

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07H 15/203



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01806691.7

A61K 31/7034 A61P 43/00

A61P 3/10 A61P 3/04

C07C 69/78 C07C 69/16

C07C 69/18 C07C323/18

C07C 39/15 C07C 43/23

[43] 公开日 2003 年 5 月 14 日

[11] 公开号 CN 1418219A

[22] 申请日 2001.3.15 [21] 申请号 01806691.7

[30] 优先权

[32] 2000. 3. 17 [33] JP [31] 77304/2000

[86] 国际申请 PCT/JP01/02041 2001. 3. 15

[87] 国际公布 WO01/68660 日 2001. 9. 20

[85] 进入国家阶段日期 2002. 9. 17

[71] 申请人 橘生药品工业株式会社

地址 日本长野县松本市

[72] 发明人 藤仓秀纪 伏见信彦 西村俊洋

田谷和也 胜野健次 平栃正博

德武巧记 伊佐治正幸

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

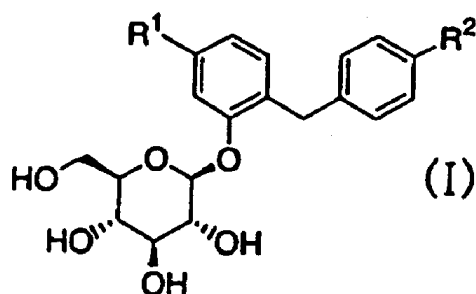
代理人 陈剑华

权利要求书 2 页 说明书 28 页

[54] 发明名称 吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物、包含该物质的药用组合物及制备该衍生物用的中间体

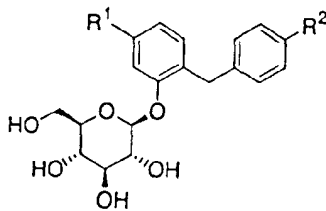
[57] 摘要

本发明涉及由通式表示的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物和它们的盐：式中 R<sup>1</sup> 表示氢原子或羟基（低级烷基）；R<sup>2</sup> 表示低级烷基、低级烷氧基、低级烷硫基、羟基（低级烷基）、羟基（低级烷氧基）、羟基（低级烷硫基）等，它们对人 SGLT2 的活性具有极好的抑制作用，并用作预防或治疗糖尿病、肥胖症等的药剂及它们的中间体。



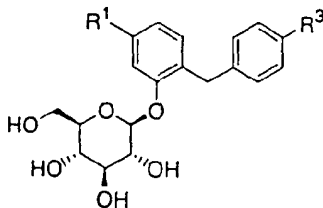
ISSN 1008-4274

1. 由以下通式表示的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物或它们的药用盐:



5 式中 R<sup>1</sup> 表示氢原子或羟基（低级烷基）；R<sup>2</sup> 表示低级烷基、低级烷氧基、低级烷硫基、羟基（低级烷基）、羧基（低级烷氧基）、羧基（低级烷硫基）、低级烷氧基取代的（低级烷基）、低级烷氧基取代的（低级烷氧基）或低级烷氧基取代的（低级烷硫基）。

2. 如权利要求 1 所述的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物或者它们的药用盐, 由  
10 以下通式表示:



式中 R<sup>1</sup> 表示氢原子或羟基（低级烷基）；R<sup>3</sup> 表示低级烷基、低级烷氧基或羟基（低级烷基）。

3. 药用组合物, 它包括如权利要求 1 或 2 所述的作为活性成分的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物或它的药用盐。  
15

4. 如权利要求 3 所述的药用组合物, 其特征在于: 该组合物是人 SGLT2 的抑制剂。

5. 如权利要求 4 所述的药用组合物, 其特征在于: 该组合物是预防或治疗糖尿病或糖尿病的并发症的药剂。

20 6. 如权利要求 4 所述的药用组合物, 其特征在于: 该组合物是用于预防或治疗肥胖症的药剂。

7. 预防或治疗与高血糖有关的疾病的方法, 它包括使用如权利要求 1 或 2 所述的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物或它们的药用盐。

8. 如权利要求 7 所述的预防或治疗的方法, 其特征在于: 所述与高血糖有关的疾病是糖尿病或糖尿病的并发症。

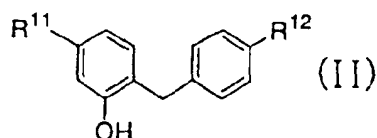
9. 如权利要求 7 所述的预防或治疗的方法, 其特征在于: 所述与高血糖有关的疾病是肥胖症。

5 10. 权利要求 1 或 2 所述的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物或它们的药用盐在制备预防或治疗与高血糖有关的疾病的药用组合物中的应用。

11. 如权利要求 10 所述的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物或它的药用盐的应用, 其特征在于: 所述与高血糖有关的疾病是糖尿病或糖尿病的并发症。

12. 如权利要求 10 所述的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物或它的药用盐的应用, 其特征在于: 所述与高血糖有关的疾病是肥胖症。

13. 由以下通式所表示的苄基苯酚衍生物或其盐:



15 式中  $R^{11}$  表示氢原子或被保护的羟基 (低级烷基);  $R^{12}$  表示低级烷基、低级烷氧基、低级烷硫基、被保护的羟基 (低级烷基)、被保护的羟基 (低级烷氧基)、被保护的羟基 (低级烷硫基)、低级烷氧基取代的 (低级烷基)、低级烷氧基取代的 (低级烷氧基) 或低级烷氧基取代的 (低级烷硫基); 但当  $R^{11}$  为氢原子时,  $R^{12}$  不是甲基、乙基、异丙基、叔丁基或甲氧基。

吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物、包含该物质的药用组合物  
及制备该衍生物用的中间体

5

技术领域

本发明涉及用作药物的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物和它的药用盐，包含该物质的药用组合物及其中间体。

10

背景技术

糖尿病是一种与生活方式有关、在饮食习惯的改变和锻炼的缺乏的背景下形成的疾病。因此，对糖尿病人采用节食和运动的疗法。而且，当该疗法的充分的控制作用和持续的执行变得困难时，可同时进行药物治疗。现今，使用双胍、磺酰脲及降低胰岛素抗性的药物作为抗糖尿病药物。但是，双胍和磺酰脲偶尔各自起不良  
15 影响如乳酸中毒和低血糖。在使用降低胰岛素抗性的药物的情况下，偶尔可观察到不良影响如水肿，也要关心进行性发胖。因此，为了解决这些问题，希望发展一种具有新的机理的抗糖尿病药物。

近年来，新型抗糖尿病药物发展迅猛，它通过防止肾对过量葡萄糖的再吸收促进了尿液中葡萄糖的排泄，使血液中的葡萄糖水平降低（J.Clin.Invest., Vol.79, pp.1510 - 1515 (1987)）。另外，据报道 SGLT2 (Na<sup>+</sup>/葡萄糖共运载体 2) 存在于  
20 肾的近侧细管的 S1 部分，并主要通过肾小球的滤过参与葡萄糖的再吸收（J.Clin.Invest., Vol.93, pp.397 - 404 (1994)）。因此，抑制人 SGLT2 的活性可防止肾对过剩的葡萄糖再吸收，继而促进了尿液对过剩的葡萄糖的排泄，并且使血液中葡萄糖的水平正常。因此，希望能有效地抑制人 SGLT2 的活性并具有新的机  
25 理的抗糖尿病药物迅速地发展。而且，由于这类药物能促进尿液对过剩的葡萄糖的排泄，从而减少了人葡萄糖的累积，也可期待它们对肥胖具有预防作用。

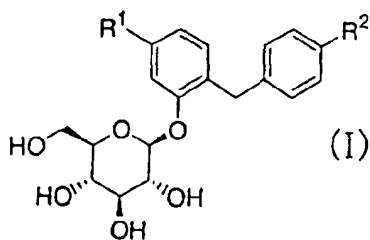
发明内容

本发明者为发现对人 SGLT2 具有抑制活性的化合物进行了仔细地研究。结果，  
30 发现了由以下通式 (I) 表示的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物，如下所述，显示

出极好的对人 SGLT2 的抑制活性，由此形成了本发明的基础。

5 本发明是为了提供以下的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物和它的药用盐，它们显示对人 SGLT2 的体内抑制活性，并通过阻止肾对葡萄糖的再吸收由尿液排泄过剩的葡萄糖来达到降低血糖的作用，以及包含该物质的药用组合物及其

因此，本发明涉及由以下通式表示的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物、或它们的药用盐：



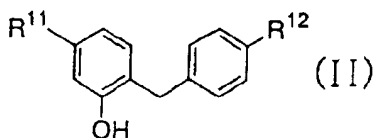
10 式中  $R^1$  表示氢原子或羟基（低级烷基）； $R^2$  表示低级烷基、低级烷氧基、低级烷硫基、羟基（低级烷基）、羟基（低级烷氧基）、羟基（低级烷硫基）、低级烷氧基取代的（低级烷基）、低级烷氧基取代的（低级烷氧基）或低级烷氧基取代的（低级烷硫基）。

本发明涉及包含作为活性成分的由上述通式 (I) 所表示的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物或它们的药用盐。

15 本发明涉及预防或治疗与高血糖有关的疾病的方法，它包括使用由上述通式 (I) 所表示的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物或它们的药用盐的药用组合物。

本发明涉及使用由上述通式 (I) 所表示的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物或它们的药用盐，以生产用以预防或治疗与高血糖有关的疾病的药用组合物。

本发明还涉及由以下通式所表示的苄基苯酚的衍生物或它的盐：



20

式中  $R^{11}$  表示氢原子或被保护的羟基（低级烷基）； $R^{12}$  表示低级烷基、低级烷氧基、低级烷硫基、被保护的羟基（低级烷基）、被保护的羟基（低级烷氧基）、被保护的羟基（低级烷硫基）、低级烷氧基取代的（低级烷基）、低级烷氧基取代的（低级烷氧基）或低级烷氧基取代的（低级烷硫基）；但当  $R^{11}$  为氢原

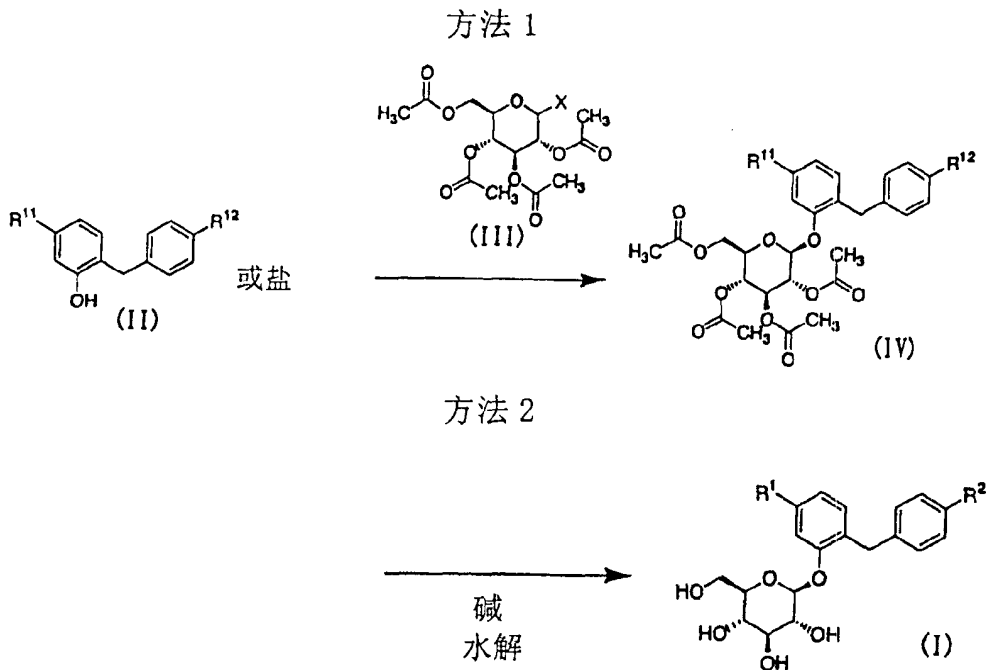
子时, R<sup>12</sup>不是甲基、乙基、异丙基、叔丁基或甲氧基。

在本发明中, 术语“低级烷基”表示具有 1-6 个碳原子的直链或支链烷基, 如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、己基等; 术语“低级烷氧基”表示具有 1-6 个碳原子的直链或支链烷氧基, 如甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、异戊氧基、新戊氧基、叔戊氧基、己氧基等; 术语“低级烷硫基”表示具有 1-6 个碳原子的直链或支链烷硫基, 如甲硫基、乙硫基、丙硫基、异丙硫基、丁硫基、异丁硫基、仲丁硫基、叔丁硫基、戊硫基、异戊硫基、新戊硫基、叔戊硫基、己硫基等。术语“羟基(低级烷基)”表示具有 1-6 个碳原子的直链或支链羟基烷基, 如羟甲基、2-羟乙基、1-羟乙基、3-羟丙基、2-羟丙基、1-羟丙基、2-羟基-1-甲基乙基、4-羟丁基、3-羟丁基、2-羟丁基、1-羟丁基、5-羟戊基、4-羟戊基、3-羟戊基、2-羟戊基、1-羟戊基、6-羟己基、5-羟己基、4-羟己基、3-羟己基、2-羟己基、1-羟己基等; 术语“羟基(低级烷氧基)”表示具有 1-6 个碳原子的直链或支链羟基烷氧基, 如 2-羟乙氧基、3-羟丙氧基、2-羟丙氧基、2-羟基-1-甲基乙氧基、4-羟丁氧基、3-羟丁氧基、2-羟丁氧基、5-羟戊氧基、4-羟戊氧基、3-羟戊氧基、2-羟戊氧基、6-羟己氧基、5-羟己氧基、4-羟己氧基、3-羟己氧基、2-羟己氧基等; 术语“羟基(低级烷硫基)”表示具有 1-6 个碳原子的直链或支链羟基烷硫基, 如羟基甲硫基、2-羟基乙硫基、1-羟基乙硫基、3-羟基丙硫基、2-羟基丙硫基、1-羟基丙硫基、2-羟基-1-甲基乙硫基、4-羟基丁硫基、3-羟基丁硫基、2-羟基丁硫基、1-羟基丁硫基、5-羟基戊硫基、4-羟基戊硫基、3-羟基戊硫基、2-羟基戊硫基、1-羟基戊硫基、6-羟基己硫基、5-羟基己硫基、4-羟基己硫基、3-羟基己硫基、2-羟基己硫基、1-羟基己硫基等。术语“低级烷氧基取代的(低级烷基)”表示上述羟基(低级烷基)被上述低级烷基 O-烷基化了; 术语“低级烷氧基取代的(低级烷氧基)”表示上述羟基(低级烷氧基)被上述低级烷基 O-烷基化了; 术语“低级烷氧基取代的(低级烷硫基)”表示上述羟基(低级烷硫基)被上述低级烷基 O-烷基化了。

术语“羟基保护基”表示在普通的有机反应中使用的羟基保护基, 如苄基、甲氧基甲基、乙酰基等。

在取代基  $R^1$  中, 优选氢原子和具有 1-3 个碳原子的羟烷基。在取代基  $R^2$  中, 优选低级烷基、低级烷氧基和羟基(低级烷基), 并且更优选具有 1-4 个碳原子的烷基、具有 1-3 个碳原子的烷氧基、及具有 1-3 个碳原子羟烷基。

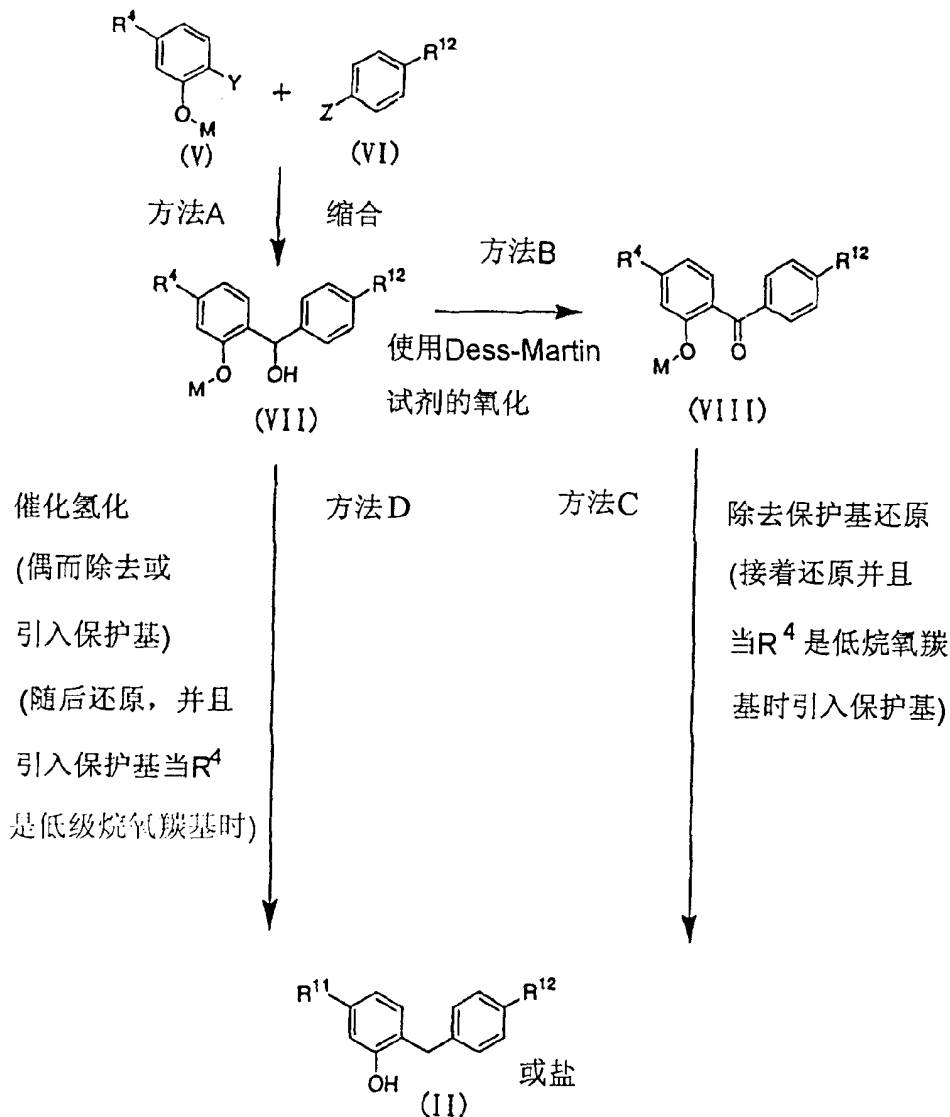
- 5 例如, 根据以下程序, 可使用本发明的由通式 (II) 表示的苜基苯酚的衍生物来制备本发明的由通式 (I) 表示的化合物:



- 式中  $R^{11}$  表示氢原子或被保护的羟基(低级烷基);  $R^{12}$  表示低级烷基、低级烷氧基、低级烷硫基、被保护的羟基(低级烷基)、被保护的羟基(低级烷氧基)、被保护的羟基(低级烷硫基)、低级烷氧基取代的(低级烷基)、低级烷氧基取代的(低级烷氧基)或低级烷氧基取代的(低级烷硫基); X 表示离去基团, 如三氯乙亚氨酰氧基、乙酰氧基、溴原子或氟原子;  $R^1$  和  $R^2$  与上述定义的不同。

#### 15 方法 1

在活化试剂(如三氟化硼乙醚复合物、三氟甲磺酸银、氯化锡(IV)或三甲基甲硅烷基三氟甲基磺酸酯)存在的条件下, 通过使用由上述通式(III)表示的糖基-给体(如 2,3,4,6-四-O-乙酰基-1-O-三氯乙亚酰氨基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖、1,2,3,4,6-五-O-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\alpha$ -D-溴



式中,  $M$  表示氢原子或羟基保护基团;  $R^4$  表示氢原子、被保护的羟基 (低级烷基) 或低级烷氧羰基;  $Y$  和  $Z$  中的一个为  $MgBr$ 、 $MgCl$ 、 $MgI$  或锂原子, 而另一个为甲酰基;  $R^{11}$  和  $R^{12}$  与上述定义相同。

5

#### 方法 A

可通过在惰性溶剂中使用 Grignard 试剂或由上述通式 (VI) 表示的锂试剂来缩合由上述通式 (V) 表示的苯甲醛的衍生物, 或者使用由上述通式 (VI) 表示的苯甲醛的衍生物来缩合 Grignard 试剂或由上述通式 (V) 表示的锂试剂, 以制备由上述通式 (VII) 表示的化合物。可使用四氢呋喃、乙醚、它们的混合溶剂等作为溶剂。反应温度通常是  $-78^{\circ}C$  至回流温度, 反应时间通常为 10 分钟到 1 天, 根据所使用的起始材料、溶剂和反应温度而改变。



化吡喃葡萄糖和 2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\beta$ -D-氟化吡喃葡萄糖) 将由上述通式 (II) 表示的苄基苯酚的衍生物或它的盐在惰性溶剂中进行糖基化, 以制备由上述通式 (IV) 表示的葡糖苷。可使用二氯甲烷、甲苯、乙腈、硝基甲烷、乙酸乙酯、乙醚、氯仿、它们的混合溶剂等作为溶剂。反应温度通常是  $-30^{\circ}\text{C}$  至回流温度, 5 反应时间通常为 10 分钟到 1 天, 根据所使用的起始材料、溶剂和反应温度而改变。

## 方法 2

可通过将由上述通式 (IV) 表示的葡糖苷进行碱性水解以除去羟基保护基团来制备本发明的化合物 (I)。可使用水、甲醇、乙醇、四氢呋喃、它们的混合溶剂 10 等作为溶剂, 并且可使用氢氧化钠、甲醇钠、乙醇钠等作为碱性物质。处理温度通常是  $0^{\circ}\text{C}$  到回流温度, 而处理时间通常为 30 分钟到 6 小时, 根据所使用的起始材料、溶剂和处理温度而改变。该处理可根据所使用的羟基保护基团通过在常规方法中适宜地改变或添加其它步骤来执行。

例如, 在上述制造方法中用作起始材料的本发明的由上述通式 (II) 表示的化 15 合物及其盐可根据以下步骤制备。

## 方法 B

在惰性溶剂中使用 Dess-Martin 试剂将由上述通式 (VII) 表示的化合物进行氧化以制备由通式 (VIII) 表示的化合物。可使用二氯甲烷、氯仿、乙腈、它们的混合溶剂等作为溶剂。反应温度通常是 0°C 至回流温度，反应时间通常为 1 小时到 1 5 天，根据所使用的起始材料、溶剂和反应温度而改变。

## 方法 C

通过除去由上述通式 (VIII) 表示的化合物的保护基团 M 来制备由上述通式 (II) 表示的化合物，(1) 在惰性溶剂中，在碱（如三乙基胺、二异丙基乙基胺或 N,N-二甲基氨基吡啶）存在的条件下，使所得的化合物与氯甲酸甲酯缩合，及  
10 (2) 使用还原剂如硼氢化钠将所得的碳酸酯衍生物还原。可使用四氢呋喃、二氯甲烷、乙腈、乙酸乙酯、乙醚、它们的混合溶剂等作为反应 (1) 中的溶剂。反应温度通常是 0°C 至回流温度，还原时间通常为 30 分钟到 1 天，根据所使用的起始材料、溶剂和反应温度而改变。可使用四氢呋喃和水的混合溶剂等作为反应 (2)  
15 中的溶剂。反应温度通常是 0°C 至回流温度，还原时间通常为 1 小时到 1 天，根据所使用的起始材料、溶剂和反应温度而改变。在 R<sup>4</sup> 是低级烷氧羰基的情况下，可通过在惰性溶剂中使用还原剂如氢化铝锂将基团还原成为羟甲基并按常规的方法保护羟基得到本发明的由上述通式 (II) 表示的化合物。可使用乙醚、四氢呋喃、它们的混合溶剂等作为还原反应中使用的溶剂。反应温度通常是 0°C 至回流温度，  
20 还原时间通常为 10 分钟到 1 天，根据所使用的起始材料、溶剂和反应温度而改变。本发明的由上述通式 (II) 表示的化合物可通过常规的方法转化成它的盐如钠盐或钾盐。

## 方法 D

25 在惰性溶剂中，通过在酸如盐酸存在或不存在的条件下使用钌催化剂如钌-碳粉末，将由上述通式 (VII) 表示的化合物催化氢化，以制备本发明的由上述通式 (II) 表示的化合物，并根据需要用常规方法除去或引入保护基。可使用甲醇、乙醇、四氢呋喃、乙酸乙酯、乙酸、异丙醇、它们的混合溶剂等作为催化氢化中使用的溶剂。反应温度通常是室温至回流温度，反应时间通常为 30 分钟到 1 天，根据  
30 所使用的起始材料、溶剂和反应温度而改变。在 R<sup>4</sup> 是低级烷氧羰基的情况下，可

通过在惰性溶剂中使用还原剂如氢化铝锂将基团还原成为羟甲基并按常规的方法保护羟基以得到本发明的由上述通式 (II) 表示的化合物。可使用二乙基醚、四氢呋喃、它们的混合溶剂等作为还原反应中使用的溶剂。反应温度通常是 0°C 至回流温度，反应时间通常为 10 分钟到 1 天，根据所使用的起始材料、溶剂和反应温度而改变。本发明的由上述通式 (II) 表示的化合物可通过常规的方法转化成它的盐如钠盐或钾盐。

由上述制造方法得到的本发明的化合物可用常规的分离方法如分部再结晶，使用色谱法、溶剂萃取法和固相萃取法的纯化方法，来分离和纯化。

用普通的方法可将本发明的由上述通式 (I) 表示的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物转化成它们的药用盐。该盐类的例子包括无机碱的盐如钠盐或钾盐。

本发明的由上述通式 (I) 表示的化合物包括它们的水合物和药用溶剂如乙醇的溶剂化物。

本发明的由上述通式 (I) 表示的化合物和它们的药用盐对人 SGLT2 具有极好的抑制活性，并且非常好的用作预防或治疗糖尿病、糖尿病的并发症、肥胖等的药剂。例如，在以下的对人 SGLT2 的活性的抑制作用的试验中，本发明的化合物发挥了有效地抑制人 SGLT2 的活性的作用。

当在实际治疗中使用本发明的药用组合物时，应根据它们的用法使用不同的剂型。作为剂型，可使用粉末、微粒、细粒、干糖浆、片、胶囊、针剂、溶液、软膏、栓剂、膏药等，口服或肠胃外使用。

这些药用组合物可通过掺合或者通过稀释和溶解适宜的药用添加剂如赋形剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、稀释剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、稳定剂、溶解助剂等来制备，并且根据常规方法制成混合物。

当在实际治疗中使用本发明的药用组合物时，本发明的作为活性组分的由上述通式 (I) 表示的化合物或它的药用盐的剂量应根据每位病人的年龄、性别、体重和症状及治疗的程度适宜地确定，在口服使用的情况下每个成年人近似为 0.1 - 1,000mg 每天，在肠胃外使用的情况下每个成年人近似为 0.01 - 300mg 每天，每天的剂量可分成数次适宜地使用。

### 具体实施方式

将使用以下参照例、实施例和试验例对本发明作进一步详细地描述。但是，本发明并不仅限于它们。

#### 5 参照例 1

##### 4-(3-苄氧丙基)溴苯

在苯(24mL)中将氢化钠(60%，0.97g)、3-(4-溴苯基)-1-丙醇(1.0g)和苄基溴(0.69mL)于回流下搅拌7小时。在冷却至环境温度后，将饱和氯化铵水溶液(50mL)加入反应混合物中，用乙酸乙酯(100mL)萃取该混合物。用水(40mL)和盐水(40mL)清洗有机层，使用无水硫酸钠来干燥。减压下除去溶剂，在硅胶上用柱色谱(洗脱剂：己烷/乙酸乙酯=20/1)纯化残余物，以得到4-(3-苄氧丙基)溴苯(1.4g)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.85 - 2.00 (2H, m), 2.60 - 2.75 (2H, m), 3.47 (2H, t,  $J = 6.2\text{Hz}$ ), 4.50 (2H, s), 7.00 - 7.10 (2H, m), 7.20 - 7.45 (7H, m)

#### 参照例 2

##### 4-(4-乙基苄基)-3-羟基苯甲酸甲酯

在 $-78^\circ\text{C}$ ，在氩气氛中将1.45mol/L的叔丁基锂正戊烷溶液(2.3mL)加入1-溴-4-乙基苯(0.41mL)的四氢呋喃(15mL)溶液中。在 $-78^\circ\text{C}$ 搅拌混合物10分钟后，将4-甲酰基-3-羟基苯甲酸甲酯(0.18g)的四氢呋喃(5mL)溶液加入反应混合物中。在冰冷却下搅拌该混合物45分钟后，将饱和氯化铵水溶液和水加入反应混合物中，用乙酸乙酯萃取该混合物。萃取物用水清洗，用无水硫酸镁干燥，并在减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱(洗脱剂：己烷/乙酸乙酯=3/1)纯化残余物，以得到二苯基甲醇化合物(0.27g)。在甲醇(5mL)中溶解所得的二苯基甲醇(0.27g)化合物，并将浓盐酸(0.08mL)和10%钨-碳粉末(54mg)加入溶液中。在室温下于氩气氛中搅拌混合物18小时后，过滤除去催化剂，并在减压下浓缩滤出液。在硅胶上用柱色谱(洗脱剂：己烷/乙酸乙酯=3/1)纯化残余物，以得到4-(4-乙基苄基)-3-羟基苯甲酸甲酯(0.20g)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.22 (3H, t, J = 7.6Hz), 2.62 (2H, q, J = 7.6Hz), 3.89 (3H, s), 4.00 (2H, s), 5.01 (1H, s), 7.05 - 7.25 (5H, m), 7.47 (1H, d, J = 1.6Hz), 7.56 (1H, dd, J = 1.6, 7.8Hz)

### 5 参照例 3

#### 3-羟基-4-(4-丙氧基苄基)苯甲酸甲酯

在 -78°C, 在氩气氛中将 1.45mol/L 的叔丁基锂正戊烷溶液 (11mL) 加入 1-烯丙氧基-4-溴苯 (3.1g) 的四氢呋喃 (70mL) 溶液中。在 -78°C 搅拌混合物 5 分钟后, 将 4-甲酰基-3-羟基苯甲酸甲酯 (0.89g) 的四氢呋喃 (15mL) 溶液加入反应混合物中。在冰冷却下搅拌该混合物 30 分钟后, 将饱和氯化铵水溶液和水加入反应混合物中, 并用乙酸乙酯萃取该混合物。萃取物用水清洗, 用无水硫酸镁干燥, 并在减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 3/1) 纯化残余物, 以得到二苄基甲醇化合物 (0.99g)。在甲醇 (10mL) 中溶解所得的二苄基甲醇化合物 (0.99g), 并将 10% 钨-碳粉末 (0.30g) 加入溶液中。在室温下于氩气氛中搅拌混合物 24 个小时后, 过滤除去催化剂, 并在减压下浓缩滤出液。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 3/1) 纯化残余物, 以得到 3-羟基-4-(4-丙氧基苄基)苯甲酸甲酯 (0.50g)。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:

1.02 (3H, t, J = 7.4Hz), 1.70 - 1.85 (2H, m), 3.80 - 3.95 (5H, m), 3.97 (2H, s), 4.99 (1H, s), 6.75 - 6.90 (2H, m), 7.05 - 7.20 (3H, m), 7.47 (1H, d, J = 1.5Hz), 7.56 (1H, dd, J = 1.5, 7.8Hz)

### 参照例 4

#### 3-羟基-4-[4-(2-羟乙基)苄基]苯甲酸甲酯

25 在 -78°C, 在氩气氛中将 1.45mol/L 的叔丁基锂正戊烷溶液 (12.6mL) 加入 2-(溴苄基)乙醇 (1.7g) 的四氢呋喃 (100mL) 溶液中。在 -78°C 搅拌混合物 10 分钟后, 将 4-甲酰基-3-羟基苯甲酸甲酯 (0.50g) 的四氢呋喃 (10mL) 溶液加入反应混合物中。在冰冷却下搅拌该混合物 30 分钟后, 将饱和氯化铵水溶液和水加入反应混合物中, 并用乙酸乙酯萃取该混合物。萃取物用水清洗, 用无水硫酸镁干燥, 并在减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 1/3)

纯化残余物，以得到二苯基甲醇化合物 (0.28g)。在甲醇 (5mL) 中溶解所得的二苯基甲醇化合物 (0.28g)，并将 10% 钨 - 碳粉末 (0.14g) 加入溶液中。在室温下于氢气气氛中搅拌混合物 14 个小时后，过滤除去催化剂，并在减压下浓缩滤出液。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 1/1) 纯化残余物，以得到 3-羟基-4- [4-(2-羟乙基)苄基] 苯甲酸甲酯 (0.26g)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.37 (1H, t,  $J = 5.9\text{Hz}$ ), 2.84 (2H, t,  $J = 6.5\text{Hz}$ ), 3.75 - 3.95 (5H, m), 4.01 (2H, s), 5.01 (1H, s), 7.05 - 7.25 (5H, m), 7.47 (1H, d,  $J = 1.6\text{Hz}$ ), 7.56 (1H, dd,  $J = 1.6\text{Hz}$ )

10

参照例 5

#### 2-(4-异丁基苄基)苯酚

由 2-苄氧基-溴苯 (0.20g)、镁 (0.026g)、催化量的碘和四氢呋喃 (1mL) 来制备 Grignard 试剂。将所得的 Grignard 试剂加入 4-异丁基苯甲醛 (0.16g) 的四氢呋喃 (2mL) 溶液中，并在室温下搅拌该混合物 30 分钟。在氨基硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 四氢呋喃) 纯化残余物，以得到二苯基甲醇化合物 (0.23g)。在乙醇 (3mL) 和浓盐酸 (0.1mL) 中溶解所得的二苯基甲醇化合物。将催化量的 10% 钨 - 碳粉末加入溶液中，并在室温下于氢气气氛中搅拌该混合物一夜。过滤除去催化剂，并在减压下浓缩滤出液。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 二氯甲烷/己烷 = 1/1) 纯化残余物，以得到 2-(4-异丁基苄基)苯酚 (0.10g)。

15

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

0.89 (1H, t,  $J = 5.9\text{Hz}$ ), 1.75 - 1.90 (1H, m), 2.43 (2H, d,  $J = 7.2\text{Hz}$ ), 3.97 (2H, s), 4.66 (1H, s), 6.75 - 6.85 (1H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.00 - 7.20 (6H, m)

25

参照例 6

#### 2-(4-异丙氧基苄基)苯酚

标题化合物的制备方法与参照例 5 所述的相似，只是使用 4-异丙氧基-苯甲醛代替 4-异丁基苯甲醛。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

30

1.31 (6H, d,  $J = 6.1\text{Hz}$ ), 3.93 (2H, s), 4.50 (1H, 七重峰,  $J = 6.1\text{Hz}$ ), 4.72 (1H, s), 6.75 - 6.85 (3H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.05 - 7.20 (4H, m)

参照例 7

#### 5 2 - (4 - 乙氧基苄基) 苯酚

用常规的方法, 由 4 - 乙氧基溴 - 苄 (1.5g)、镁 (0.19g)、催化量的碘和四氢呋喃 (2mL) 来制备 Grignard 试剂。向所得的 Grignard 试剂溶液中滴加 2 - 苄氧基苯甲醛 (1.1g) 的四氢呋喃 (15mL) 溶液, 并在室温下搅拌该混合物 30 分钟。向反应混合物中加入饱和的氯化铵溶液 (10mL) 和水 (20mL), 并用乙酸乙酯 100mL 萃取该混合物。用水 (20mL) 和盐水 (20mL) 清洗萃取物, 并用无水硫酸钠干燥。随后, 在减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 5/1) 纯化残余物, 以得到二苄基甲醇化合物 (1.7g)。在乙醇 (25mL) 中溶解所得的二苄基甲醇化合物 (1.7g)。将浓盐酸 (0.42mL) 和催化量的 10% 钨 - 碳加入溶液中, 并在室温下于氢气气氛中搅拌该混合物 18 个小时。过滤除去催化剂, 并在减压下浓缩滤出液。向残余物中加入乙酸乙酯 (100mL), 并用饱和碳酸氢钠水溶液 (30mL) 和盐水 (30mL) 清洗该混合物。用无水硫酸钠干燥有机层, 并在减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 8/1) 纯化残余物, 以得到 2 - (4 - 乙氧基苄基) 苯酚 (0.85g)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

20 1.39 (3H, t,  $J = 7.1\text{Hz}$ ), 3.93 (2H, s), 4.00 (2H, q,  $J = 7.1\text{Hz}$ ), 4.72 (1H, s), 6.75 - 6.85 (3H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.05 - 7.20 (4H, m)

参照例 8

#### 25 2 - [4 - (3 - 苄氧基 - 丙基) 苄基] 苯酚

由 4 - (3 - 苄氧基 - 丙基) 溴苄 (3.2g)、镁 (0.25g)、催化量的碘和四氢呋喃 (10.5mL) 来制备 Grignard 试剂。向所得的 Grignard 试剂溶液中加入 2 - (甲氧基甲氧基) 苯甲醛 (1.1g) 的四氢呋喃 (24mL) 溶液, 并在  $65^\circ\text{C}$  搅拌该混合物 25 分钟。冷却至环境温度后, 向反应混合物中加入饱和的氯化铵溶液 (10mL) 和水 (20mL), 并用乙酸乙酯 100mL 萃取该混合物。用水 (20mL) 和盐水 (20mL) 清洗该萃取物。在用无水硫酸钠干燥该萃取物后, 在减压下除去溶剂, 并在硅胶上

用柱色谱(洗脱剂:己烷/乙酸乙酯=5/1)纯化残余物,以得到二苄基甲醇化合物(2.5g)。在乙醇(42mL)中溶解所得的二苄基甲醇化合物(2.5g),将催化量的10%钨-碳粉末加入溶液中,并在室温下于氢气气氛中搅拌该混合物7.5个小时。过滤除去催化剂,并在减压下浓缩滤出液。在硅胶上用柱色谱(洗脱剂:己烷/乙酸乙酯=5/2)纯化残余物,以得到苄丙醇化合物(1.6g)。在二氯甲烷(29mL)中溶解所得的苄丙醇化合物(1.6g)之后,将4-(二甲基氨基)吡啶(0.069g)、三乙基氨(1.0mL)和苯甲酰氯(0.79mL)加入溶液中,并在室温下搅拌该混合物3小时。向该反应混合物中加入乙酸乙酯(100mL)和水(30mL),并分离有机层。用盐水(30mL)清洗该提取物,无水硫酸钠来干燥,并在减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱(洗脱剂:己烷/乙酸乙酯=20/1)纯化残余物,以得到酯化合物(2.2g)。在室温下搅拌所得的酯化合物(2.2g)、对甲苯磺酸一水合物(0.21g)和甲醇(28mL)的混合物24小时。将反应混合物在减压下浓缩,并在硅胶上用柱色谱(洗脱剂:己烷/乙酸乙酯=5/1)纯化残余物,以得到2-[4-(3-苄甲酰氧基丙基)苄基]苯酚(1.8g)。

15  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

2.00 - 2.15 (2H, m), 2.70 - 2.80 (2H, m), 3.96 (2H, s), 4.33 (2H, t,  $J = 6.5\text{Hz}$ ), 4.74 (1H, brs), 6.75 - 6.85 (1H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.05 - 7.20 (6H, m), 7.35 - 7.50 (2H, m), 7.50 - 7.65 (1H, m), 8.00 - 8.10 (2H, m)

20

参照例9

#### 2-[4-(2-苄甲酰氧基乙基)苄基]苯酚

标题化合物的制备方法与参照例8所述的相似,只是使用4-(2-苄氧基-乙基)溴苯代替4-(3-苄氧基丙基)溴苯。

25  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

3.04 (2H, t,  $J = 7.1\text{Hz}$ ), 3.98 (2H, s), 4.51 (2H, t,  $J = 7.1\text{Hz}$ ), 4.66 (1H, s), 6.75 - 6.85 (1H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.05 - 7.20 (6H, m), 7.35 - 7.50 (2H, m), 7.50 - 7.60 (1H, m), 7.95 - 8.05 (2H, m)

30



## 参照例 10

5-乙酰氧基甲基-2-(4-乙基苄基)苯酚

在冰冷却下向乙醚 (10mL) 中的氯化铝锂悬浮物中加入 4-(4-乙基苄基)-3-羟基苯甲酸甲酯 (0.27g) 的乙醚 (5mL) 溶液。在回流下加热该混合物 45 分钟之后, 在冰冷却下向反应混合物中依次加入水 (0.1mL)、15% 氢氧化钠水溶液 (0.1mL) 和水 (0.3mL)。在室温下搅拌该混合物 5 分钟之后, 将反应混合物注入 0.5mol/L 盐酸中, 并用乙酸乙酯萃取所得混合物。用无水硫酸镁干燥萃取物, 并在减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 1/1) 纯化残余物, 以得到还原化合物 (0.22g)。在四氢呋喃 (2mL) 中溶解了所得的还原化合物 (0.22g) 之后, 将乙酸乙烯酯 (2mL) 和双(二丁基氯锡)氧化物 (24mg) 加入溶液中, 并在 30°C 搅拌该混合物 19 小时。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 3/1) 直接纯化反应混合物, 以得到 5-乙酰氧基甲基-2-(4-乙基苄基)苯酚 (0.21g)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.21 (3H, t,  $J = 7.6\text{Hz}$ ), 2.09 (3H, s), 2.61 (2H, q,  $J = 7.6\text{Hz}$ ), 3.95 (2H, s), 4.74 (1H, s), 5.03 (2H, s), 6.80 (1H, d,  $J = 1.3\text{Hz}$ ), 6.80 - 6.90 (1H, m), 7.05 - 7.20 (5H, m)

## 参照例 11

20 5-乙酰氧基甲基-2-(4-丙氧基苄基)苯酚

标题化合物的制备方法与参照例 10 所述的相似, 只是使用 3-羟基-4-(4-丙氧基苄基)苯甲酸甲酯代替 4-(4-乙基苄基)-3-羟基苯甲酸甲酯。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.02 (3H, t,  $J = 7.4\text{Hz}$ ), 1.70 - 1.85 (2H, m), 2.09 (3H, s), 3.88 (2H, t,  $J = 6.6\text{Hz}$ ), 3.91 (2H, s), 5.02 (2H, s), 5.28 (1H, s), 6.70 - 6.90 (4H, m), 7.00 - 7.20 (3H, m)

## 参照例 12

30 2-[4-(2-乙酰氧基乙基)苄基]-5-乙酰氧基甲基苯酚

标题化合物的制备方法与参照例 10 所述的相似, 只是使用 3-羟基-4-[4-

- (2-羟基乙基)苄基]苯甲酸甲酯代替 4-(4-乙基苄基)-3-羟基苯甲酸甲酯。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

2.03 (3H, s), 2.09 (3H, s), 2.90 (2H, t,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 3.96 (2H, s), 4.25  
5 (2H, t,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 4.82 (1H, s), 5.03 (2H, s), 6.80 (1H, d,  $J=1.5\text{Hz}$ ),  
6.87 (1H, dd,  $J=1.5, 7.7\text{Hz}$ ), 7.05 - 7.20 (5H, m)

参照例 13

### 2-(4-乙硫基苄基)苯酚

10 由 1-溴-4-(乙硫基)苯 (1.1g)、镁 (0.12g)、催化量的碘和四氢呋喃 (5mL) 来制备 Grignard 试剂。向 Grignard 试剂溶液中加入 2-(甲氧基甲氧基)苯甲醛 (0.56g) 的四氢呋喃 (12mL) 溶液, 并在  $65^\circ\text{C}$  搅拌该混合物 10 分钟。冷却至环境温度后, 向反应混合物中加入饱和的氯化铵水溶液 (5mL) 和水 (20mL), 并用乙酸乙酯 (80mL) 萃取该混合物。用水 (20mL) 和盐水 (20mL) 清洗该萃  
15 取物, 并用无水硫酸钠干燥, 然后在减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 4/1) 纯化残余物, 以得到二苄基甲醇化合物 (0.91g)。在二氯甲烷 (15mL) 中溶解所得的二苄基甲醇化合物 (0.91g)。向溶液中加入 Dess-Martin 试剂 [1,1,1-三(乙酰氧基)-1,1-二氢-1,2-benziodoxol-3(1H)-酮] (1.5g), 并在  $25^\circ\text{C}$  将该混合物搅拌 26 小时。向反应混合物中加入乙醚 (75mL) 和 1mol/L  
20 氢氧化钠水溶液 (30mL), 剧烈地搅拌该混合物, 并分离有机层。用 1mol/L 氢氧化钠水溶液 (30mL), 水 (30mL, 3次) 和盐水 (30mL) 清洗有机层, 用无水硫酸钠干燥, 并在减压下除去该溶剂。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 15/1 - 9/1) 纯化残余物, 以得到酮化合物 (0.82g)。在  $60^\circ\text{C}$  搅拌所得的酮化合物 (0.81g)、对甲苯磺酸一水合物 (0.10g) 和甲醇 (14mL) 4 小时。在冷却至室  
25 温后, 于减压下浓缩该反应混合物。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 15/1) 纯化残余物, 以得到脱保护的化合物 (0.69g)。在四氢呋喃 (11mL) 中溶解所得的脱保护的化合物 (0.68g), 将三乙基胺 (0.41mL) 和氯甲酸甲酯 (0.22mL) 加入溶液中, 并在  $25^\circ\text{C}$  搅拌该混合物 1 小时。而且, 将三乙基胺 (0.11mL) 和氯甲酸甲酯 (0.061mL) 加入反应混合物中, 并搅拌该混合物 30 分钟。过滤该混合物,  
30 并在减压下浓缩该滤出物。在四氢呋喃 (14mL) 和水 (7mL) 中溶解残余物, 将

硼氢化钠 (0.40g) 加入溶液中, 并在 25°C 搅拌该混合物 7 小时。向反应混合物中滴加 1mol/L 盐酸 (15mL), 混合物用乙酸乙酯 (75mL) 萃取。用水 (20mL)、饱和碳酸氢钠水溶液 (20mL) 和盐水 (20mL) 清洗萃取物, 用无水硫酸钠干燥, 并在减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 己烷/乙酸乙酯 = 8/1) 纯化残余物, 以得到 2-(4-乙硫基苄基) 苯酚。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.29 (3H, t,  $J = 7.3\text{Hz}$ ), 2.90 (2H, q,  $J = 7.3\text{Hz}$ ), 3.96 (2H, s), 4.62 (1H, s), 6.75 - 6.80 (1H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.05 - 7.20 (4H, m), 7.20 - 7.30 (2H, m)

10

参照例 14

2-(4-甲氧基苄基) 苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷

向 2-(4-甲氧基苄基) 苯酚 (46mg) 和 2,3,4,6-四-O-乙酰基-1-O-三氯乙亚氨基酰基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖 (0.13g) 的二氯甲烷 (2mL) 溶液中加入三氟化硼乙醚复合物 (0.033mL), 并在室温下搅拌该混合物 1 小时。在氨基硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 二氯甲烷) 纯化反应混合物, 以得到 2-(4-甲氧基苄基) 苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.91 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.08 (3H, s), 3.77 (3H, s), 3.80 - 3.95 (3H, m), 4.17 (1H, dd,  $J = 2.5\text{Hz}, 12.2\text{Hz}$ ), 4.29 (1H, dd,  $J = 5.5, 12.2\text{Hz}$ ), 5.11 (1H, d,  $J = 7.5\text{Hz}$ ), 5.10 - 5.25 (1H, m), 5.25 - 5.40 (2H, m), 6.75 - 6.85 (2H, m), 6.95 - 7.10 (5H, m), 7.10 - 7.25 (1H, m)

参照例 15

2-(4-甲基苄基) 苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与参照例 14 所述的相似, 只是使用 2-(4-甲基-苄基) 苯酚代替 2-(4-甲氧基苄基) 苯酚。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.89 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.30 (3H, s), 3.85 - 3.95 (3H, m), 4.17 (1H, dd,  $J = 2.5, 12.3\text{Hz}$ ), 4.28 (1H, dd,  $J = 5.5,$

30

12.3Hz), 5.11 (1H, d, J = 7.5Hz), 5.10 - 5.25 (1H, m), 5.25 - 5.40 (2H, m), 6.90 - 7.20 (8H, m)

参照例 16

5 2-(4-乙基苄基)苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与参照例 14 所述的相似, 只是使用 2-(4-乙基-苄基)苯酚代替 2-(4-甲氧基苄基)苯酚。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:

1.20 (3H, t, J = 7.6Hz), 1.87 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.08  
10 (3H, s), 2.60 (2H, q, J = 7.6Hz), 3.80 - 4.00 (3H, m), 4.18 (1H, dd, J = 2.3, 12.2Hz), 4.28 (1H, dd, J = 5.4, 12.2Hz), 5.11 (1H, d, J = 7.5Hz), 5.10 - 5.25 (1H, m), 5.25 - 5.40 (2H, m), 6.90 - 7.25 (8H, m)

参照例 17

15 2-(4-异丁基苄基)苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与参照例 14 所述的相似, 只是使用 2-(4-异丁基-苄基)苯酚代替 2-(4-甲氧基苄基)苯酚。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:

0.88 (6H, d, J = 6.6Hz), 1.75 - 1.90 (1H, m), 1.87 (3H, s), 2.0 (3H, s),  
20 2.05 (3H, s), 2.08 (3H, s), 2.42 (2H, d, J = 7.2Hz), 3.80 - 3.95 (3H, m), 4.18 (1H, dd, J = 2.4, 12.3Hz), 4.29 (1H, dd, J = 5.5, 12.3Hz), 5.11 (1H, d, J = 7.6Hz), 5.10 - 5.25 (1H, m), 5.25 - 5.40 (2H, m), 6.90 - 7.25 (8H, m)

25 参照例 18

2-(4-乙氧基苄基)苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与参照例 14 所述的相似, 只是使用 2-(4-乙氧基-苄基)苯酚代替 2-(4-甲氧基苄基)苯酚。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:

30 1.39 (3H, t, J = 7.0Hz), 1.91 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.07

(3H, s), 3.80 - 3.95 (3H, m), 3.99 (2H, q, J = 7.0Hz), 4.18 (1H, dd, J = 2.5, 12.3Hz), 4.28 (1H, dd, J = 5.6, 12.3Hz), 5.10 (1H, d, J = 7.7Hz), 5.15 - 5.25 (1H, m), 5.25 - 5.40 (2H, m), 6.75 - 6.85 (2H, m), 6.95 - 7.10 (5H, m), 7.10 - 7.20 (1H, m)

5

参照例 19

2 - (4 - 异丙氧基苄基) 苯基 2,3,4,6 - 四 - O - 乙酰基 -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与参照例 14 所述的相似, 只是使用 2 - (4 - 异丙氧基 - 苄基) 苯酚代替 2 - (4 - 甲氧基苄基) 苯酚。

10  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.30 (6H, d, J = 6.0Hz), 1.90 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.08 (3H, s), 3.80 - 3.90 (3H, m), 4.18 (1H, dd, J = 2.3, 12.3Hz), 4.28 (1H, dd, J = 5.5, 12.3Hz), 4.48 (1H, 七重峰, J = 6.0Hz), 5.10 (1H, d, J = 7.7Hz), 5.10 - 5.25 (1H, m), 5.25 - 5.40 (2H, m), 6.70 - 6.85 (2H, m), 6.90 - 7.10 (5H, m), 7.10 - 7.20 (1H, m)

15

参照例 20

5 - 乙酰氧甲基 - 2 - (4 - 乙基苄基) 苯基 2,3,4,6 - 四 - O - 乙酰基 -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷

20 标题化合物的制备方法与参照例 14 所述的相似, 只是使用 5 - 乙酰氧基 - 甲基 - 2 - (4 - 乙基苄基) 苯酚代替 2 - (4 - 甲氧基苄基) 苯酚。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.20 (3H, t, J = 7.6Hz), 1.88 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.09 (3H, s), 2.60 (2H, q, J = 7.6Hz), 3.80 - 3.95 (3H, m), 4.20 (1H, dd, J = 2.4, 12.3Hz), 4.27 (1H, dd, J = 5.3, 12.3Hz), 5.00 - 5.10 (2H, m), 5.13 (1H, d, J = 7.4Hz), 5.15 - 5.40 (3H, m), 6.95 - 7.15 (7H, m)

25

参照例 21

30 乙酰氧基甲基 - 2 - (4 - 丙氧基苄基) 苯基 2,3,4,6 - 四 - O - 乙酰基 -  $\beta$  - D - 吡喃

葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与参照例 14 所述的相似，只是使用 5-乙酰氧基-甲基-2-(4-丙氧基苄基)苯酚代替 2-(4-甲氧基苄基)苯酚。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

5 1.01 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 1.70-1.85 (2H, m), 1.92 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.09 (3H, s), 3.80-3.95 (5H, m), 4.20 (1H, dd,  $J=2.4, 12.3\text{Hz}$ ), 4.27 (1H, dd,  $J=5.3, 12.3\text{Hz}$ ), 5.00-5.10 (2H, m), 5.12 (1H, d,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 5.15-5.40 (3H, m), 6.75-6.85 (2H, m), 6.95-7.10 (5H, m)

10

参照例 22

2-[4-(2-乙酰氧基乙基)苄基]-5-乙酰氧基甲基苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与参照例 14 所述的相似，只是使用 2-[4-(2-乙酰氧基乙基)苄基]-5-乙酰氧基甲基苯酚代替 2-(4-甲氧基苄基)苯酚。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

15 1.89 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.09 (3H, s), 2.88 (2H, t,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 3.85-3.95 (3H, m), 4.15-4.35 (4H, m), 5.00-5.10 (2H, m), 5.13 (1H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 5.15-5.40 (3H, m), 6.95-7.15  
20 (7H, m)

实施例 1

2-(4-甲氧基苄基)苯基  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷

将甲醇钠 (28% 甲醇溶液: 0.12mL) 加入 2-(4-甲氧基苄基)苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (0.11g) 的甲醇 (4mL) 溶液中，并在室温下搅拌混合物 30 分钟。在减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇 = 10/1) 纯化残余物，以得到 2-(4-甲氧基苄基)苯基  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (65mg)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

30 3.35-3.55 (4H, m), 3.69 (1H, dd,  $J=5.1, 12.1\text{Hz}$ ), 3.73 (3H, s), 3.80

- 4.00 (2H, m), 4.03 (1H, d, J = 15.1Hz), 4.91 (1H, d, J = 7.4Hz), 6.75 - 6.85 (2H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 6.95 - 7.10 (1H, m), 7.10 - 7.20 (4H, m)

#### 5 实施例 2

##### 2-(4-甲基苄基)苯基 β-D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与实施例 1 所述的相似, 只是使用 2-(4-甲基苄基)苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷代替 2-(4-甲氧基苄基)苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷。

#### 10 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:

2.27 (3H, s), 3.35 - 3.55 (4H, m), 3.69 (1H, dd, J = 5.2, 12.0Hz), 3.80 - 3.90 (1H, m), 3.94 (1H, d, J = 15.0Hz), 4.05 (1H, d, J = 15.0Hz), 4.85 - 4.95 (1H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 6.95 - 7.20 (7H, m)

#### 15 实施例 3

##### 2-(4-乙基苄基)苯基 β-D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与实施例 1 所述的相似, 只是使用 2-(4-乙基苄基)苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷代替 2-(4-甲氧基苄基)苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷。

#### 20 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:

1.15 - 1.25 (3H, m), 2.50 - 2.65 (2H, m), 3.35 - 3.55 (4H, m), 3.65 - 3.75 (1H, m), 3.80 - 4.00 (2H, m), 4.06 (1H, d, J = 14.9Hz), 4.85 - 5.00 (1H, m), 6.85 - 7.00 (1H, m), 7.00 - 7.20 (7H, m)

#### 25 实施例 4

##### 2-(4-异丁基苄基)苯基 β-D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与实施例 1 所述的相似, 只是使用 2-(4-异丁基苄基)苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷代替 2-(4-甲氧基苄基)苯基 2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖苷。

#### 30 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:

0.80 - 0.95 (6H, m), 1.70 - 1.90 (1H, m), 2.41 (2H, d, J = 7.1Hz), 3.30 - 3.55 (4H, m), 3.60 - 3.75 (1H, m), 3.80 - 3.95 (1H, m), 3.95 (1H, d, J = 15.0Hz), 4.06 (1H, d, J = 15.0Hz), 4.85 - 4.95 (1H, m), 6.80 - 7.20 (8H, m)

5

## 实施例 5

2 - (4 - 乙氧基苄基) 苄基  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与实施例 1 所述的相似, 只是使用 2 - (4 - 乙氧基苄基) 苄基 2,3,4,6 - 四 - O-乙酰基 -  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷代替 2 - (4 - 甲氧基苄基) 苄基 2,3,4,6 - 四 - O-乙酰基 -  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。

10

 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.35 (3H, t, J = 6.8Hz), 3.35 - 3.55 (4H, m), 3.60 - 3.75 (1H, m), 3.80 - 4.10 (5H, m), 4.90 (1H, d, J = 7.1Hz), 6.70 - 6.85 (2H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.00 - 7.20 (5H, m)

15

## 实施例 6

2 - (4 - 异丙氧基苄基) 苄基  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与实施例 1 所述的相似, 只是使用 2 - (4 - 异丙氧基苄基) 苄基 2,3,4,6 - 四 - O-乙酰基 -  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷代替 2 - (4 - 甲氧基苄基) 苄基 2,3,4,6 - 四 - O-乙酰基 -  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。

20

 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.27 (6H, d, J = 6.0Hz), 3.35 - 3.55 (4H, m), 3.69 (1H, dd, J = 5.4, 12.1Hz), 3.88 (1H, dd, J = 2.0, 12.1Hz), 3.91 (1H, d, J = 15.0Hz), 4.02 (1H, d, J = 15.0Hz), 4.51 (1H, 七重峰, J = 6.0Hz), 4.91 (1H, d, J = 7.7Hz), 6.70 - 6.85 (2H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.00 - 7.10 (1H, m), 7.10 - 7.20 (4H, m)

25

## 实施例 7

5 - 羟基甲基 - 2 - (4 - 异丙氧基苄基) 苄基  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与实施例 1 所述的相似, 只是使用 5 - 乙酰氧基甲基 -

30



2 - (4 - 异丙氧基苄基) 苄基 2,3,4,6 - 四 - O - 乙酰基 -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷代替 2 - (4 - 甲氧基苄基) 苄基 2,3,4,6 - 四 - 邻乙酰基 -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

1.02 (3H, t,  $J = 7.4\text{Hz}$ ), 1.70 - 1.85 (2H, m), 3.30 - 3.55 (4H, m), 3.65 -  
5 3.75 (1H, m), 3.80 - 3.95 (4H, m), 4.00 (1H, d,  $J = 15.0\text{Hz}$ ), 4.54 (2H, s), 4.93 (1H, d,  $J = 7.4\text{Hz}$ ), 6.70 - 6.85 (2H, m), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.02 (1H, d,  $J = 7.7\text{Hz}$ ), 7.05 - 7.20 (3H, m)

#### 实施例 8

10 2 - (4 - 乙基苄基) - 5 - 羟甲基苄基  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与实施例 1 所述的相似, 只是使用 5 - 乙酰氧基甲基 - 2 - (4 - 乙基苄基) 苄基 2,3,4,6 - 四 - O - 乙酰基 -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷代替 2 - (4 - 甲氧基苄基) 苄基 2,3,4,6 - 四 - O - 乙酰基 -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

15 1.19 (3H, t,  $J = 7.6\text{Hz}$ ), 2.57 (2H, q,  $J = 7.6\text{Hz}$ ), 3.30 - 3.55 (4H, m), 3.65 - 3.75 (1H, m), 3.80 - 4.00 (2H, m), 4.04 (1H, d,  $J = 15.0\text{Hz}$ ), 4.54 (2H, s), 4.93 (1H, d,  $J = 7.4\text{Hz}$ ), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.02 (1H, d,  $J = 7.7\text{Hz}$ ), 7.06 (2H, d,  $J = 8.1\text{Hz}$ ), 7.10 - 7.20 (3H, m)

#### 20 实施例 9

2 - [4 - (2 - 羟乙基) 苄基] - 5 - 羟甲基苄基  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷

标题化合物的制备方法与实施例 1 所述的相似, 只是使用 2 - [4 - (2 - 乙酰氧基乙基) 苄基] - 5 - 乙酰氧基甲基苄基 2,3,4,6 - 四 - O - 乙酰基 -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷代替 2 - (4 - 甲氧基苄基) 苄基 2,3,4,6 - 四 - O - 乙酰基 -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷。  
25

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

2.76 (2H, t,  $J = 7.1\text{Hz}$ ), 3.30 - 3.55 (4H, m), 3.60 - 3.75 (3H, m), 3.85 -  
4.00 (2H, m), 4.05 (1H, d,  $J = 14.6\text{Hz}$ ), 4.54 (2H, s), 4.92 (1H, d,  $J = 7.2\text{Hz}$ ), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.03 (1H, d,  $J = 7.9\text{Hz}$ ), 7.09 (2H, d,  $J = 7.8\text{Hz}$ ),  
30 7.10 - 7.20 (3H, m)

### 实施例 10

#### 2-[4-(2-羟乙基)苄基]苯基 β-D-吡喃葡萄糖苷

向甲苯 (5.2mL) 和二氯甲烷 (2.2mL) 中的 2-[4-(2-苯甲酰氧基乙基)苄基]苯酚 (0.49g) 和 1,2,3,4,6-四-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖 (1.7g) 5 溶液中加入三氯化硼乙醚复合物 (0.56mL), 并在 25°C 下搅拌该混合物 8 小时。向反应混合物中加入乙酸乙酯 (70mL) 和饱和碳酸氢钠水溶液 (25mL), 并分离有机层。用盐水 (25mL) 清洗有机层并用无水硫酸钠干燥, 在减压下除去溶剂。残余物溶解在甲醇 (5mL) 和四氢呋喃 (2.5mL) 中, 将甲醇钠 (28% 甲醇溶液, 0.14mL) 加入溶液中, 并在 25°C 搅拌所得的混合物 12.5 小时。向反应混合物中加 10 入乙酸乙酯 (75mL) 和水 (20mL), 并分离有机层。用盐水 (20mL) 清洗有机层并用无水硫酸钠干燥, 减压下除去溶剂。残余物溶解在甲醇 (7.5mL) 中, 将甲醇钠 (28% 甲醇溶液, 0.085mL) 加入溶液中, 并在 25°C 搅拌所得的混合物 5 小时。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇 = 4/1) 纯化反应混合物。在减压下除去溶剂, 向残余物中加入乙醚, 并通过过滤来收集所得的沉淀。用乙醚清洗所得的 15 固体并在减压下干燥, 以得到 2-[4-(2-羟乙基)苄基]苯基 β-D-吡喃葡萄糖 (0.47g) 苷。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:

2.76 (2H, t, J = 7.1Hz), 3.35 - 3.55 (4H, m), 3.65 - 3.75 (3H, m), 3.88 (1H, dd, J = 1.8, 11.8Hz), 3.95 (1H, d, J = 15.2Hz), 4.07 (1H, d, J = 15.2Hz), 20 4.90 (1H, d, J = 7.4Hz), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.00 - 7.20 (7H, m)

### 实施例 11

#### 2-[4-(3-羟丙基)苄基]酚 β-D-吡喃葡萄糖

标题化合物的制备方法与实施例 10 所述的相似, 只是使用 2-[4-(3-苯 25 甲酰氧基-丙基)苄基]苯酚代替 2-[4-(2-苯甲酰氧基乙基)-苄基]苯酚。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:

1.70 - 1.85 (2H, m), 2.55 - 2.65 (2H, m), 3.30 - 3.60 (6H, m), 3.69 (1H, dd, J = 5.2, 11.9Hz), 3.88 (1H, dd, J = 2.0, 11.9Hz), 3.95 (1H, d, J = 15.1Hz), 4.06 (1H, d, J = 7.3Hz), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.00 - 7.20 (7H, m)

## 实施例 12

2 - (4 - 乙硫基苄基) 苄基  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷

向甲苯 (6.3mL) 和二氯甲烷 (2.7mL) 中的 2 - (4 - 乙硫基苄基) 苯酚 (0.51g) 和 1,2,3,4,6 - 五 - O - 乙酰基 -  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖 (2.4g) 溶液中加入三氟化硼乙醚  
5 复合物 (0.78mL), 并在室温下搅拌该混合物 9 小时。向反应混合物中加入乙酸乙酯 (70mL) 和饱和碳酸氢钠水溶液 (25mL), 并分离有机层。用盐水 (25mL) 清洗有机层并用无水硫酸钠干燥, 在减压下除去溶剂。残余物溶解在甲醇 (10.5mL) 中, 将甲醇钠 (28% 甲醇溶液, 0.08mL) 加入溶液中, 并在 25°C 搅拌混合物 18  
10 小时。向反应混合物中加入乙酸乙酯 (75mL) 和水 (20mL), 并分离有机层。用盐水 (20mL) 清洗有机层并用无水硫酸钠干燥, 减压下除去溶剂。在硅胶上用柱色谱 (洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇 = 10/1) 纯化残余物。在减压下除去溶剂, 向残余物中加入乙醚, 并通过过滤来收集最终的沉淀。用二乙醚清洗所得的无色固体并在减压下干燥, 以得到 2 - (4 - 乙硫基苄基) 苄基  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷 (0.47g)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:

15 1.24 (3H, t,  $J = 7.3\text{Hz}$ ), 2.88 (2H, q,  $J = 7.3\text{Hz}$ ), 3.35 - 3.55 (4H, m), 3.69 (1H, dd,  $J = 5.0, 12.2\text{Hz}$ ), 3.88 (1H, dd,  $J = 2.0, 12.2\text{Hz}$ ), 3.95 (1H, d,  $J = 15.1\text{Hz}$ ), 4.08 (1H, d,  $J = 15.1\text{Hz}$ ), 4.91 (1H, d,  $J = 7.3\text{Hz}$ ), 6.85 - 7.00 (1H, m), 7.00 - 7.10 (1H, m), 7.10 - 7.30 (6H, m)

## 20 试验例 1

对人 SGLT2 的活性的抑制作用的试验

## 1) 表达人 SGLT2 的质粒载体的构建

使用 SUPERSRIPT 预扩增系统 (Gibco - BRL: LIFE TECHNOLOGIES), 以寡脱氧胸腺嘧啶作为引物, 通过来自于人肾脏 (Ori 基因) 的总 RNA 的反转录  
25 来制备用于 PCR 扩增的 cDNA 库。编码人 SGLT2 的 DNA 片段通过使用 Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene) 的 PCR 反应来扩增, 其中, 上述人肾脏的 cDNA 库用作模板, 由序列号 1 和 2 分别表示的以下寡核苷酸 0702F 和 0712R 用作引物。根据试验盒的标准方法, 将扩增的 DNA 片段连接入 pCR - Blunt (Invitrogen) (用于克隆的载体) 中。根据常规方法转化活性细胞 (Escherichia coil HB101 (Toyobo)), 然后在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 琼脂培养基上进行转化体的选择。在从一种转化体  
30

中萃取和纯化质粒 DNA 后, 通过使用 Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene) 的 PCR 反应来扩增编码人 SGLT2 的 DNA 片段, 其中, 由序列号 3 和 4 分别表示的以下寡核苷酸 0714F 和 0715R 用作引物。用限制酶 (Xho I 和 Hind III) 来消化扩增的 DNA 片段, 然后用 Wizard 纯化系统 (Promega) 纯化。将该纯化的 DNA 片段插入

5 pcDNA3.1 (-) Myc/His-A (Invitrogen) (用于表达融合蛋白质的载体) 相应的限制酶位点。根据常规方法转化活性细胞 (Escherichia coil HB101 (Toyobo)), 然后在含有 100 $\mu$ g/mL 氨必西林的 LB 琼脂培养基上进行转化体的选择。在从该转化体中萃取和纯化质粒 DNA 后, 分析插入在载体 pcDNA3.1 (-) Myc/His-A 的多重克隆位点的 DNA 片段的序列。与 Wells et al (Am.J.Physiol., Vol.263, pp.459-465(1992)) 所

10 报道的相比, 该克隆具有单碱基取代 (编码异亮氨酸的 ATC 被 GTC 取代)。因而, 得到了用缬氨酸取代异亮氨酸的克隆。将表达人 SGLT2 的该质粒载体命名为 KL29, 其中, 由序列号 5 表示的肽被融合到羧基末端的丙氨酸上。

序列号 1 ATGGAGGAGCACACAGAGGC  
 序列号 2 GGCATAGAAGCCCCAGAGGA  
 15 序列号 3 AACCTCGAGATGGAGGAGCACACAGAGGC  
 序列号 4 AACCAAGCTTGGCATAGAAGCCCCAGAGGA  
 序列号 5 KLGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

## 2) 瞬时性地表达人 SGLT2 的细胞的制备

20 通过电穿孔将 KL29 (编码人 SGLT2 的质粒) 转染入 COS-7 细胞 (RIKEN CELL BANK RCB0539)。在条件: 0.290kV、975 $\mu$ F、COS-7 的  $2 \times 10^6$  个细胞和在 0.4cm 型试管中 500 $\mu$ l OPTI-MEM I 培养基 (Gibco-BRL:LIFE TECHNOLOGIES) 中的 20 $\mu$ g KL29, 使用 GENE PULSER II (Bio-Rad 实验室) 进行电穿孔。在基因转移后, 通过离心和用 OPTI-MEM I 培养基 (1mL/试管) 再悬浮, 收获细胞。向 96 坑平板的

25 各坑中加入 125 $\mu$ L 该细胞悬浮体。在 5% CO<sub>2</sub> 下于 37 $^{\circ}$ C 的温度培养了一夜后, 将 125 $\mu$ L 含有 10% 胎牛血清 (Sanko Jyunyaku)、100 单位/mL 青霉素 G 钠 (Gibco-BRL: LIFE TECHNOLOGIES)、100 $\mu$ g/mL 链霉素硫酸盐 (Gibco-BRL: LIFE TECHNOLOGIES) 的 DMEM 培养基 (Gibco-BRL: LIFE TECHNOLOGIES) 加入各坑中。培养到第二天后, 使用这些细胞测定摄入甲

30 基 -  $\alpha$  - D - 吡喃葡萄糖苷的活性抑制作用。

3) 摄入甲基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷的活性抑制作用的测定

在除去了瞬时性地表达人 SGLT2 的 COS-7 细胞的培养基后, 向各坑中加入 200 $\mu$ L 预处理缓冲液 (含有 140mM 胆碱盐酸盐、2mM 氯化钾、1mM 氯化钙、1mM 氯化镁、10mM 2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸和 5mM 三(羟甲基)氨基甲烷的 pH 值为 7.4 的缓冲液), 并将细胞在 37 $^{\circ}$ C 孵化 10 分钟。除去预处理缓冲液并再加入 200 $\mu$ L 同样的缓冲液, 然后将细胞在 37 $^{\circ}$ C 孵化 10 分钟。将 7 $\mu$ L 甲基- $\alpha$ -D-(U-14C)吡喃葡萄糖苷(Amersham Pharmacia Biotech)加入 525 $\mu$ L 含有试验样品的用于摄入的缓冲液 (含有 140mM 氯化钠、2mM 氯化钾、1mM 氯化钙、1mM 氯化镁、5mM 甲基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷、10mM 2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸和 5mM 三(羟甲基)氨基甲烷的 pH 值为 7.4 的缓冲液)中, 并混合该混合物, 然后制备测定摄入用的缓冲液。为了对照, 制备没有试验化合物的测定摄入用的缓冲液。为了评价在没有试验化合物和钠的条件下的基础摄入, 类似地制备含有 140mM 胆碱盐酸盐替代氯化钠的测定基础摄入用的缓冲液。在除去预处理缓冲液后, 将 75 $\mu$ L 测定摄入用的缓冲液加入各坑中, 在 37 $^{\circ}$ C 孵化细胞 2 小时。在除去测定摄入用的缓冲液后, 将 200 $\mu$ L 清洗缓冲液 (含有 140mM 胆碱盐酸盐、2mM 氯化钾、1mM 氯化钙、1mM 氯化镁、10mM 甲基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷、10mM 2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸和 5mM 三(羟甲基)氨基甲烷的 pH 值为 7.4 的缓冲液)加入各坑中, 并立即除去。在额外的两次清洗后, 通过向各坑中加入 75 $\mu$ L 0.2N 氢氧化钠来溶解细胞。在细胞的溶胞产物转移到 PicoPlate (Packard) 后并将 150 $\mu$ L MicroScint-40 (Packard) 加入各坑后, 用微型板闪烁计数器 TopCount (Packard) 测定放射性。通过从对照的基础摄入中减去放射性得到以 100% 值表示的摄入差, 然后通过最小二乘法从浓度-抑制曲线来计算 50% 摄入抑制的浓度 (IC<sub>50</sub> 值)。结果示于下表 1。

〔表 1〕

试验化合物	IC <sub>50</sub> 值 (nM)
实施例 1	350
实施例 2	450
实施例 3	140
实施例 4	500
实施例 5	330
实施例 6	370
实施例 7	140
实施例 8	8.1
实施例 9	27
实施例 10	210
实施例 11	75
实施例 12	110

### 试验例 2

#### 对尿液中排泄葡萄糖的促进作用的试验

- 5 使用整夜禁食的 SD 大鼠 (SLC., 雄性, 7 星期大, 180 - 240g) 作为试验动物。在 300 $\mu$ L 乙醇中悬浮或溶解 10mg 试验化合物, 并加入 1.2mL 聚乙二醇 400 和 1.5mL 盐水来溶解, 从而制备 3.3mg/mL 溶液。用 2.7mL 溶液稀释 300 $\mu$ L 该溶液 (盐水: 聚乙二醇 400: 乙醇 = 5: 4: 1), 从而制备 0.33mg/mL 溶液。
- 10 在测量大鼠的体重后, 将试验化合物以 3mL/kg (1mg/kg) 的剂量静脉注射入尾静脉中。作为对照, 仅将溶液 (盐水: 聚乙二醇 400: 乙醇 = 5: 4: 1) 以 3mL/kg 的剂量静脉注射入尾静脉中。在静脉内注射至尾静脉后, 立即将 200g/L 的葡萄糖溶液以 10mL/kg (2g/kg) 的剂量使大鼠口服。用 26G 注射针和 1mL 的注射器对鼠尾部进行静脉注射。使用大鼠用胃管和 2.5mL 的注射器进行口服。每组中有 2 或 3 只。在完成了口服葡萄糖后, 在代谢笼中收集尿。收集尿
- 15 的取样时间为口服葡萄糖后的 24 小时。在收集完尿后, 记录尿的量并测量尿液中葡萄糖的浓度。使用实验室试验试剂盒来测量葡萄糖的浓度: 葡萄糖 B -

试验 WAKO (Wako 纯化学工业有限公司)。从尿的量、尿液中葡萄糖的浓度和体重来计算每 200g 体重在 24 小时内尿液中排泄的葡萄糖的量。结果示于下表 2。

5 [表 2]

试验化合物	尿液中排泄的葡萄糖的量 (mg)
实施例 1	27.4
实施例 7	109.1
实施例 8	238.9
实施例 10	69.5

### 实施例 3

#### 急性毒性试验

10 将 5 星期大的雄性 ICR 小鼠 (CLEA 日本, INC. 29 - 34g, 各组中有 5 只动物) 禁食 4 小时, 并将由向 2 - [4 - (2 - 羟基 - 乙基) 苄基] 苄基  $\beta$  - D - 吡喃葡萄糖苷 (如实施例 10 所述的化合物) 中加入盐水: 聚乙二醇 400: 乙醇 = 5: 4: 1 所制备的 666 mg/mL 悬浮体以 3mL/kg (2000mg/kg) 的剂量进行皮下注射。在注射后 24 小时未观察到死亡。

### 15 工业应用性

本发明的由上述通式 (I) 表示的吡喃葡萄糖氧基苄基苯衍生物对人 SGLT2 的活性具有极好的抑制作用。本发明可提供预防或治疗糖尿病、糖尿病的并发症、肥胖等。另外, 由于在制造由上述通式 (I) 表示的化合物中作为中间体的由上述通式 (II) 表示的化合物很重要, 本发明的由上述通式 (I) 表示的化  
20 合物易于通过该化合物来制备。