimentado recientemente, el STZ es administrado en la tarde, aproximadamente seis horas en el ciclo de luz (luces encendidas 6 am, luces apagadas 6 pm). Los animales son anestesiados con isoflurano y el STZ se suministra mediante inyecciones en la vena de la cola. Una vez que los animales recuperan la conciencia, son regresados al alojamiento y dejados recuperar por 7 días.

En los dos días inmediatamente previos al ensayo de tolerancia a la comida (MTT) todas las ratas son proporcionadas con una pequeña cantidad (2-4g) de la dieta F3283, de manera que llega a ser aclimatadas antes de recibirla durante el experimento. En la noche antes del experimento, las ratas son movidas en jaulas limpias y su alimento es removido. A la siguiente mañana los animales son

pesados y una muestra de sangre se toma por recorte de la cola para medición de glucosa (glucómetros Abbott AlphaTRAK™: código 29). Los animales son agrupados n=6 con base en el peso corporal de ayunas y glucosa. Treinta minutos después que el compuesto de ensayo es administrado oralmente, se recolectan dos mediciones de glucosa. Se proporcionan entonces cinco gramos de pelotillas de dieta Bio-Serv® 3282. Después de 20 minutos se toma el alimento restante lejos y se pesa. Las muestras de sangre son tomadas a 20, 40, 60 y 120 minutos para medición de glucosa.

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

15			Valores de glucosa (mg/dl) Grupos n=5-6, Media ±SE					
	Trata- miento	Dosis	0 min.	20 min.	40 min.	60 min.	120 min.	AUC ajustado al valor de refe- rencia
20	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 ± 22.8	301.3 ± 51.2	371.5 ± 63.9	433.7 ± 83	23877 ± 4649*
ANOVA de 2 formas /*p<0.05, **p<0.01 de Bonferroni								

Como se muestra en la Tabla 4 anterior, la base libre del Ejemplo 1 disminuye la glucosa significativamente y dependiente de la dosis en MTT comparado con los controles de vehículo. La acarbosa, la cual es un control positivo, no
5 disminuye significativamente la glucosa comparado con los controles en cualquier punto de tiempo. Además, existe una disminución dependiente de la dosis en las AUC ajustadas al valor de referencia de la glucosa asociados con la base libre del tratamiento del Ejemplo 1. La acarbosa disminuye
10 significativamente el AUC a niveles similares a aquellos del Ejemplo 1 a 10mg/kg. La Tabla 4 demuestra que la base libre del Ejemplo 1 modula los niveles de glucosa en rata macho.

15

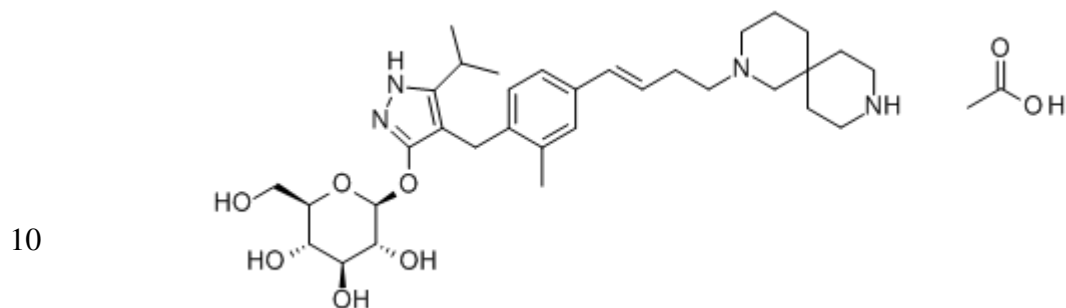
20

25

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

- 5 1. Un compuesto caracterizado porque es de la fórmula:



o hidrato del mismo.

2. Una forma cristalina del compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque es
15 hidratada.

3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado por al menos uno de los siguientes:

- a. un patrón de difracción en polvo de rayos-X
20 usando radiación $\text{CuK}\alpha$ que tiene un pico intenso en un ángulo de difracción 2-theta de 5.2° en combinación con uno o más picos intensos seleccionados a partir del grupo que consiste de 7.8° , 8.0° , y 10.7° ($\pm 0.2^\circ$ respectivamente); y

- b. un espectro de NMR de estado sólido ^{13}C el cual
25 comprende picos referenciados a la resonancia de campo alto

de adamantano ($\delta=29.5$ ppm) a: 181.8, 161.2, 160.0, 147.6 y 137.4 ppm (± 0.2 ppm respectivamente).

4. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el contenido
5 de agua a temperatura ambiental está en el intervalo de aproximadamente 9% hasta aproximadamente 12% en peso.

5. Un método para tratar diabetes en un paciente, caracterizado porque comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un
10 compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Un método para tratar diabetes tipo 1 en un paciente, caracterizado porque comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad
15 efectiva de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

7. Un método para tratar diabetes tipo 2 en un paciente, caracterizado porque comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad
20 efectiva de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

8. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en terapia.

9. Un compuesto de conformidad con cualquiera de
25 las reivindicaciones 1 a 4, para uso en el tratamiento de

diabetes.

10. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque la diabetes es diabetes tipo 1.

5 11. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque la diabetes es diabetes tipo 2.

12. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un compuesto de conformidad con cualquiera
10 de las reivindicaciones 1 a 4 con uno o más portadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15

20

25

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X19966	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2014/063161	International filing date (<i>day/month/year</i>) 30 October 2014 (30-10-2014)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 8 November 2013 (08-11-2013)
Applicant ELI LILLY AND COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

4-{4-[(1E)-4-(2,9-DIAZASPIRO[5.5]UNDEC-2-YL)BUT-1-EN-1-YL]-2-METHYLBENZYL}-5-(PROPAN-2-YL)-1H-PYRAZOL-3-YL BETA-D- GLUCOPYRANOSIDE ACETATE

5. With regard to the **abstract**,

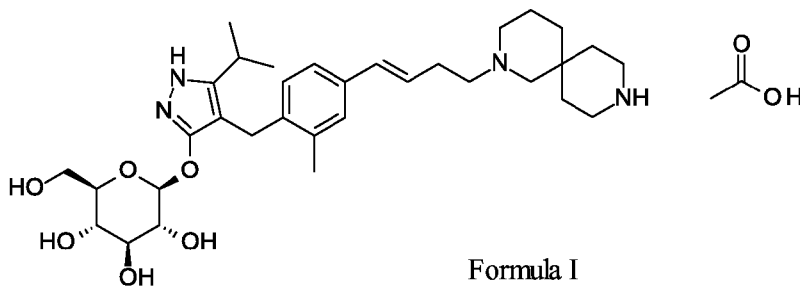
- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The present invention provides a compound of Formula I or hydrate thereof, useful for the treatment of diabetes.



Formula I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/063161

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07H17/02 A61K31/7056 A61P3/10
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 544 208 A1 (KISSEI PHARMACEUTICAL [JP]) 22 June 2005 (2005-06-22) page 14 - page 17; examples 44,73 -----	1
A,P	WO 2013/169546 A1 (LILLY CO ELI [US]) 14 November 2013 (2013-11-14) page 16; example 1 claims 2-4 -----	1



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 January 2015

Date of mailing of the international search report

16/01/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mezzato, Stefano

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/063161

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1544208	A1	22-06-2005	AT 469161 T 15-06-2010
		AU 2003254847 A1 25-02-2004	
		BR 0313290 A 05-07-2005	
		CA 2494179 A1 19-02-2004	
		EP 1544208 A1 22-06-2005	
		ES 2345250 T3 20-09-2010	
		HK 1082743 A1 02-05-2008	
		JP 4540475 B2 08-09-2010	
		KR 20050059067 A 17-06-2005	
		MX PA05001549 A 05-05-2005	
		NO 330456 B1 18-04-2011	
		NZ 538117 A 26-01-2007	
		PL 213095 B1 31-01-2013	
		RU 2356906 C2 27-05-2009	
		TW I341843 B 11-05-2011	
		US 2006166899 A1 27-07-2006	
		US 2008312153 A1 18-12-2008	
		WO 2004014932 A1 19-02-2004	

WO 2013169546	A1	14-11-2013	AU 2013259946 A1 16-10-2014
			CA 2869323 A1 14-11-2013
			DO P2014000250 A 30-11-2014
			TW 201406773 A 16-02-2014
			US 2013303471 A1 14-11-2013
			US 2014162967 A1 12-06-2014
			WO 2013169546 A1 14-11-2013

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application ELI LILLY AND COMPANY is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i)		ELI LILLY AND COMPANY is entitled as employer of the inventor, REUTZEL-EDENS, Susan Marie

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application ELI LILLY AND COMPANY is entitled to claim priority of earlier application No. 61/901,488 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from REUTZEL-EDENS, Susan Marie to ELI LILLY AND COMPANY, dated 08 November 2013 (08.11.2013)

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2014/063161

Susan Marie REUTZEL-EDENS

P.O. BOX 6288

Indianapolis,

Indiana 46206-6288

Estados Unidos

Nacionalidad: Estadounidense



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2016/000030

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ELI LILLY AND COMPANY

Dirección: Lilly Corporate Center,
Indianapolis, Indiana 46285 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. NIT

C.E. Otro

Cual

Número

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. X NIT

C.E. Otro

Cual

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2014/063161 Fecha Octubre 30, 2014

Publicación Internacional No. WO2015/069541 Fecha Mayo 14, 2015

6

Título (54) NUEVO INHIBIDOR DE SGLT1

Clasificación Internacional (51) C07H 17/02, A61K 31/7056, A61P 3/10.

(33) País de Origen (32) Fecha (31) Número de Solicitud

US Noviembre 08, 2013 61/901,488

9

Comprobante de pago No. Fecha

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☒

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295



(51) International Patent Classification:

C07H 17/02 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2014/063161

(22) International Filing Date:

30 October 2014 (30.10.2014)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/901,488 8 November 2013 (08.11.2013) US

(71) Applicant: ELI LILLY AND COMPANY [US/US];
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US).(72) Inventor: REUTZEL-EDENS, Susan Marie; c/o Eli Lilly
and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, Indiana
46206-6288 (US).(74) Agents: LENTZ, Nelsen L. et al.; Eli Lilly and Company,
P. O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

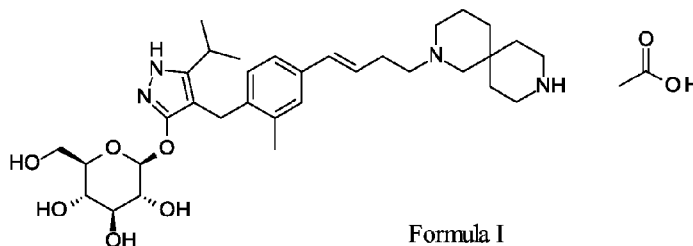
Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: 4-{4-[(1 E)-4-(2,9-DIAZASPIRO[5.5]UNDEC-2-YL)BUT-1 -EN-1 -YL]-2-METHYLBENZYL}-5-(PROPAN-2-YL)-1 H-PYRAZOL-3-YL BETA-D- GLUCOPYRANOSIDE ACETATE



Formula I

(57) Abstract: The present invention provides a compound of Formula I or hydrate thereof, useful for the treatment of diabetes.

4-{4-[(1 E)-4-(2,9-DIAZASPIRO[5.5]UNDEC-2-YL)BUT-1 -EN-1
-YL]-2-METHYLBENZYL}-5-(PROPAN-2-YL)-1 H-PYRAZOL-3-YL
BETA-D- GLUCOPYRANOSIDE ACETATE

The present invention relates to a novel SGLT1 inhibitor which is an acetate salt of a pyrazole compound, to pharmaceutical compositions comprising the compound, to
5 methods of using the compound to treat physiological disorders, and to intermediates and processes useful in the synthesis of the compound.

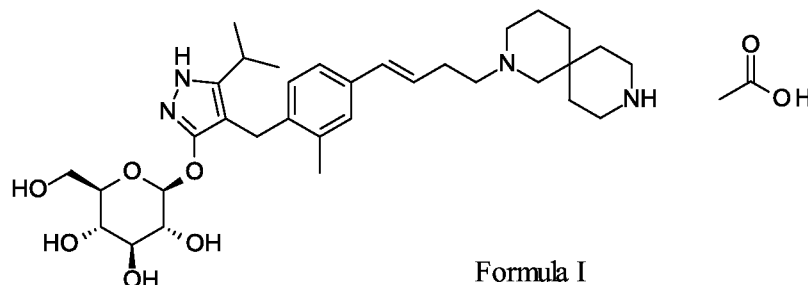
The present invention is in the field of treatment of diabetes and other diseases and disorders associated with hyperglycemia. Diabetes is a group of diseases that is characterized by high levels of blood glucose. It affects approximately 25 million people
10 in the United States and is also the 7th leading cause of death in U.S. according to the 2011 National Diabetes Fact Sheet (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention). Sodium-coupled glucose cotransporters (SGLT's) are one of the transporters known to be responsible for the absorption of carbohydrates, such as glucose. More specifically, SGLT1 is responsible for transport of
15 glucose across the brush border membrane of the small intestine. Inhibition of SGLT1 may result in reduced absorption of glucose in the small intestine, thus providing a useful approach to treating diabetes.

U.S. Patent No. 7,655,632 discloses certain pyrazole derivatives with human SGLT1 inhibitory activity which are further disclosed as useful for the prevention or
20 treatment of a disease associated with hyperglycemia, such as diabetes. In addition, WO 2011/039338 discloses certain pyrazole derivatives with SGLT1/SGLT2 inhibitor activity which are further disclosed as being useful for treatment of bone diseases, such as osteoporosis.

There is a need for alternative drugs and treatment for diabetes. The present
25 invention provides an acetate salt of a pyrazole compound, which is an SGLT1 inhibitor, and as such, may be suitable for the treatment of certain disorders, such as diabetes.

-2-

Accordingly, the present invention provides a compound of Formula I:



Formula I

or hydrate thereof.

5 The present invention also provides a crystalline form of the compound of Formula I which is hydrated.

In addition, the present invention provides a crystalline form of a compound of Formula I, which is hydrated, characterized by at least one of the following:

- 10 a. an X-ray powder diffraction pattern using CuK α radiation having an intense peak at diffraction angle 2-theta of 5.2° in combination with one or more intense peaks selected from the group consisting of 7.8°, 8.0°, and 10.7° ($\pm$ 0.2° respectively); and
- b. a ¹³C solid state NMR spectrum which comprises intense peaks referenced to the highfield resonance of adamantane (δ =29.5 ppm) at: 181.8, 15 161.2, 160.0, 147.6 and 137.4 ppm ($\pm$ 0.2 ppm respectively).

The present invention further provides a crystalline form of Formula I which is hydrated, wherein the water content at ambient temperature is in the range of about 9% to about 12% by weight.

20 In addition, the present invention provides a method of treating diabetes in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound of Formula I or hydrate thereof. The present invention further provides a method of treating type 1 diabetes in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound of Formula I or
 25 hydrate thereof. In addition, the present invention provides a method of treating type 2 diabetes in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound of Formula I or hydrate thereof. The present invention

also provides a method of treating impaired glucose tolerance (IGT), impaired fasting glucose (IFG), or metabolic syndrome in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound of Formula I or hydrate thereof.

5 Furthermore, this invention provides a compound of Formula I or hydrate thereof for use in therapy, in particular for the treatment of diabetes. In addition, this invention provides a compound of Formula I or hydrate thereof for use in the treatment of type 1 diabetes. In addition, this invention provides a compound of Formula I or hydrate thereof for use in the treatment of type 2 diabetes. The invention further provides a compound of
10 Formula I or hydrate thereof for use in the treatment of IGT, IFG, or metabolic syndrome. This invention also provides the use of a compound of Formula I or hydrate thereof for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetes. Furthermore, this invention provides the use of a compound of Formula I or hydrate thereof for the manufacture of a medicament for the treatment of type 1 diabetes. This invention also
15 provides the use of a compound of Formula I or hydrate thereof for the manufacture of a medicament for the treatment of type 2 diabetes. The invention also provides the use of a compound of Formula I or hydrate thereof for the manufacture of a medicament for the treatment of IGT, IFG, or metabolic syndrome.

 The invention further provides a pharmaceutical composition comprising a
20 compound of Formula I or hydrate thereof with one or more pharmaceutically acceptable carriers, diluents, or excipients. In a particular embodiment, the composition further comprises one or more other therapeutic agents. This invention also encompasses novel intermediates and processes for the synthesis of the compound of Formula I or hydrate thereof.

25 In addition, the invention provides a process for preparing a crystalline SGLT1 inhibitor, comprising mixing 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside with wet ethyl acetate. The invention further provides a process for preparing a crystalline SGLT
30 inhibitor, comprising mixing 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside with wet ethyl acetate, and then collecting the resulting solid.

Isolation and purification of 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside (free base) which is an amorphous solid, requires the use of chromatography, which can be resource intensive. The compound of Formula I allows for improvement in isolation and purification through elimination of chromatography, and provides a crystalline form with improved form stability and handling properties for pharmaceutical formulation, in particular commercial manufacture and storage of pharmaceutical compositions.

As used herein, the term “intense peak” means a peak having an intensity that is at least 5% that of the most intense peak in the relevant spectrum or powder pattern.

As used herein, the terms “treating” or “to treat” includes restraining, slowing, stopping, or reversing the progression or severity of an existing symptom or disorder.

As used herein, the term “patient” refers to a mammal, such as a mouse, guinea pig, rat, dog, or human. It is understood that the preferred patient is a human.

As used herein, the term “effective amount” refers to the amount or dose of compound of the invention which, upon single or multiple dose administration to the patient, provides the desired effect in the patient under diagnosis or treatment.

An effective amount can be readily determined by the attending diagnostician, as one skilled in the art, by the use of known techniques and by observing results obtained under analogous circumstances. In determining the effective amount for a patient, a number of factors are considered by the attending diagnostician, including, but not limited to: the species of mammal; its size, age, and general health; the specific disease or disorder involved; the degree of or involvement or the severity of the disease or disorder; the response of the individual patient; the particular compound administered; the mode of administration; the bioavailability characteristics of the preparation administered; the dose regimen selected; the use of concomitant medication; and other relevant circumstances.

The compound of Formula I is generally effective over a wide dosage range. For example, dosages per day normally fall within the range of about 0.01 to about 30 mg/kg of body weight. In some instances dosage levels below the lower limit of the aforesaid range may be more than adequate, while in other cases still larger doses may be employed without causing any harmful side effect, and therefore the above dosage range is not intended to limit the scope of the invention in any way.

The compound of the invention is preferably formulated as a pharmaceutical composition administered by any route which makes the compound bioavailable. Most preferably, such compositions are for oral administration. Such pharmaceutical compositions and processes for preparing same are well known in the art. (See, e.g.,
5 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition., Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

In a further aspect of the invention, the compound of the present invention may be administered in combination with one or more therapeutic agents, such as antidiabetic agents. Administration in combination includes simultaneous or sequential
10 administration. In addition, simultaneous administration of the combination can be as a single combination dose or separate doses of each therapeutic agent. Examples of antidiabetic agents include metformin; a DPPIV inhibitor, such as sitagliptin or linagliptin; a sulfonylurea, such as glimepiride; a thiazolidinedione, such as pioglitazone; a basal insulin, such as glargine; a rapid acting insulin, such as HUMALOG or
15 NOVOLOG; a GLP-1 agonist, such as exenatide or liraglutide; an SGLT2 inhibitor, such as dapagliflozin or empagliflozin; a glucagon receptor antagonist, such as LY2409021; and the like.

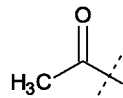
The compound of Formula I can be prepared as illustrated in the preparations, examples, and schemes set forth below. The reagents and starting materials are readily
20 available to one of ordinary skill in the art. All substituents, unless otherwise specified are as previously defined. It is understood that these schemes, preparations, and examples are not intended to be limiting to the scope of the invention in any way.

Examples of resolutions include selective crystallization techniques or chiral chromatography. (See, e.g. J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions",
25 John Wiley and Sons, Inc., 1981, and E.L. Eliel and S.H. Wilen," Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). It should be further clear to one of ordinary skill in the art that separation and isolation, by chromatography, chiral chromatography or selective crystallization, of individual diastereomers or geometric isomers can occur at any convenient point in the synthesis.

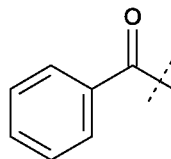
30 As used herein, "δ" refers to parts per million down-field from tetramethylsilane; "min" refers to minute or minutes; "THF" refers to tetrahydrofuran; "MeOH" refers to methanol or methyl alcohol; "HPLC" refers to high-performance liquid chromatography;

-6-

The term “Ac” refers to an acetyl substituent of the following structure:



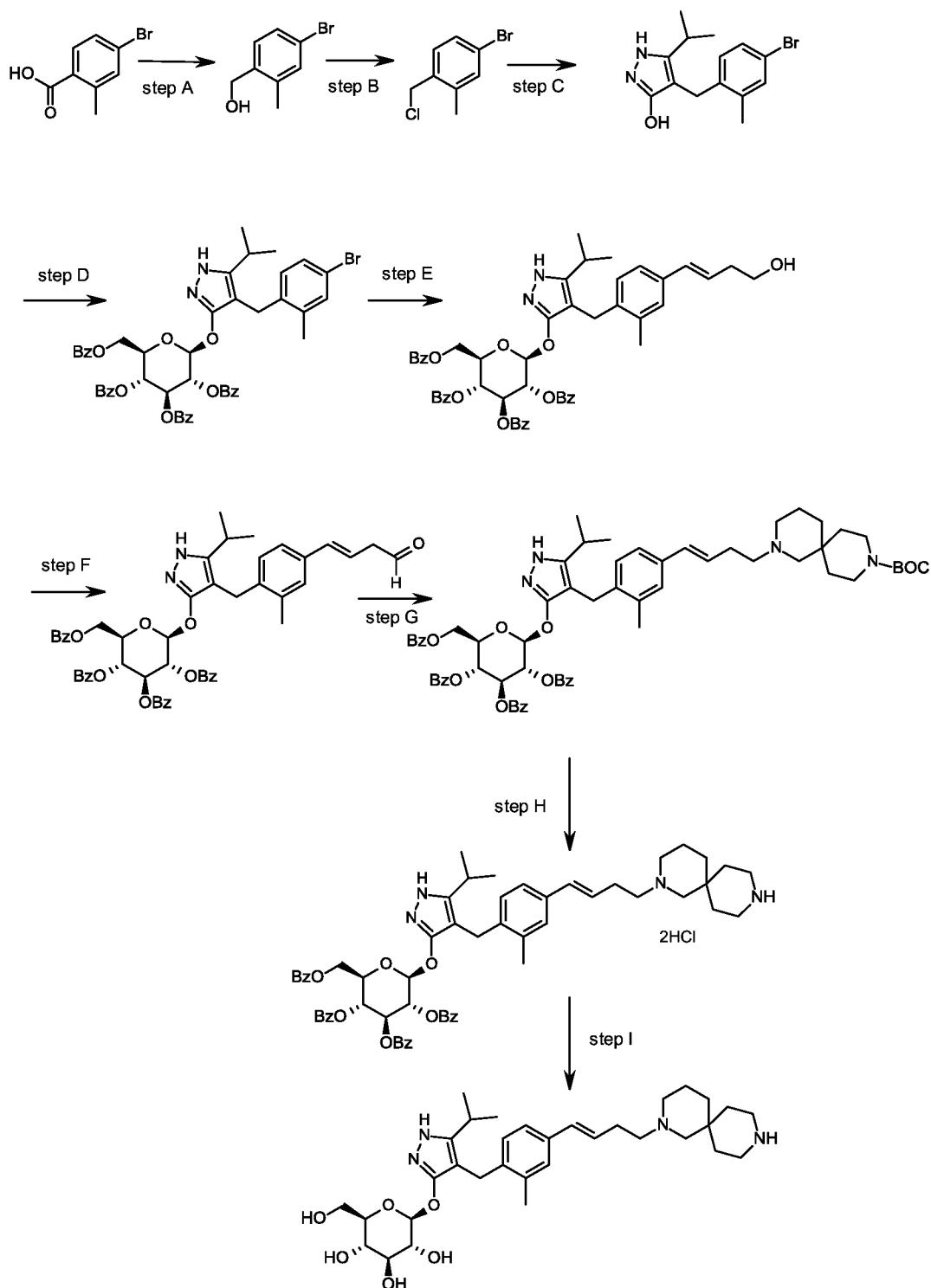
The term “Bz” refers to a benzoyl substituent of the following structure:



- 5 The term “BOC” refers to a t-butyloxycarbonyl protecting group.

-7-

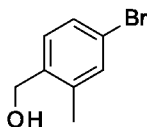
Scheme 1



-8-

Preparation 1

(4-bromo-2-methyl-phenyl)methanol



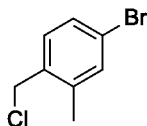
- 5 Scheme 1, step A: Add borane-tetrahydrofuran complex (0.2 mol, 200 mL, 1.0 M solution) to a solution of 4-bromo-2-methylbenzoic acid (39 g, 0.18 mol) in tetrahydrofuran (200 mL). After 18 hours at room temperature, remove the solvent under the reduced pressure to give a solid. Purify by flash chromatography to yield the title compound as a white solid (32.9 g, 0.16 mol). ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.55 (s, 1H), 2.28 (s, 10 3H), 4.61 (s, 2H), 7.18-7.29 (m, 3H).

Alternative synthesis of (4-bromo-2-methyl-phenyl)methanol.

- Borane-dimethyl sulfide complex (2M in THF; 116 mL, 0.232 mol) is added slowly to a solution of 4-bromo-2-methylbenzoic acid (24.3 g, 0.113 mol) in anhydrous 15 tetrahydrofuran (THF, 146 mL) at 3 °C. After stirring cold for 10 min the cooling bath is removed and the reaction is allowed to warm slowly to ambient temperature. After 1 hour, the solution is cooled to 5°C, and water (100 mL) is added slowly. Ethyl acetate (100 mL) is added and the phases are separated. The organic layer is washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution (200 mL) and dried over Na₂SO₄. Filtration and 20 concentration under reduced pressure gives a residue which is purified by filtration through a short pad of silica eluting with 15% ethyl acetate/iso-hexane to give the title compound (20.7 g, 91.2% yield). MS (m/z): 183/185 (M+1-18).

Preparation 2

- 25 4-bromo-1-chloromethyl-2-methyl-benzene



Scheme 1, step B: Add thionyl chloride (14.31 mL, 0.2 mol,) to a solution of (4-bromo-2-methyl-phenyl)methanol (32.9 g, 0.16 mol) in dichloromethane (200 mL) and

-9-

dimethylformamide (0.025 mol, 2.0 mL) at 0°C. After 1 hour at room temperature pour the mixture into ice-water (100 g), extract with dichloromethane (300 mL), wash extract with 5% aq. sodium bicarbonate (30 mL) and brine (200 mL), dry over sodium sulfate, and concentrate under reduced pressure to give the crude title compound as a white solid
5 (35.0 g, 0.16 mol). The material is used for the next step of reaction without further purification. ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.38 (s, 3H), 4.52 (s, 2H), 7.13-7.35 (m, 3H).

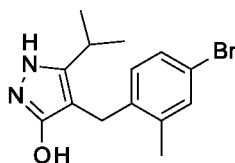
Alternative synthesis of 4-bromo-1-chloromethyl-2-methyl-benzene.

Methanesulfonyl chloride (6.83 mL, 88.3 mmol) is added slowly to a solution of (4-bromo-2-methyl-phenyl)methanol (16.14 g, 80.27 mmol) and triethylamine (16.78 mL;
10 120.4 mmol) in dichloromethane (80.7 mL) cooled in ice/water. The mixture is allowed to slowly warm to ambient temperature and is stirred for 16 hours. Further methanesulfonyl chloride (1.24 mL; 16.1 mmol) is added and the mixture is stirred at ambient temperature for 2 hours. Water (80 mL) is added and the phases are separated. The organic layer is washed with hydrochloric acid (1N; 80 mL) then saturated aqueous
15 sodium hydrogen carbonate solution (80 mL), then water (80 mL), and is dried over Na₂SO₄. Filtration and concentration under reduced pressure gives a residue which is purified by flash chromatography (eluting with hexane) to give the title compound (14.2 g; 80.5% yield). ¹H NMR (300.11 MHz, CDCl₃): δ 7.36-7.30 (m, 2H), 7.18 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 2.41 (s, 3H).

20

Preparation 3

4-[(4-bromo-2-methyl-phenyl)methyl]-5-isopropyl-1*H*-pyrazol-3-ol



Scheme 1, step C: Add sodium hydride (8.29 g, 0.21 mol, 60% dispersion in oil)
25 to a solution of methyl 4-methyl-3-oxovalerate (27.1 mL, 0.19 mol) in tetrahydrofuran at 0°C. After 30 min at room temperature, add a solution of 4-bromo-1-chloromethyl-2-methyl-benzene (35.0 g, 0.16 mol) in tetrahydrofuran (50 mL). Heat the resulting mixture at 70 °C overnight (18 hours). Add 1.0 M HCl (20 mL) to quench the reaction. Extract with ethyl acetate (200 mL), wash extract with water (200 mL) and brine (200

-10-

mL), dry over Na₂SO₄, filter and concentrate under reduced pressure. Dissolve the resulting residue in toluene (200 mL) and add hydrazine monohydrate (23.3 mL, 0.48 mol). Heat the mixture at 120 °C for 2 hours with a Dean-Stark apparatus to remove water. Cool and remove the solvent under the reduced pressure, dissolve the residue with
5 dichloromethane (50 mL) and methanol (50 mL). Pour this solution slowly to a beaker with water (250 mL). Collect the resulting precipitated product by vacuum filtration. Dry in vacuo in an oven overnight at 40 °C to yield the title compound as a solid (48.0 g, 0.16 mol). MS (m/z): 311.0 (M+1), 309.0 (M-1).

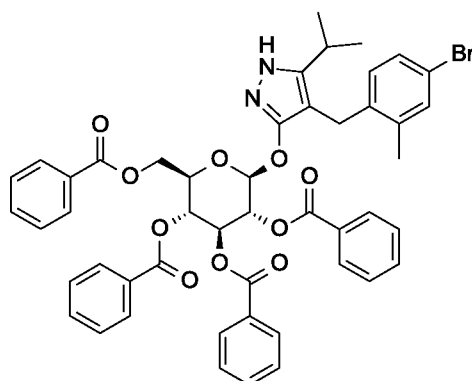
10 Alternative synthesis of 4-[(4-bromo-2-methyl-phenyl)methyl]-5-isopropyl-1H-pyrazol-3-ol.

A solution of 4-bromo-1-chloromethyl-2-methyl-benzene (13.16 g, 59.95 mmol) in acetonitrile (65.8 mL) is prepared. Potassium carbonate (24.86 g, 179.9 mmol), potassium iodide (11.94 g, 71.94 mmol) and methyl 4-methyl-3-oxovalerate (8.96 mL;
15 62.95 mmol) are added. The resulting mixture is stirred at ambient temperature for 20 hours. Hydrochloric acid (2N) is added to give pH 3. The solution is extracted with ethyl acetate (100 ml), the organic phase is washed with brine (100 ml) and dried over Na₂SO₄. The mixture is filtered and concentrated under reduced pressure. The residue is dissolved in toluene (65.8 mL) and hydrazine monohydrate (13.7 mL, 0.180 mol) is added. The
20 resulting mixture is heated to reflux and water is removed using a Dean and Stark apparatus. After 3 hours the mixture is cooled to 90 °C and additional hydrazine monohydrate (13.7 mL; 0.180 mol) is added and the mixture is heated to reflux for 1 hour. The mixture is cooled and concentrated under reduced pressure. The resulting solid is triturated with water (200 mL), filtered and dried in a vacuum oven over P₂O₅ at
25 60°C. The solid is triturated in iso-hexane (200 mL) and filtered to give the title compound (14.3 g; 77.1% yield). MS (m/z): 309/311 (M+1).

Preparation 4

4-(4-bromo-2-methylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-
30 beta-D-glucopyranoside

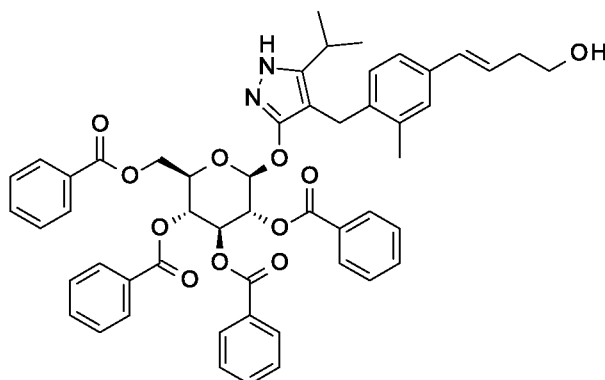
-11-



Scheme 1, step D: To a 1L flask, add 4-[(4-bromo-2-methyl-phenyl)methyl]-5-isopropyl-1*H*-pyrazol-3-ol (20 g, 64.7 mmol), alpha-D-glucopyranosyl bromide tetrabenzoate (50 g, 76 mmol), benzyltributylammonium chloride (6 g, 19.4 mmol),
 5 dichloromethane (500 mL), potassium carbonate (44.7 g, 323 mmol) and water (100 mL). Stir the reaction mixture overnight at room temperature. Extract with dichloromethane (500mL). Wash extract with water (300 mL) and brine (500 mL). Dry organic phase over sodium sulfate, filter, and concentrate under reduced pressure. Purify the residue by flash chromatography to yield the title compound (37 g, 64 mmol). MS (m/z): 889.2
 10 (M+1), 887.2 (M-1).

Preparation 5

4-{4-[(1*E*)-4-hydroxybut-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl
 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranoside



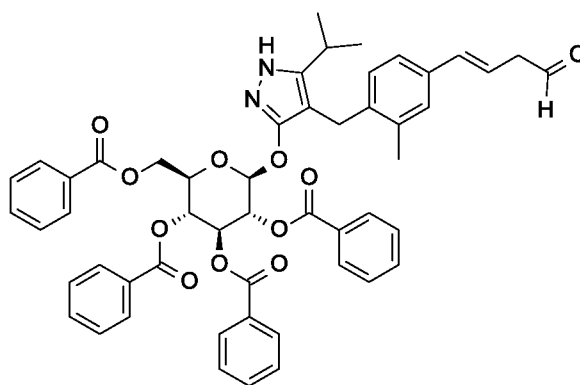
15 Scheme 1, step E: Add 3-buten-1-ol (0.58 mL, 6.8 mmol) to a solution of 4-(4-bromo-2-methylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranoside (3 g, 3.4 mmol) in acetonitrile (30 mL) and triethylamine (20 mL).

-12-

Degas the solution with nitrogen over 10 minutes. Add tri-*o*-tolylphosphine (205 mg, 0.67 mmol) and palladium acetate (76 mg, 0.34 mmol). Reflux at 90 °C for 2 hours. Cool to room temperature and concentrate to remove the solvent under the reduced pressure. Purify the residue by flash chromatography to yield the title compound (2.1 g, 2.4 mmol). MS (m/z): 878.4 (M+1).

Preparation 6

4-{4-[(1*E*)-4-oxybut-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl
2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-beta-D-glucopyranoside



10

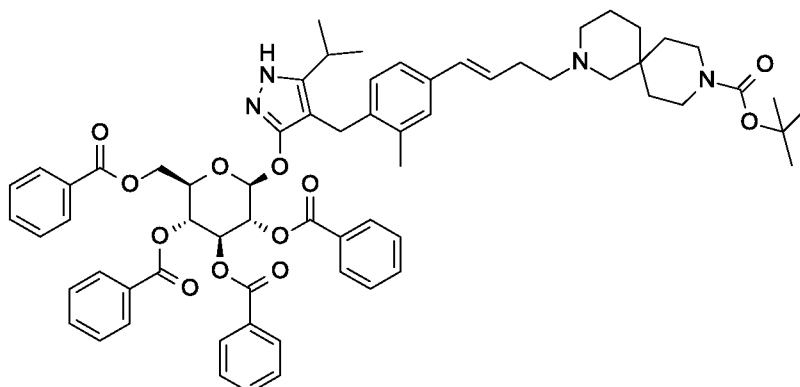
Scheme 1, step F: Add 3,3,3-triacetoxy-3-iodophthalide (134 mg, 0.96 mmol) to a solution of 4-{4-[(1*E*)-4-hydroxybut-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-beta-D-glucopyranoside (280 mg, 0.32 mmol) and sodium bicarbonate (133.8 mg, 1.6 mmol) in dichloromethane (20 mL) at 0 °C. After 15 minutes at room temperature, quench the reaction with saturated aqueous sodium thiosulfate (10 mL). Extract with dichloromethane (30 mL). Wash extract with water (30 mL) and brine (40 mL). Dry organic phase over sodium sulfate, filter, and concentrate under reduced pressure. Purify the resulting residue by flash chromatography to yield the title compound (270 mg, 0.31 mmol). MS (m/z): 876.5 (M+1), 874.5 (M-1).

20

Preparation 7

tert-butyl 2-{(3*E*)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl}methyl)phenyl]but-3-en-1-yl}-2,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate

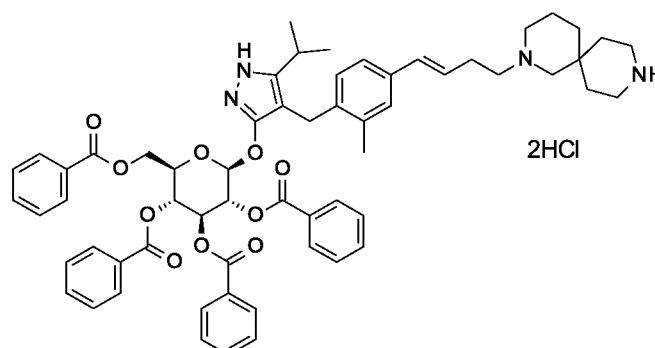
-13-



Scheme 1, step G: Add sodium triacetoxyborohydride (98 mg, 0.46 mmol) to a solution of 4-{4-[(1*E*)-4-oxybut-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-beta-D-glucopyranoside (270 mg, 0.31 mmol) and tert-butyl 2,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate hydrochloride (179 mg, 0.62 mmol) in 1,2-dichloroethane (5 mL). After 30 minutes at room temperature, quench the reaction with saturated aqueous sodium bicarbonate (10 mL). Extract with dichloromethane (30 mL). Wash extract with water (30 mL) and brine (40 mL), dry organic phase over sodium sulfate, filter and concentrate under reduced pressure. Purify the resulting residue by flash chromatography to yield the title compound (275 mg, 0.25 mmol). MS (*m/z*): 1115.6 (*M*+1).

Preparation 8

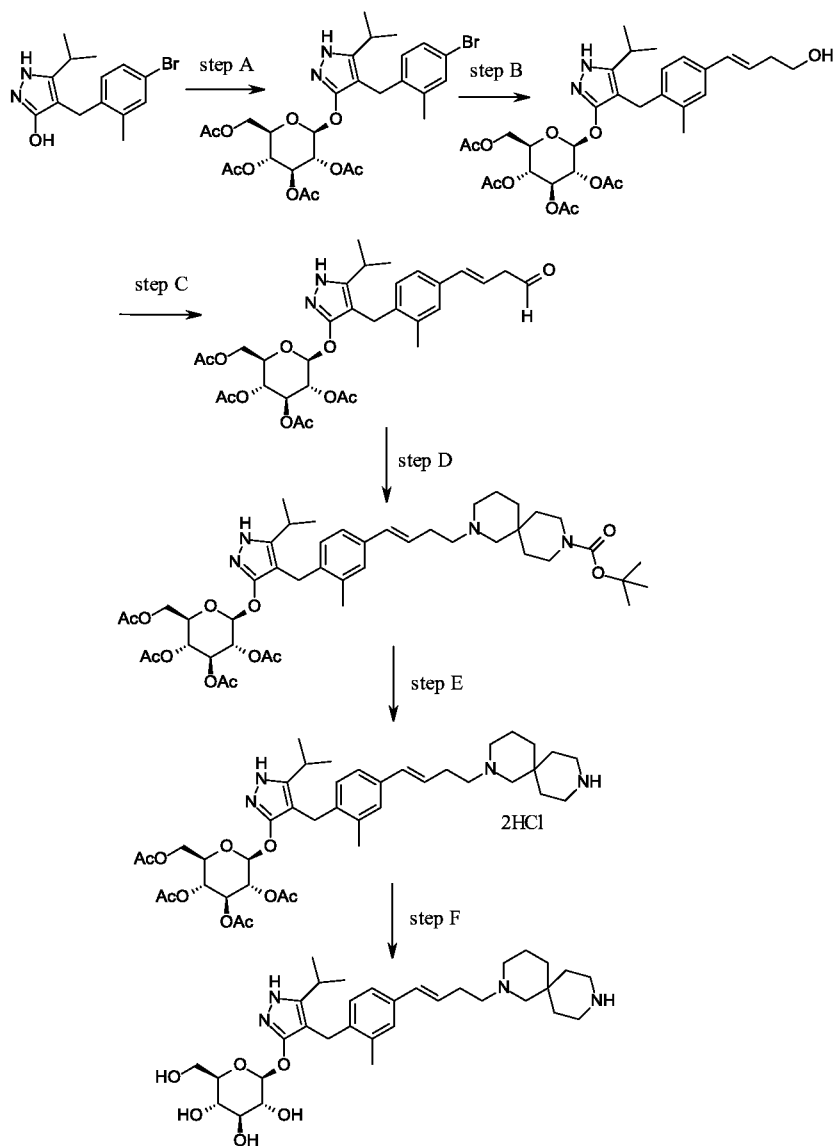
4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-beta-D-glucopyranoside dihydrochloride



-14-

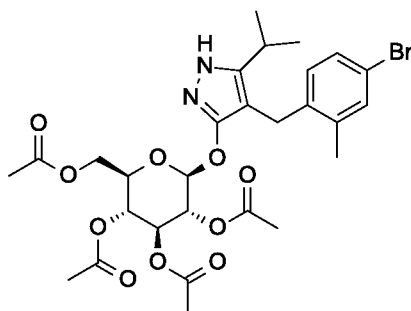
Scheme 1, step H: Add hydrogen chloride (4.0 M solution in 1,4-dioxane, 0.6 mL, 2.4 mmol) to a solution of tert-butyl 2-{{(3*E*)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl}methyl)phenyl]but-3-en-1-yl}-2,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate (275 mg, 0.25 mmol) in dichloromethane (5 mL). After overnight (18 hours) at room temperature, concentrate to remove the solvent under reduced pressure to yield the title compound as a solid (258 mg, 0.24 mmol). MS (m/z): 1015.6 (M+1).

-15-

Scheme 2Preparation 9

- 5 4-(4-bromo-2-methylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopyranoside.

-16-



Scheme 2, step A: To a 1 L flask, add 4-[(4-bromo-2-methyl-phenyl)methyl]-5-isopropyl-1*H*-pyrazol-3-ol (24 g, 77.6 mmol), 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide (50.4 g, 116 mmol), benzyltributylammonium chloride (5 g, 15.5 mmol), dichloromethane (250 mL), potassium carbonate (32 g, 323 mmol) and water (120 mL). Stir the reaction mixture overnight at room temperature. Extract with dichloromethane (450 mL). Wash extract with water (300 mL) and brine (500 mL). Dry organic phase over sodium sulfate, filter, and concentrate under reduced pressure. Purify the resulting residue by flash chromatography to yield the title compound (36.5 g, 57 mmol). MS (*m/z*): 638.5 (*M*+1), 636.5 (*M*-1).

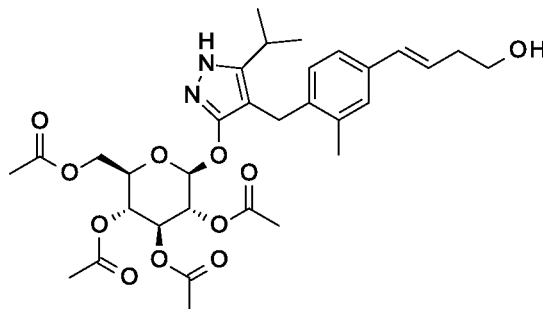
Alternative synthesis of 4-(4-bromo-2-methylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside.

Reagents 4-[(4-bromo-2-methyl-phenyl)methyl]-5-isopropyl-1*H*-pyrazol-3-ol (24.0 g, 77.6 mmol), 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide (50.4 g, 116 mmol), benzyltributylammonium chloride (4.94 g, 15.52 mmol), potassium carbonate (32.18 g, 232.9 mmol), dichloromethane (250 mL) and water (120 mL) are combined and the mixture is stirred at ambient temperature for 18 hours. The mixture is partitioned between dichloromethane (250 mL) and water (250 mL). The organic phase is washed with brine (250 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The resulting residue is purified by flash chromatography (eluting with 10% ethyl acetate in dichloromethane to 70% ethyl acetate in dichloromethane) to give the title compound (36.5 g, 74% yield). MS (*m/z*): 639/641 (*M*+1).

-17-

Preparation 10

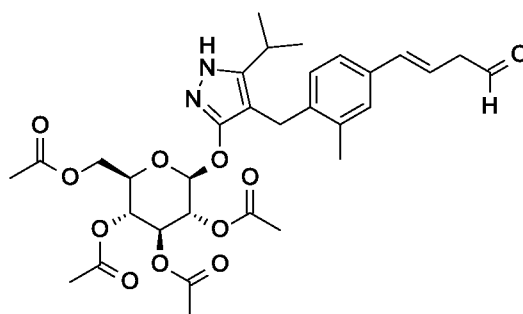
4-{4-[(1*E*)-4-hydroxybut-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl
2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-beta-D-glucopyranoside



- 5 Scheme 2, step B: Add 3-buten-1-ol (6.1 mL, 70 mmol) to a solution of 4-(4-bromo-2-methylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-beta-D-glucopyranoside (15 g, 23.5 mmol) in acetonitrile (200 mL) and triethylamine (50 mL). Degas the solution with nitrogen over 10 minutes. Add tri-*o*-tolylphosphine (1.43 g, 4.7 mmol) and palladium acetate (526 mg, 2.35 mmol). After refluxing at 90 °C for 2 hours,
- 10 cool, and concentrate to remove the solvent under the reduced pressure. Purify the resulting residue by flash chromatography to yield the title compound (7.5 g, 11.9 mmol). MS (*m/z*): 631.2 (*M*+1), 629.2 (*M*-1).

Preparation 11

- 15 4-{4-[(1*E*)-4-oxybut-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl
2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-beta-D-glucopyranoside



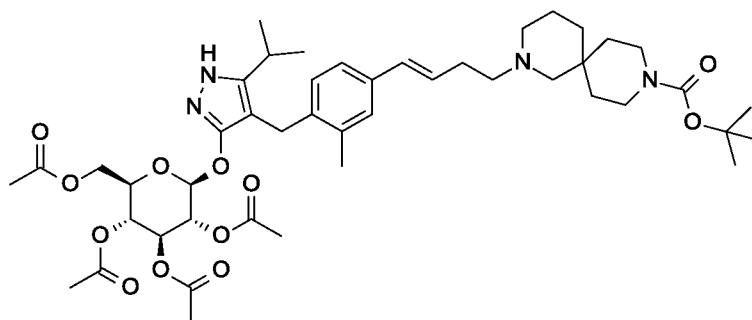
- Scheme 2, step C: Add 3,3,3-triacetoxy-3-iodophthalide (2.1 g, 4.76 mmol) to a solution of 4-{4-[(1*E*)-4-hydroxybut-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-beta-D-glucopyranoside (1.5 g, 2.38 mmol) and
- 20

-18-

sodium bicarbonate (2 g, 23.8 mmol) in dichloromethane (50 mL) at 0 °C. After 15 minutes at room temperature, quench the reaction with saturated aqueous sodium thiosulfate (10 mL). Extract with dichloromethane (30 mL), wash extract with water (30 mL) and brine (40 mL). Dry organic phase over sodium sulfate, filter, and concentrate under reduced pressure. Purify the resulting residue by flash chromatography to yield the title compound (0.95 g, 1.51 mmol). MS (m/z): 628.8(M+1), 626.8 (M-1).

Preparation 12a

tert-butyl 2-{{(3*E*)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl}methyl)phenyl]but-3-en-1-yl}-2,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate

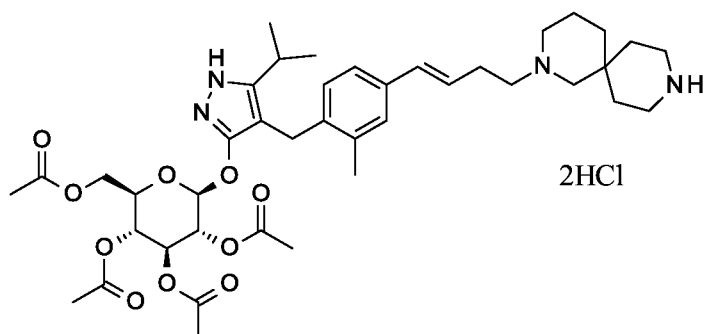


Scheme 2, Step D: Add sodium triacetoxyborohydride (303 mg, 1.4 mmol) to a solution of 4-{4-[(1*E*)-4-oxybut-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-beta-D-glucopyranoside (600 mg, 0.95 mmol) and tert-butyl 2,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate hydrochloride (333 mg, 1.2 mmol) in 1,2-dichloroethane (30 mL). After 30 minutes at room temperature, quench the reaction with saturated aqueous sodium bicarbonate (15 mL). Extract with dichloromethane (60 mL). Wash extract with water (30 mL) and brine (60 mL). Dry organic phase over sodium sulfate, filter, and concentrate under reduced pressure. Purify the resulting residue by flash chromatography to yield the title compound (500 mg, 0.58 mmol). MS (m/z): 866.8, 867.8 (M+1), 864.8, 865.8 (M-1).

Preparation 13

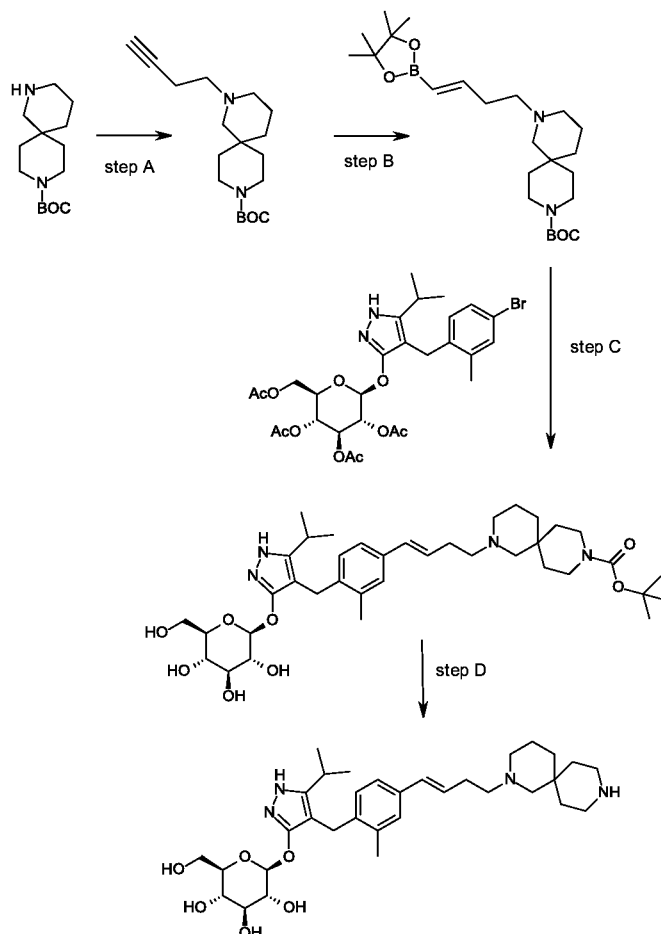
4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-beta-D-glucopyranoside dihydrochloride

-19-

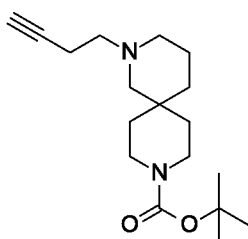


Scheme 2, step E: Add hydrogen chloride (4.0 M solution in 1,4-dioxane, 1.5 mL, 5.8 mmol) to a solution of tert-butyl 2-((3*E*)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl}methyl)phenyl]but-3-en-1-yl)-2,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate (500 mg, 0.58 mmol) in dichloromethane (20 mL). After 2 hours at room temperature, concentrate to remove the solvent under reduced pressure to yield the title compound as a solid (480 mg, 0.57 mmol). MS (*m/z*): 767.4 (*M*+1).

-20-

Scheme 3Preparation 14

tert-butyl 4-but-3-ynyl-4,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate



5

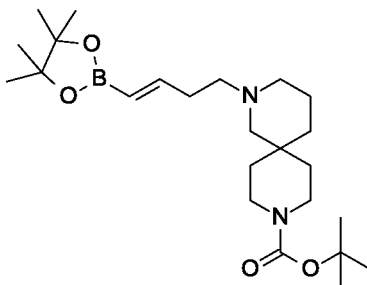
Scheme 3, step A: Cesium carbonate (46.66 g, 143.21 mmol) is added to a suspension of tert-butyl 4,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate hydrochloride (16.66 g, 57.28 mmoles) in acetonitrile (167 mL). The mixture is stirred for 10 minutes at ambient temperature then 4-bromobutyne (6.45 mL, 68.74 mmol) is added. The reaction is heated to reflux and stirred for 18 hours. The mixture is cooled and concentrated under

-21-

reduced pressure. The residue is partitioned between water (200 mL) and ethyl acetate (150 mL). The phases are separated and the aqueous layer is extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic layers are washed with water (200 mL), then brine (150 mL), dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to give the title compound (17.2 g, 98% yield). ¹H NMR (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).

Preparation 15

tert-butyl 4-[(*E*)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)but-3-enyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate

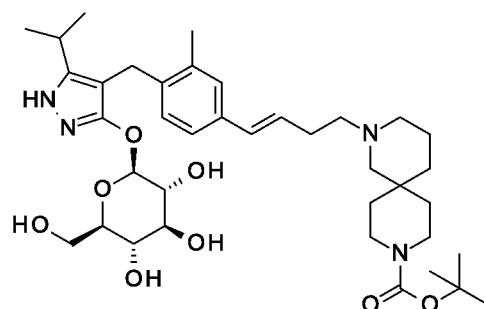


Scheme 3, step B: Triethylamine (5.62 mmol; 0.783 mL), 4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane (8.56 mL, 59.0 mmol) and zirconocene chloride (1.45 g, 5.62 mmol) are added to tert-butyl 4-but-3-enyl-4,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate (17.21 g, 56.16 mmol). The resulting mixture is heated to 65 °C for 3.5 hours. The mixture is cooled and dissolved in dichloromethane (150 mL). The resulting solution is passed through a ~4cm thick pad of silica gel, eluting with dichloromethane (2 x 200 mL). The filtrate is concentrated under reduced pressure to give the title compound (21.2 g, 87% yield). ¹H NMR (300.11 MHz, CDCl₃): 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).

Preparation 16

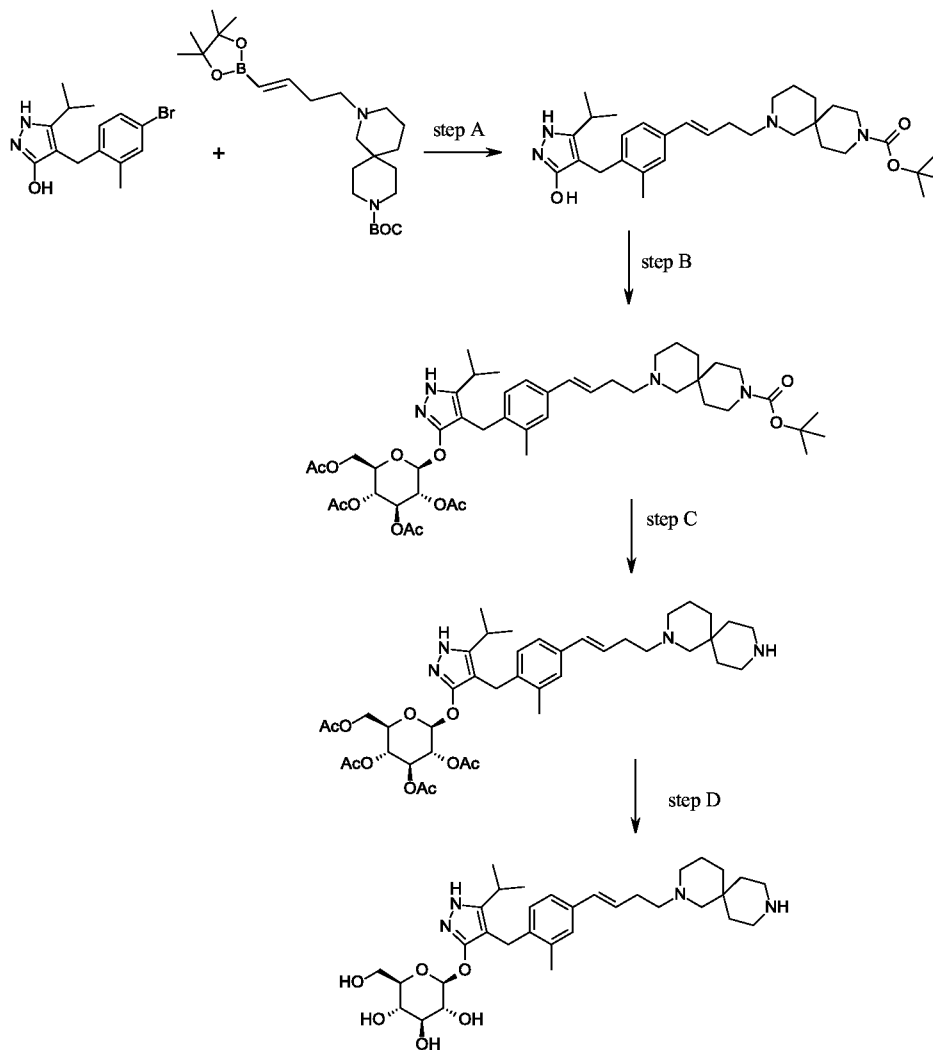
tert-butyl 2-[(3*E*)-4-[3-methyl-4-[(5-(propan-2-yl)-3-β-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl]methyl]phenyl]but-3-en-1-yl]-2,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate

-22-



- Scheme 3, step C: A solution of 4-(4-bromo-2-methylbenzyl)-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-beta-D-glucopyranoside (20 g, 31.3 mmol), tert-butyl 4-[(*E*)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)but-3-enyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate (16.3 g, 37.5 mmol) and potassium carbonate (12.97 g, 93.82 mmol) in tetrahydrofuran (200 mL) and water (40 mL) is degassed for 15 min by bubbling nitrogen gas through it. Pd(OAc)₂ (140 mg, 625 μmol) and 2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-tri-*i*-propyl-1,1'-biphenyl (0.596 g, 1.25 mmol) are added and the reaction is heated to reflux for 16 h. The solution is cooled to ambient temperature and methanol (200 mL) is added. After 30 minutes the solvent is removed under reduced pressure. The mixture is partitioned between ethyl acetate (500 mL) and brine (500 mL) adding aqueous MgSO₄ (1M; 500 mL) to aid the phase separation. The layers are separated and the organic layer is dried over MgSO₄ and filtered through a 10 cm pad of silica gel, eluting with ethyl acetate (~1.5 L). The filtrate is discarded and the silica pad is flushed with 5% MeOH in THF (2 L). The methanolic filtrate is concentrated under reduced pressure to give the title compound (20.1 g, 92%).
- MS (*m/z*): 699 (*M*+1).

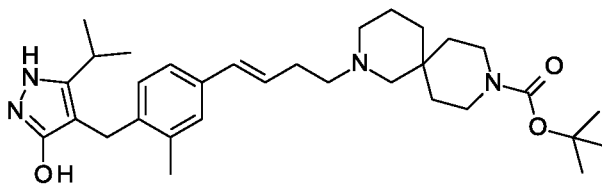
-23-

Scheme 4

5

Preparation 17

tert-butyl 4-[(E)-4-[4-[(3-hydroxy-5-isopropyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-3-methylphenyl]but-3-enyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate



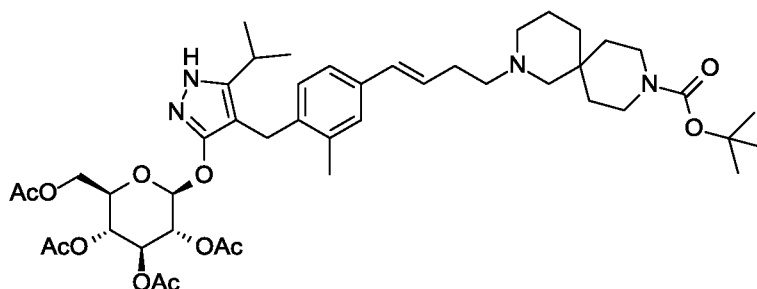
-24-

Scheme 4, step A: Add tert-butyl 4-[(*E*)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)but-3-enyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate (35.8 kg, 82.4 mol) in methanol (130 L) to a solution of (4-[(4-bromo-2-methyl-phenyl)methyl]-5-isopropyl-1*H*-pyrazol-3-ol (23.9 kg, 77.3 mol) in methanol (440 L) at room temperature.

- 5 Add water (590 L) and tripotassium phosphate (100 kg, 471.7 mol) and place the reaction under nitrogen atmosphere. To the stirring solution, add a suspension of tris(dibenzylideneacetone) dipalladium (1.42 kg, 1.55 mol) and di-tert-butylmethylphosphonium tetrafluoroborate (775 g, 3.12 mol) in methanol (15 L). The resulting mixture is heated at 75 °C for 2 hours. Cool the mixture and filter over
- 10 diatomaceous earth. Rinse the the filter cake with methanol (60 L), and concentrate the filtrate under reduced pressure. Add ethyl acetate (300 L), separate the layers, and wash the organic layer with 15% brine (3 x 120 L). Concentrate the organic layer under reduced pressure, add ethyl acetate (300 L), and stir the mixture for 18 to 20 hours. Add heptane (300 L), cool the mixture to 10 °C, and stir the mixture for an additional 18 to 20
- 15 hours. Collect the resulting solids by filtration, rinse the cake with ethyl acetate/heptane (2:3, 2 x 90 L), and dry under vacuum at 40°C to give the title compound (29.3 kg, 70.6% yield) as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): 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, 3 H), 3.33 (s, 3H), 2.85-2.75 (m, 1H), 2.49-2.40 (m, 5 H),
- 20 2.33 (s, 3H), 1.68-1.62 (m, 2H), 1.60-1.36 (m, 15H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H).

Preparation 12b

- Alternative preparation of tert-butyl 2-[(3*E*)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1*H*-pyrazol-4-yl}methyl)phenyl]but-3-en-1-yl]-2,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate.
- 25

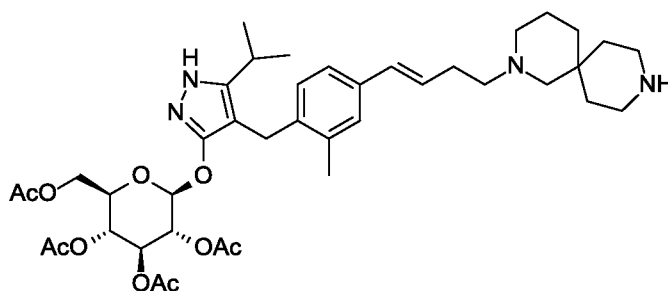


-25-

Scheme 4, step B: Combine tert-butyl 4-[(E)-4-[4-[(3-hydroxy-5-isopropyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-3-methyl-phenyl]but-3-enyl]-4,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate (17.83 kg, 33.2 moles), acetonitrile (180 L), and benzyltributylammonium chloride (1.52 kg, 4.87 moles) at room temperature. Slowly add potassium carbonate (27.6 kg, 199.7 moles) and stir the mixture for 2 hours. Add 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-alpha-D-glucopyranosyl bromide (24.9 kg, 60.55 mol), warm the reaction mixture to 30°C and stir for 18 hours. Concentrate the mixture under reduced pressure and add ethyl acetate (180 L), followed by water (90 L). Separate the layers, wash the organic phase with 15% brine (3 x 90 L), concentrate the mixture, and purify using column chromatography over silica gel (63 kg, ethyl acetate/heptanes as eluent (1:2→1:0)) to provide the title compound (19.8 kg, 94% purity, 68.8% yield) as a yellow foam. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.13 (s, 1H), 7.03 (d, J= 8.0 Hz, 1H), 6.78 (d, J= 8.0 Hz, 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, 18 H), 1.82 (s, 3H), 1.62-0.82 (m, 22H).

Preparation 18

2-[(3E)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1H-pyrazol-4-yl}methyl)phenyl]but-3-en-1-yl]-2,9-diazaspiro[5.5]undecane



Scheme 4, step C: Combine tert-butyl 2-[(3E)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1H-pyrazol-4-yl}methyl)phenyl]but-3-en-1-yl]-2,9-diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate (19.6 kg, 22.6 moles) with dichloromethane (120 L) and cool to 0°C. Slowly add trifluoroacetic

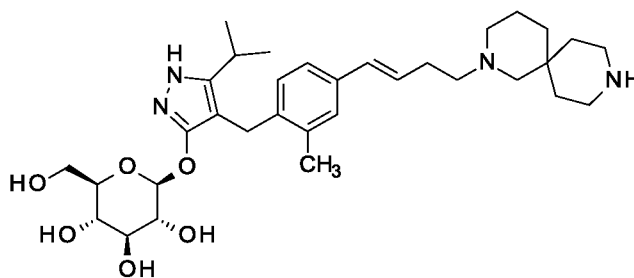
-26-

acid (34.6 L, 51.6 kg, 452 moles) and stir for 9 hours. Quench the reaction with ice water (80 L), and add ammonium hydroxide (85-90 L) to adjust the reaction mixture to pH (8-9). Add dichloromethane (120 L), warm the reaction mixture to room temperature, and separate the layers. Wash the organic layer with water (75 L), brine, and concentrate under reduced pressure to provide the title compound (16.2 kg, 95.0% purity, 93% yield) as a yellow solid. 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, 5 H), 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).

Example 1

Hydrated crystalline 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside acetate

First alternative preparation of 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside (free base).

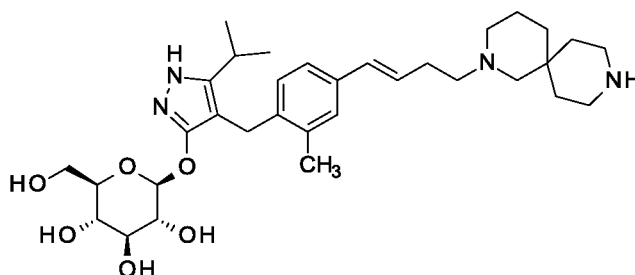


Scheme 1, step I: Add sodium hydroxide (0.5 mL, 0.5 mmol, 1.0 M solution) to a solution of 4-{4-[(1*E*)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-beta-D-glucopyranoside dihydrochloride (258 mg, 0.24 mmol) in methanol (2 mL). After 2 hours at 40°C, concentrate to remove the solvent under reduced pressure to give a residue, which is purified by preparative HPLC method: high pH, 25% B for 4 min, 25-40 B % for 4 min @ 85 mL/min using a 30 x 75 mm, 5 μm C18XBridge ODB column, solvent A – H₂O

-27-

with NH_4HCO_3 @ pH 10, solvent B – MeCN to yield the title compound (free base) as a solid (46 mg, 0.08 mmol). MS (m/z): 598.8 (M+1), 596.8 (M-1).

5 Second alternative preparation of 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside (free base).



Scheme 2, step F: Add methanol (5 mL), triethylamine (3 mL), and water (3 mL) to 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopyranoside dihydrochloride (480 mg, 0.24 mmol). After 18 hours (overnight) at room temperature, concentrate to dryness under reduced pressure. Purify the resulting residue by preparative HPLC method: high pH, 25% B for 4 min, 25-40 B % for 4 min @ 85 mL/min using a 30 x 75 mm, 5 μm C18XBridge ODB column, solvent A – H_2O with NH_4HCO_3 @ pH 10, solvent B – MeCN to yield the title compound (free base) as a solid (50 mg, 0.08 mmol). MS (m/z): 598.8 (M+1), 596.8 (M-1). ^1H NMR (400.31 MHz, CD_3OD): 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 Hz, 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 (broad s, 2H), 1.59 (m, 2H), 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).

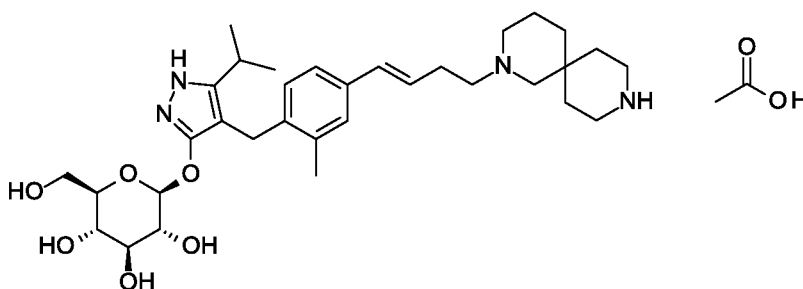
25 Third alternative preparation of 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside.

Scheme 3, step D: Trifluoroacetic acid (32.2 mL; 0.426 mol) is added to a solution of tert-butyl 2-{(3E)-4-[3-methyl-4-({5-(propan-2-yl)-3-beta-D-glucopyranosyl)oxy]-1H-pyrazol-4-yl}methyl]phenyl]but-3-en-1-yl}-2,9-

-28-

diazaspiro[5.5]undecane-9-carboxylate (14.87 g; 21.28 mmol) in dichloromethane (149 mL) cooled in iced water. The solution is allowed to warm to room temperature. After 30 minutes, the mixture is slowly added to ammonia in MeOH (2M; 300 mL), applying cooling as necessary to maintain a constant temperature. The solution is stirred at room temperature for 15 min. The mixture is concentrated under reduced pressure and the residue is purified using SCX-2 resin. The basic filtrate is concentrated under reduced pressure and the residue is triturated/sonicated in ethyl acetate, filtered and dried. The resulting solid is dissolved in MeOH (200mL) and concentrated in vacuo. This is repeated several times to give the title compound (free base) (12.22 g, yield 96%). MS (m/z): 599 (M+1); $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ (C=0.2, MeOH).

Preparation of final title compound, hydrated crystalline 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside acetate.



15

4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside (902 mg) is placed in a round bottom flask (100 mL) and treated with wet ethyl acetate (18 mL). [Note - wet ethyl acetate is prepared by mixing ethyl acetate (100 mL) and dionized water (100 mL). After mixing, the layers are allowed to separate, and the top wet ethyl acetate layer is removed for use. Acetic acid is a hydrolysis product of ethyl acetate and is present in wet ethyl acetate.] The compound dissolves, although not completely as wet ethyl acetate is added. After several minutes, a white precipitate forms. An additional amount of wet ethyl acetate (2 mL) is added to dissolve remaining compound. The solution is allowed to stir uncovered overnight at room temperature during which time the solvent partially evaporates. The remaining solvent from the product slurry is removed under vacuum,

25

and the resulting solid is dried under a stream of nitrogen to provide the final title compound as a crystalline solid. A small amount of amorphous material is identified in the product by solid-state NMR. This crystalline final title compound may be used as seed crystals to prepare additional crystalline final title compound.

5

Alternative preparation of final title compound, hydrated crystalline 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside acetate.

Under a nitrogen atmosphere combine of 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-glucopyranoside (2.1 kg, 2.74 mol), methanol (4.4 L), tetrahydrofuran (4.2 L), and water (210 mL). Add potassium carbonate (460 g, 3.33 moles) and stir for four to six hours, then filter the reaction mixture to remove the solids. Concentrate the filtrate under reduced pressure, then add ethanol (9.0 L) followed by acetic acid (237 mL, 4.13 mol) and stir at room temperature for one hour. To the stirring solution add wet ethyl acetate (10 L, containing approx. 3 w/w% water) slowly over five hours, followed by water (500 mL). Stir the suspension for twelve hours and add wet ethyl acetate (4.95 L, containing approx. 3 w/w% water) over a period of eight hours. Stir the suspension for twelve hours and add additional wet ethyl acetate (11.5 L, containing approx. 3 w/w% water) slowly over sixteen hours. Stir the suspension for twelve hours, collect the solids by filtration and rinse the solids with wet ethyl acetate (3.3 L, containing approx. 3 w/w% water). Dry in an oven under reduced pressure below 30°C to give the title compound as an off-white crystalline solid (1.55 kg, 2.35 mol, 96.7% purity, 72.4 w/w% potency, 68.0% yield based on potency). HRMS (m/z): 599.3798 (M+1).

25

X-Ray Powder Diffraction (XRD)

The XRD patterns of the crystalline solids are obtained on a Bruker D8 Advance X-ray powder diffractometer, equipped with a CuK α source ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) and a Linxeye detector, operating at 40 kV and 40 mA. The sample is scanned between 4 and 40° in 2-theta, with a step size of 0.0084° in 2-theta and a scan rate of 0.5 seconds/step, and with a 0.2 mm divergence slit. The dry powder is packed on a low background silica sample holder and a smooth surface is obtained using a glass slide. The crystal form

30

diffraction patterns are collected at 22°C and a relative humidity of 42%. It is well known in the crystallography art that, for any given crystal form, the relative intensities of the diffraction peaks may vary due to preferred orientation resulting from certain factors, such as crystal morphology. Where the effects of preferred orientation are present, peak intensities are altered, but the characteristic peak positions of the polymorph are unchanged. See, *e.g.*, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995. Furthermore, it is also well known in the crystallography art that for any given crystal form the angular peak positions may vary slightly. For example, peak positions can shift due to a variation in the temperature or humidity at which a sample is analyzed, sample displacement, or the presence or absence of an internal standard. In the present case, a peak position variability of ± 0.2 in 2-theta will take into account these potential variations without hindering the unequivocal identification of the indicated crystal form. Confirmation of a crystal form may be made based on any unique combination of distinguishing peaks (in units of ° 2-theta), typically the more prominent peaks. The crystal form diffraction patterns, collected at ambient temperature and relative humidity, are adjusted based on National Bureau of Standards (NBS) 675 standard peaks at 8.853 and 26.774 degrees 2-theta.

A prepared sample of hydrated crystalline 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside acetate is characterized by an XRD pattern using CuK α radiation as having diffraction peaks (2-theta values) as described in Table 1 below, and in particular having peaks at 5.2° in combination with one or more of the peaks selected from the group consisting of 7.8°, 8.0°, and 10.7° ($\pm 0.2^\circ$ respectively).

X-ray powder diffraction peaks of hydrated crystalline 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside acetate.

Table 1

Peak	Angle (°2-Theta) +/- 0.2°	Relative Intensity (% of most intense peak)
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

¹³C Solid State NMR (¹³C ssNMR)

¹³C Cross polarization/magic angle spinning NMR (solid-state NMR or ssNMR) spectra were obtained using a Bruker Avance II 400 MHz NMR spectrometer operating at a carbon frequency of 100.622 MHz and proton frequency of 400.131 MHz and equipped with a Bruker 4mm double resonance probe. TOSS sideband suppression is used along with cross polarization employing SPINAL64 decoupling and a RAMP100 shaped H-nucleus CP pulse. Acquisition parameters are as follows: 90° proton r.f. pulse width of 2.6 μs, contact time was 2.0 ms, pulse repetition time of 3 s, MAS frequency of 10 kHz, spectral width of 30 kHz, acquisition time is 34 ms and the number of scans was 18,661. Chemical shifts are referenced to adamantane (δ = 29.5 ppm) in a separate experiment.

Representative ¹³C ssNMR resonances for hydrated crystalline 4-{4-[(1E)-4-(2,9-diazaspiro[5.5]undec-2-yl)but-1-en-1-yl]-2-methylbenzyl}-5-(propan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl beta-D-glucopyranoside acetate include: 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, and 16.9 ppm ($\pm$ 0.2 ppm respectively).

Sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1) and SGLT2 assays

5 The cDNA encoding human SGLT1 (*slc5a1*, NM_000343), human SGLT2 (*slc5a2*, NM_003041) and mouse SGLT1 (*slc5a1*, NM_019810.4) are purchased from Openbiosystems, Invitrogen and Openbiosystems, respectively. The cDNA is cloned into pcDNA3.1+ for mammalian expression and is stably transfected into Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells using standard mammalian transfection procedures. An SGLT-
10 expressing sub-clone of each over-expressing cell line is selected based on resistance to neomycin (Geneticin, Invitrogen) and activity in the ^{14}C - α -methyl-D-glucopyranoside (^{14}C -AMG) uptake assay (see below). Stable SGLT-expressing cells are maintained using standard cell culture techniques.

 The SGLT activity is measured as sodium-dependent ^{14}C -AMG uptake in the
15 above cell lines described as follows. One hundred μL of culture medium containing 30,000 cells are seeded to each well of a 96-well BioCoat poly-D-lysine plate (Becton Dickson) and cultured at 37°C overnight. The culture medium is aspirated and cells are washed twice with 200 μL of Reaction Buffer (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , MgCl_2 , and 14 mM N-2-hydroethylpiperrazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes), pH
20 7.5). The excess buffer is tapped out onto paper towels. Thirty-five μL of Reaction Buffer are added to each well. Five μL of a 10% dimethylsulfoxide (DMSO) in Reaction Buffer containing varying concentrations of test compound or no compound as a control, is dispensed into the each well. The reaction is initiated by adding 10 μL of ^{14}C -AMG in Reaction Buffer to make a final concentration of 4 μM . The plate is incubated at 37°C for
25 125 minutes. The reaction is terminated by aspirating off Reaction Buffer and then washed three times with 200 μL of ice cold Reaction Buffer. Manual aspiration is applied to ensure the complete removal of Reaction Buffer. Ten μL of 0.1 N NaOH is added to each well and then 100 μL of Supermix scintillation cocktail (PerkinElmer) is added. After mixing, the scintillation signal in the plate is counted in a MicroBeta
30 (PerkinElmer). A ten-dose response curve is fitted to an empirical four-parameter model using ActivityBase (ID Business Solution) to determine the inhibitor concentration at

half-maximal inhibition (IC_{50}). The free base of Example 1 is tested essentially as described above.

Table 2: *In vitro* potency of free base of Example 1 against SGLT1 and SGLT2

Test Compound	Human SGLT1 IC_{50} , nM	Human SGLT2 IC_{50} , nM	Mouse SGLT1 IC_{50} , nM
Example 1 (free base)	26 ± 20 (n=10)	6100 ± 1200 (n=10)	10 ± 2 (n=9)

5

More specifically, the data in Table 2 demonstrate that the free base of Example 1 inhibits human and mouse SGLT1 *in vitro*, and is more potent at human and mouse SGLT1 than at human SGLT2 *in vitro*.

10

Glucose Lowering Effects in Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

The test compound is formulated by adding a vehicle of 1% hydroxyethylcellulose, 0.25% Tween® 80 w/ antifoam 0.05% to preweighed test compound to make a 1mg/ml solution. The mixture is probe sonicated for approximately 30 seconds. The resulting solution is used as a stock solution from which the lower concentration dose solutions are prepared by dilution with the vehicle.

15

Single housed C57Bl/6 mice are fasted overnight by removing access to food the late afternoon before test day. The following morning, the mice are weighed and a single fasting blood sample is taken by tail snip to measure glucose by glucometer (Roche AccuChek). Study groups (n=5) are determined based on fasted blood glucose and comprise preferably animals in the range of 80-100 mg/dl glucose.

20

After grouping, the first mouse is orally gavaged with 10 ml/kg test compound preparation and a timer started. Each subsequent animal is dosed a minute and a half apart. Three hours after the first compound treatment is started, a baseline blood sample is taken for measuring glucose (from the first animal, via tail snip). The animal is then immediately given an oral dose of 50% dextrose (Hospira) at 3 g/kg. Blood samples are taken for glucose, exactly a minute and half apart, by tail vein so that blood is collected in each animal at 20, 40, 60 and 120 minutes after the dextrose dose.

25

Table 3. Glucose lowering effects in OGTT.

Oral Glucose Tolerance Test Results Mean $\pm$ SE					
2 way ANOVA/ Bonferroni's **p<0.01, ***p<0.001 compared to vehicle					
	Vehicle	Example 1 (free base) 0.3 mg/kg	Example 1 (free base) 1 mg/kg	Example 1 (free base) 3 mg/kg	Example 1 (free base) 10 mg/kg
Glucose (mg/dl)					
0 Minute	84 $\pm$ 8.4	78 $\pm$ 4.2	76 $\pm$ 3.3	72 $\pm$ 2.6	78 $\pm$ 5.4
20 Minute	268 $\pm$ 49.3	185 $\pm$ 13.7***	147 $\pm$ 8.3***	133 $\pm$ 7.1***	124 $\pm$ 1.2***
40 Minute	192 $\pm$ 26.8	197 $\pm$ 14.7	171 $\pm$ 11.1	150 $\pm$ 7.5	137 $\pm$ 5.4**
60 Minute	139 $\pm$ 6.2	164 $\pm$ 6.3	162 $\pm$ 5.8	155 $\pm$ 7.2	138 $\pm$ 6.1
120 Minute	105 $\pm$ 5.1	121 $\pm$ 11.8	109 $\pm$ 7.3	115 $\pm$ 10	114 $\pm$ 4.3
1 way ANOVA/ Dunnett's *p<0.05, **p<0.01, compared to vehicle					
Baseline Adjusted AUC	6408 $\pm$ 1500	5400 $\pm$ 519	4158 $\pm$ 374	3606 $\pm$ 421*	2693 $\pm$ 309**
Glucose (mg/dl)					
Glucose Cmax	268 $\pm$ 49.3	199 $\pm$ 14.1	174 $\pm$ 9.38**	161 $\pm$ 5.00**	141 $\pm$ 5.67**
Time (minutes)					
Glucose Tmax	20 $\pm$ 0	32 $\pm$ 5	48 $\pm$ 5	64 $\pm$ 13**	44 $\pm$ 7

As shown above in Table 3, the free base of Example 1 delivers a dose dependent decrease in the glucose excursion following an oral bolus of 50% dextrose (Hospira®) in the normal glycemic C57Bl/6 mouse. The free base of Example 1 also demonstrates a dose dependent decrease in baseline adjusted glucose area under the curve (AUC) during an OGTT. In addition, the free base of example 1 dose dependently decreases the average maximum concentration of plasma glucose (Cmax) during the OGTT.

Glucose Values in a Mixed Meal Tolerance Test in Male Rats with Streptozotocin
Induced Diabetes

5 Rats which have been administered streptozotocin (STZ) develop diabetes mellitus. Agents which modulate glucose levels in these animals are believed to be useful in the treatment of diabetes in humans.

 The test compound is formulated by adding a vehicle of 1% hydroxyethylcellulose (HEC), 0.25% Tween® 80 w/ antifoam 0.05% to preweighed test compound to make a
10 2.5 mg/ml solution. The mixture is probe sonicated for approximately 30 seconds. The resulting solution is used as a stock solution, from which the lower concentration dose solutions are prepared by dilution with the vehicle. STZ, 45 mg/kg, is formulated by dissolving in 0.1M Citrate buffer in 3ml aliquots and stored in the dark on ice, when not
15 being administered. A high fat content mixed meal (Bio-Serv® Rodent Diet F3282 High Fat) comprising Fat Calories (60%), Carbohydrate Calories (26%) and Protein Calories (15%) is utilized. Single housed Sprague Dawley rats are allowed to acclimate for a period of 3 to 7 days.

 In an effort to ensure that the animals have not recently fed, STZ is administered in the afternoon, approximately six hours into the light cycle (lights on 6am, lights off
20 6pm). The animals are anesthetized with isoflurane and STZ is delivered via tail vein injection. Once animals regain consciousness, they are returned to housing and allowed to recover for 7 days.

 On the two days immediately prior to the meal tolerance test (MTT) all rats are given a small amount (2-4g) of the F3282 diet, so they became acclimated to it prior to
25 receiving it during the experiment. On the evening before the experiment, the rats are moved into clean cages and their food is removed. The following morning animals are weighed and a blood sample is taken by tail snip for glucose measurement (Abbott AlphaTRAK™ glucometers: code 29). Animals are grouped n=6 based on fasted body weight and glucose. Thirty minutes after the test compound is orally administered, two
30 glucose measurements are collected. Then a five gram pellet of Bio-Serv® diet 3282 is given. After 20 minutes remaining food is taken away and weighed. Blood samples are taken at 20, 40, 60 and 120 minutes for glucose measurement.

Table 4. Glucose values in a mixed MTT in male rats with STZ-induced diabetes.

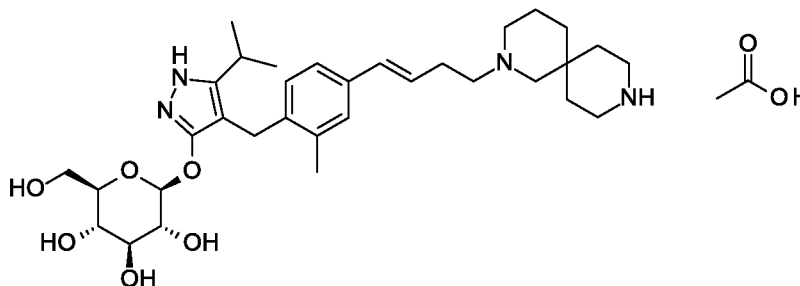
Treatment	Dose	Glucose Values (mg/dl) Groups n=5-6, Mean $\pm$ SE					
		0 min.	20 min.	40 min.	60 min.	120 min.	Baseline Adjusted AUC
Vehicle		113.6 $\pm$ 12.6	297.2 $\pm$ 26.6	427.6 $\pm$ 41	452.2 $\pm$ 37.3	544.7 $\pm$ 50.1	36429 $\pm$ 3155
Example 1 (free base)	10 mg/kg	139 $\pm$ 16.1	221.2 $\pm$ 26.3	268.7 $\pm$ 29*	330 $\pm$ 36.7	490.8 $\pm$ 39.2	22432 $\pm$ 2234*
Example 1 (free base)	30 mg/kg	137.4 $\pm$ 26.9	195.4 $\pm$ 44.8	232 $\pm$ 52.2**	263.9 $\pm$ 62.2*	355.3 $\pm$ 73.2*	14649 $\pm$ 3673**
Acarbose	60 mg/kg	124 $\pm$ 16.9	181 $\pm$ 22.8	301.3 $\pm$ 51.2	371.5 $\pm$ 63.9	433.7 $\pm$ 83	23877 $\pm$ 4649*
2 way ANOVA/ Bonferroni's *p<0.05, **p<0.01							

- 5 As shown in Table 4 above, the free base of Example 1 significantly and dose dependently decreases glucose in the MTT compared to the vehicle controls. Acarbose, which is a positive control, did not significantly decrease glucose compared to controls at any time point. Further, there is a dose dependent decrease in glucose baseline adjusted AUCs associated with the free base of Example 1 treatment. Acarbose significantly
- 10 decreases the glucose AUCs to levels similar to that of Example 1 at 10mg/kg. Table 4 demonstrates that the free base of Example 1 modulates glucose levels in the male rat.

-37-

I CLAIM:

1. A compound of the formula:



5 or hydrate thereof.

2. A crystalline form of the compound according to claim 1 which is hydrated.
3. The compound according to claim 2 characterized by at least one of the following:
 - 10 a. an X-ray powder diffraction pattern using $\text{CuK}\alpha$ radiation having an intense peak at diffraction angle 2-theta of 5.2° in combination with one or more intense peaks selected from the group consisting of 7.8° , 8.0° , and 10.7° ($\pm 0.2^\circ$ respectively); and
 - 15 b. a ^{13}C solid state NMR spectrum which comprises peaks referenced to the highfield resonance of adamantane ($\delta=29.5$ ppm) at: 181.8, 161.2, 160.0, 147.6 and 137.4 ppm (± 0.2 ppm respectively).
4. The compound according to any of claims 1 to 3 wherein the water content at ambient temperature is in the range of about 9% to about 12% by weight.
- 20 5. A method of treating diabetes in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound according to any one of claims 1 to 4.
- 25 6. A method of treating type 1 diabetes in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound according to any one of claims 1 to 4.

-38-

7. A method of treating type 2 diabetes in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound according to any one of claims 1 to 4.
- 5 8. A compound according to any one of claims 1 to 4 for use in therapy.
9. A compound according to any one of claims 1 to 4 for use in the treatment of diabetes.
- 10 10. A compound according to claim 9 wherein the diabetes is type 1 diabetes.
11. A compound according to claim 9 wherein the diabetes is type 2 diabetes.
12. A pharmaceutical composition comprising a compound according to any one
15 of claims 1 to 4 with one or more pharmaceutically acceptable carriers,
diluent, or excipients.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/063161

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07H17/02 A61K31/7056 A61P3/10
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 544 208 A1 (KISSEI PHARMACEUTICAL [JP]) 22 June 2005 (2005-06-22) page 14 - page 17; examples 44,73 -----	1
A,P	WO 2013/169546 A1 (LILLY CO ELI [US]) 14 November 2013 (2013-11-14) page 16; example 1 claims 2-4 -----	1



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 January 2015

Date of mailing of the international search report

16/01/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mezzato, Stefano

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

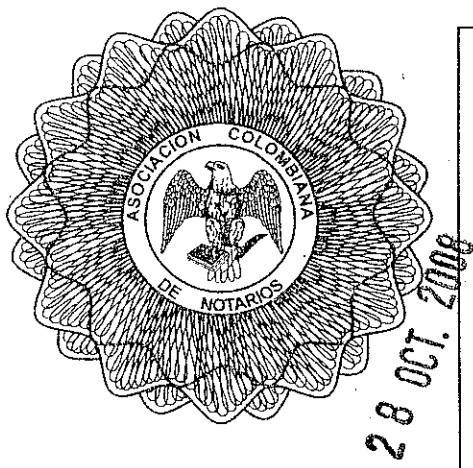
International application No

PCT/US2014/063161

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1544208	A1	22-06-2005	AT 469161 T 15-06-2010
		AU 2003254847 A1 25-02-2004	
		BR 0313290 A 05-07-2005	
		CA 2494179 A1 19-02-2004	
		EP 1544208 A1 22-06-2005	
		ES 2345250 T3 20-09-2010	
		HK 1082743 A1 02-05-2008	
		JP 4540475 B2 08-09-2010	
		KR 20050059067 A 17-06-2005	
		MX PA05001549 A 05-05-2005	
		NO 330456 B1 18-04-2011	
		NZ 538117 A 26-01-2007	
		PL 213095 B1 31-01-2013	
		RU 2356906 C2 27-05-2009	
		TW I341843 B 11-05-2011	
		US 2006166899 A1 27-07-2006	
		US 2008312153 A1 18-12-2008	
		WO 2004014932 A1 19-02-2004	

WO 2013169546	A1	14-11-2013	AU 2013259946 A1 16-10-2014
			CA 2869323 A1 14-11-2013
			DO P2014000250 A 30-11-2014
			TW 201406773 A 16-02-2014
			US 2013303471 A1 14-11-2013
			US 2014162967 A1 12-06-2014
			WO 2013169546 A1 14-11-2013

WK 9397304



ESCRITURA PUBLICA NUMERO : (1 2 2 7)

MIL DOSCIENTOS VEINTISIETE

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, a los Veintiocho -- (28) días del mes de Octubre -- -- del año dos mil ocho (2008), ante mi MARIA EUGENIA

ROJAS DE URUETA NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos:-----

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE PODER.-----

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS Y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA.-----

C.C. No. 79.376.996 Y 79.782.747.-----

Comparecieron JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS, mayor de edad vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.376.996 de estado civil casado con sociedad conyugal vigente y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA, mayor de edad, vecino de Bogotá, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.782.747, de estado civil casado con sociedad conyugal vigente, obrando en sus propios nombres y dijeron:-----

PRIMERO.- Que presentan para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en cinco (5) folios autenticados, un poder y sus traducciones los cuales son del siguiente tenor:-----

PODER-----

El suscrito ELI LILLY AND COMPANY, domiciliado en Lilly Corporate Center, Indianápolis, Indiana 46285 US por medio del

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri, poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de patentes, modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial o extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones y demandas que por motivo de encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultades para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.-----

Firma (ilegible) -----

Fecha 17 July 2003 -----

City, Country/ Ciudad, País: Indianápolis, Indiana, United Status of America.- -----

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia.- -----

APOSTILLA EN PODER DE DE REPRESENTACION DE ELI LILLY
AND COMPANY.

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapoles, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Meter G. Stringer, Director Ejecutivo y patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.- -----

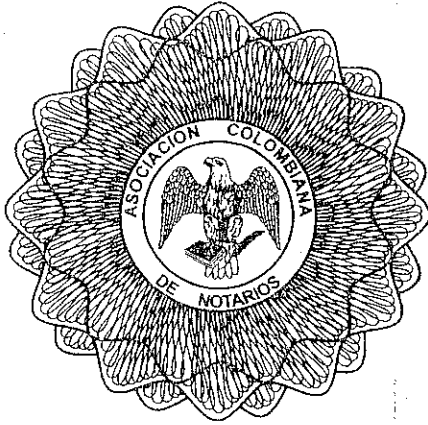
Todd Rokita Secretario de Estado -----

Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana -----

APOSTILLA

(Convencion de la Haya del 5 octubre 1961)

WK 9397305



1. País: Estados Unidos de América-
este documento público -----
2. Ha sido firmado por: Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario
de la Corte del Circuito en y para el
condado Jonson -----
- 4 Lleva el sello del Secretario de la Corte
del Circuito en y para el estado de Indiana -----

Certificado

5. En: Indianapoles, Indiana -----
6. El: 22 de julio de 2003.-----
7. Por el Secretario de Estado de Indiana 8 No. A2003-1279-----
9. Gran Sello del Estado de Indiana -----
10. Firma ilegible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana
- * Vigente desde el 1 de mayo de 2003, todas las apostillas de
Secretario y de Estado de Indiana tienen el sello impreso
electrónicamente. -----
- The Statehouse, Indianapoles, Indiana 46204, (307) 232-6531, fax
(317) 233-3283- -----

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario
Catherine Michel certifica que Meter G. Stringer, domiciliado en
7620 Castleton Faros, West Drive Indianápolis, Indiana- 46256
Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes
Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianápolis,
Indiana, Estados Unidos.--

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial inglés-
Español- Inglés-----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.- -----

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento:
Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de
Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité Ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.-----

Firma del notario público Catherine Michel certifica sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008- residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana.-----

Es traducción fiel de inglés, con copia archivo para confrontación, Bogotá 28 de julio-2003.-----

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial Inglés-Español- Inglés -----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.------

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

Se advierte que la protocolización de documentos no da mayor fuerza o autenticidad de la que tienen dichos documentos.----

Esta escritura pública fue firmada fuera del Despacho Notarial, de conformidad con el artículo 12 del Decreto 2.148 de 1.983. -----

Se advirtió a los otorgantes de esta escritura de la obligación que tienen de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto, en consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma de (el, los) otorgante(s) y de la notaría, en tal caso, este (os) debe(n) ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial y sufragada por los mismos (artículo 35, decreto ley 960 de 1970).-----

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
ELI LILLY AND COMPANY

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Peter G. Stringer, Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.

Todd Rokita Secretario de Estado
Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América- Este documento Público
2. ha sido firmado por Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario de la Corte del Circuito en y para el condado Johnson
4. Lleva el sello del Secretario de la Corte del Circuito en y para el estado de Indiana

CERTIFICADO

5. En Indianapolis, Indiana
6. El 22 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado de Indiana
8. No. A2003- 1127
9. Gran Sello del Estado de Indiana
10. Firma legible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana

* Vigente desde el 1 mayo de 2003, todas las apostillas del Secretario de Estado de Indiana tienen el sello impreso electrónicamente.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, fax (317) 233-3283

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario Catherine Michel certifica que Peter G. Stringer, domiciliado en 7620 Castleton Farms, West Drive, Indianapolis, Indiana - 46256 Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos.


MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento: Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.

Firma del notario público Catherine Michel certifica

Sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008 - residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana

--

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 28 de julio-2003.

Marlen Neira C



MARLEN NEIRA CASTRO

Traductor e Intérprete Oficial

Inglés - Español - Inglés

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER — TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 US

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents, Utility Models and Industrial Designs** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma

Date/Fecha: / 7 July 2003

City,Country/Ciudad,País: Indianapolis, Indiana, United States of America

Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de **Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

NOTARIA VERIFICADA
BOGOTÁ - República de Colombia



Todd Rokita
Secretary of State

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA



APOSTILLE

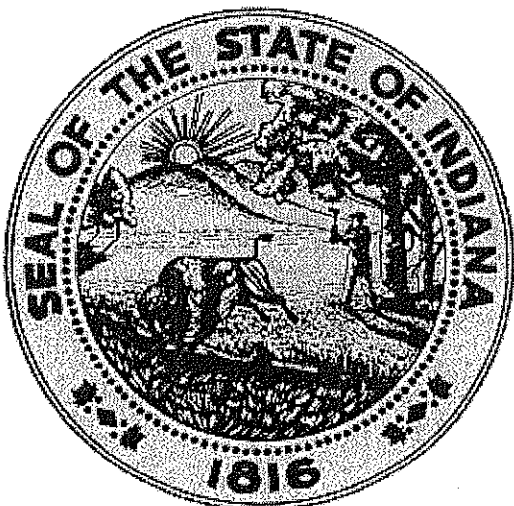
(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Catherine Michel*
3. acting in the capacity of circuit court clerk in & for *Johnson County*
4. and bears the seal/stamp of circuit court clerk in & for the State of Indiana

Certified

5. at Indianapolis, Indiana
6. this *Twenty-second day of July, 2003*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. *A2003- 11279*
9. Seal/Stamp:

10. Signature:




Todd Rokita

Indiana Secretary of State

*Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, Fax (317) 233-3283

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
/ 7 July 2003
The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in
7620 Castleton Farms, West Drive,
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Executive Director, International
Patents
of ELI LILLY AND COMPANY

3. That ELI LILLY AND COMPANY
having its principal place of business located in
Indianapolis, Indiana, United States of
America

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Delegation of Authority Concerning Certain
Patent Matters, executed January 20, 2003;
pursuant to the authority granted to the
General Counsel of the Company by the
executive Committee of the Board of
Directors of Eli Lilly and Company

NOTARY PUBLIC (Signature):



Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

Peter G. Stringer

mayor de edad y domiciliado
Indianapolis, Indiana 46256 US
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de

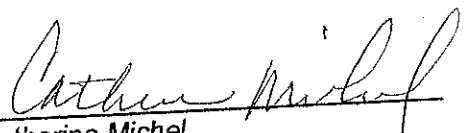
de

4. Que
con sede principal ubicada en

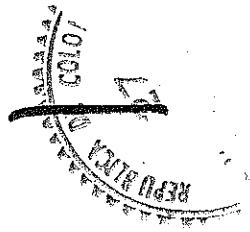
está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):


Catherine Michel
My Commission Expires October 21, 2008
Resident of Johnson County

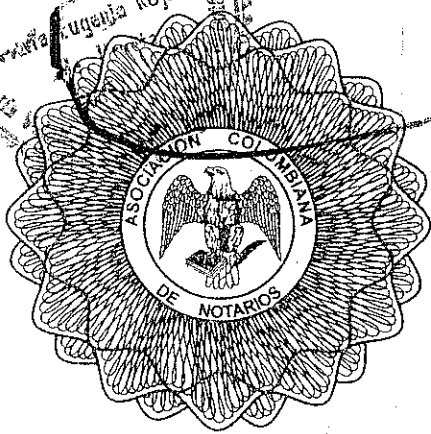
NOTARIO PUBLICO
Catherine Michel
Notario Eugenio Rojas de Hueta



ESPACIO EN BLANCO

ESPACIO EN BLANC

WK 9397306



ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y
AUTORIZACION.- Leído el presente
instrumento por el (los) compareciente
(s) y advertido (s) sobre las
formalidades legales, lo aprueban y
firman conmigo y ante mí la(el)
Notaria(o) quién lo autoriza. ---Se

utilizaron las hojas de papel Notarial Nos. WK 9397304, WK 9397305 Y
WK 9397306 .

DERECHOS LEGALES: \$ 39.630.00

RESOLUCION 8850 DE 2007

IVA \$ 10.781.00

James Ian Raisbeck Llínas

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS

C.C.No. 79.376.996 BOGOTA

TEL: 601-7700

Carlos Reinaldo Olarte Garcia

CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

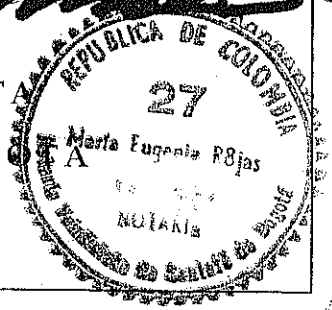
C.C.No. 79.782.747 BOGOTA.

TEL: 601-7700

Maria Eugenia Rojas de Urqueta

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOGOTÁ

redb.



ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

Es fiel y Segunda ^(2ª)
fotocopia de la Escritura Pública No. 1227
de fecha 28 de Octubre de 2008
tomada de su original que expido en
Seis (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 28 OCT 2008
El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá



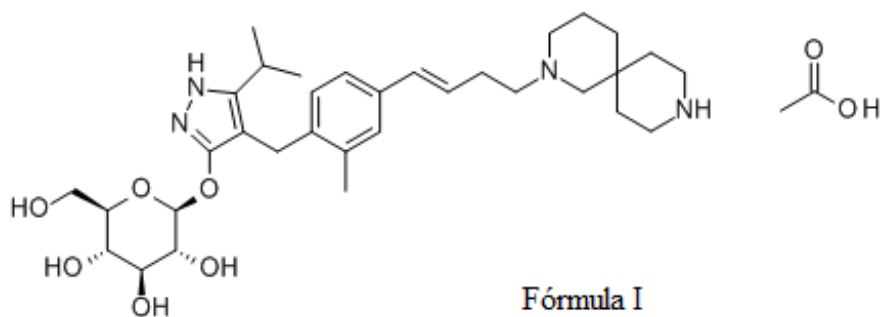
ESPACIO EN BLANCO

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un compuesto de

Fórmula I:

5



Fórmula I

10

o hidrato del mismo.