

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	選択的 SGLT2 阻害薬 Remogliflozin etabonate の創薬研究
作成者（著者）	清水, 和夫
公開者	東邦大学
発行日	2021.03.17
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 加藤 恵介 /
著者版フラグ	ETD
報告番号	32661甲1011号
学位記番号	甲第133号
学位授与年月日	2021.03.17
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28193521

東邦大学審査学位論文（博士）

学位論文

選択的 SGLT2 阻害薬 Remogliflozin etabonate の創薬研究

2020 年度

東邦大学大学院 薬学研究科

清水 和夫

本文中の以下の用語及び試薬は以下のように略記した。

QOL	quality of life
GLP-1	glucagon-like peptide-1
Ms	methanesulfonyl
Ac	acethyl
THF	tetrahydrofuran
DME	1,2-dimethoxyethane
Bn	benzyl
Piv	pivaloyl
HPLC	high performance liquid chromatography
CL int	intrinsic clearance
NMR	nuclear magnetic resonance
Papp	apparent permeability coefficient
AUC	area under the curve
F	bioavailability
STZ	streptozotocin
CKD	chronic kidney disease
DMSO	dimethyl sulfoxide
EtOAc	ethyl acetate
AMG	alpha-methyl-D-glucopyranoside

目次

第1章	緒言	1
第1節	糖尿病概要と既存治療の課題	1
第2節	SGLT2 の機能と創薬標的	2
第3節	SGLT2 阻害薬の開発状況	3
第4節	本研究の概略	4
第2章	本研究に用いた化合物の合成	5
第1節	4-ベンジルピラゾール-3-イル α -グルコシド誘導体 1-7 及び 9-17 及びの合成	5
第2節	4-(2-フェニルエチル)インダゾール-3-イル α -グルコシド誘導体 8 の合成	8
第3節	18 及び N-置換ピラゾール-3-イル α -グルコシド誘導体 19-22 の合成	9
第3章	リード化合物の探索	10
第1節	WAY-123783 のマウスにおける尿糖排泄促進効果のメカニズム考察	10
第2節	リード化合物と展開方針	11
第4章	リード化合物の最適化1	12
第1節	グルコシド結合の代謝安定性の改善を志向したアグリコン部の変換	12
第2節	リンカー部の活性コンフォメーションに与える影響	15
第3節	末端ベンゼンの置換基導入位置の検討と置換基展開	17
第5章	リード化合物の最適化 2	20
第1節	膜透過性向上を志向した新たな展開部位の探索	20
第2節	プロドラッグ化	24

第6章	総括.....	26
	謝辞.....	28
第7章	実験の部.....	29
第8章	参考文献.....	50

第1章 緒言

第1節 糖尿病概要と既存治療の課題

糖尿病は、インスリン作用の不足により生じる慢性の高血糖を主徴とする代謝症候群と定義される¹⁾。糖尿病は成因により、1型、2型、その他の特定の機序、疾患によるもの、妊娠糖尿病に分類される¹⁾。1型糖尿病は、おもに自己免疫を基礎にした膵β細胞の破壊性病変によりインスリンの欠乏が生じて発症し、典型的には若年者に急激に発症するとされてきたが、あらゆる年齢層に起こり得る。2型糖尿病は、インスリン分泌低下とインスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）をきたす複数の遺伝的要因に、過食・運動不足などの生活習慣による肥満や加齢などが環境因子として加わり、インスリン作用不足を生じて発症する糖尿病である¹⁾。多くは中年以後に発病するとされてきたが、近年、小児・若年者にも2型糖尿病が増加している¹⁾。日本人の糖尿病患者では、95%以上が2型であると言われている²⁾。

国際糖尿病連合の報告では、2019年の世界の糖尿病罹患率は9.3%（4億6300万人）と推定され、2019年の糖尿病関連医療費は推定7600億米ドルに達した。パンデミックに対処するための十分な対策が施されなければ、2030年までに10.2%（5億7800万）、2045年までに10.9%（7億）に上昇する可能性を報告している³⁾。本邦においても、糖尿病が強く疑われる者（糖尿病有病者）の人口に対する割合は男性18.7%、女性9.3%と過去10年で増加傾向にある⁴⁾。

高血糖状態が長期に及ぶと、網膜、腎、神経を代表とする多くの臓器に機能・形態の異常をきたし、進展すれば視力障害、腎不全、下肢の壊疽などの重大な結果をもたらす可能性がある。また、糖尿病は動脈硬化症を促進し、心筋梗塞、脳卒中、下肢の閉塞性動脈硬化症などの原因となる⁵⁾。近年では、膵臓癌や肝臓癌などの悪性腫瘍の合併、歯周疾患、骨折や認知機能障害リスクの増大など多面的な併発しやすい疾患の存在が指摘され、QOLの低下だけでなく患者の生命をもおびやかす⁶⁾。

糖尿病治療の目標は、高血糖に起因する代謝異常を改善することに加え、糖尿病に特徴的な合併症の発症を抑制し、動脈硬化性疾患（冠動脈疾患、脳血管障害、末梢動脈疾患）への進展を阻止することや、糖尿病に併発しやすい疾患の発症、憎悪を防ぎ、良好な QOL を維持し、健康な人と変わらない寿命を確保することである⁶⁾。食事療法と運動療法では血糖コントロールが不十分な場合、病態や高血糖状態に合わせて経口血糖降下薬や、注射によるインスリンあるいは GLP-1 受容体作動薬が処方される⁶⁾。多様なメカニズムによる経口抗糖尿病薬の臨床利用が可能だが、低血糖や体重増加などの副作用が確認されているため、安全で長期間投与可能な新しいクラスの抗糖尿病薬の需要が増加している⁷⁾。

第 2 節 SGLT2 の機能と創薬標的

食事として摂取された炭水化物は、最終的に消化管上皮でグルコースやガラクトースなどの単糖に分解され吸収される。主なエネルギー源であるグルコースは高親水性のため疎水性の脂質二重膜を通過できない。このため、細胞内への取り込みには糖輸送体と呼ばれる膜たんぱくが必要となる。糖輸送体は大きく促進拡散型糖輸送体（Glucose transporter : GLUT）と能動型糖輸送体（Sodium-glucose co-transporter : SGLT）に分けられる。

SGLT は solute carrier family 5A (SLC5A) に属する 14 回膜貫通型のトランスポーターであり、現在までに SGLT1～SGLT6 の 6 種類のアイソフォームが確認されている。その中でも、SGLT1 及び SGLT2 に関する研究が特に進んでいる。

SGLT2 は腎臓の近位尿細管（S1 セグメント）に発現する膜タンパク質であり、糸球体濾過された原尿中に含まれるグルコースの約 90%の再吸収を担っている⁸⁾。SGLT2 遺伝子の Loss of Function 変異は、家族性腎性尿糖を呈するものの、その他臨床的な異常所見はないことが報告されている⁹⁾。このことから、SGLT2 阻害薬は、腎臓におけるグルコースの再吸収を阻害して尿中に余分なグルコースを排泄することによる血糖降下作用が期待され、これまで

にない安全で新規なメカニズムの抗糖尿病薬となることが期待される^{10), 11)}。

さらに、SGLT2 阻害薬は心腎保護作用を有することが示されており、現在では2型糖尿病患者に対する第二選択薬として推奨されている^{12), 13), 14)}。

第3節 SGLT2 阻害薬の開発状況

現在7種類のSGLT2 阻害薬が抗糖尿病薬として米国、欧州、及び/または日本で発売され¹⁵⁾、近年、ソタグリフロジンが1型糖尿病薬として承認された¹⁶⁾。これらのSGLT2 阻害薬はすべてC-アリアルグルコシドとその類似体である。SGLT 阻害薬の起源であるフロリジンは、アグリコンであるフロレチンとグルコースが結合した配糖体であり、1835年にリンゴの樹皮から単離された。(Figure 1)。フロリジンは静脈内投与や皮下投与によりSGLT 阻害を介して尿中に糖を排泄することが知られていたものの¹⁷⁾、消化管に存在するβ-グルコシダーゼによりグルコシド結合が速やかに分解され、十分な有効血中濃度を維持できないため、経口投与による尿糖排泄効果は確認されない^{17), 18)}。また、フロリジンはSGLT1 阻害活性も有している¹⁹⁾。SGLT1 は消化管においてグルコース及びガラクトースの吸収を担っているため、SGLT1 の消化管での阻害により未吸収の糖成分に基づく消化管症状に懸念がある。事実、SGLT1 遺伝子のLoss of Function 変異は、グルコース/ガラクトース吸収不良による重度の下痢及び脱水を引き起こす²⁰⁾。これらの課題から、フロリジンは現在まで臨床応用されていない。

フロリジンのO-グルコシド結合の安定性向上を志向し、ダパグリフロジンに代表されるC-グルコシド誘導体が精力的に研究された。O-グルコシド誘導体としては、フロリジン誘導体であるT-1095 (Figure 1) が田辺製薬(現田辺三菱製薬)により見出され²¹⁾、フロリジンのいくつかの欠点を克服し、経口薬効を有するSGLT2 阻害薬として臨床試験に進んだが、その後開発は中止された¹¹⁾。

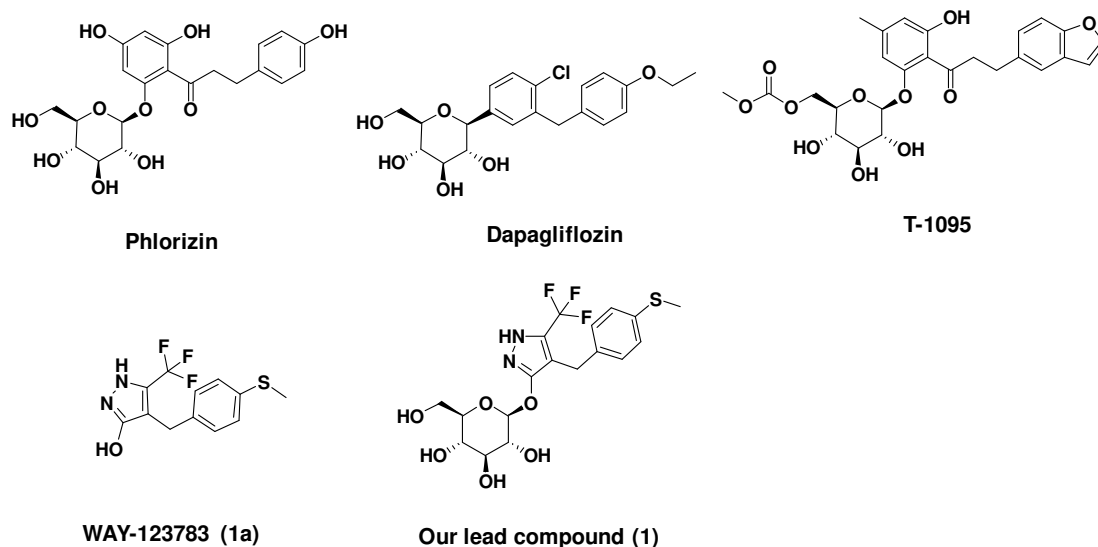


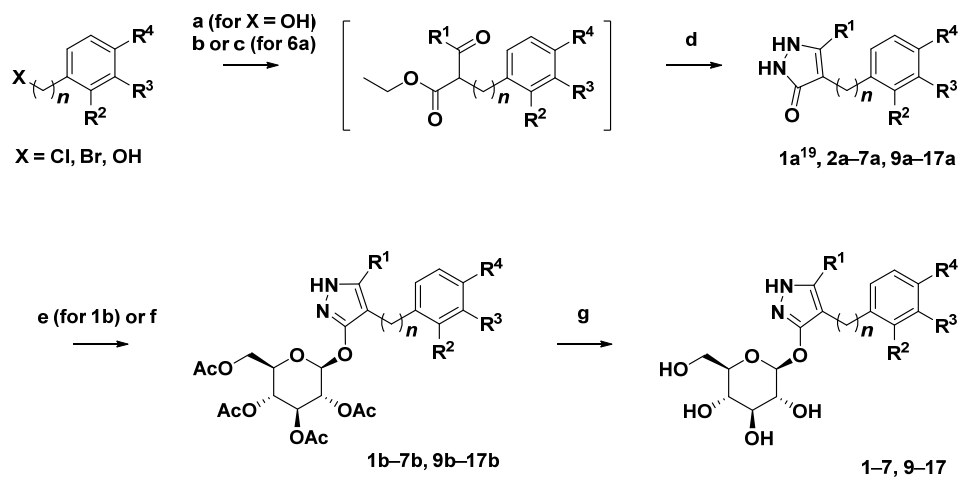
Figure 1. Structure of SGLT inhibitors and WAY-123783.

第4節 本研究の概略

著者らは、WAY-123783 (Figure 1, **1a**) のマウスでの尿糖排泄促進効果に着目し、マウス尿中代謝物検索により、非フロリジンタイプであるベンジルピラゾールイル *O*-グルコシド誘導体を活性代謝物として同定した。本代謝物をリード化合物 (**1**) として、フロリジンの課題であった SGLT2 選択性及び経口薬効の獲得に焦点をあて最適化研究を実施した。結果、高度に修飾されたレモグリフロジンエタボナート (RE) の発見に至り、2019年4月に抗糖尿病薬としてインドで発売された。本稿では、*O*-グルコシドタイプ SGLT2 阻害薬として初めて市販された RE の構造活性相関及び発見経緯について報告する。

第2章 本研究に用いた化合物の合成

第1節 4-ベンジルピラゾール-3-イル O-グルコシド誘導体1-7及び9-17の合成



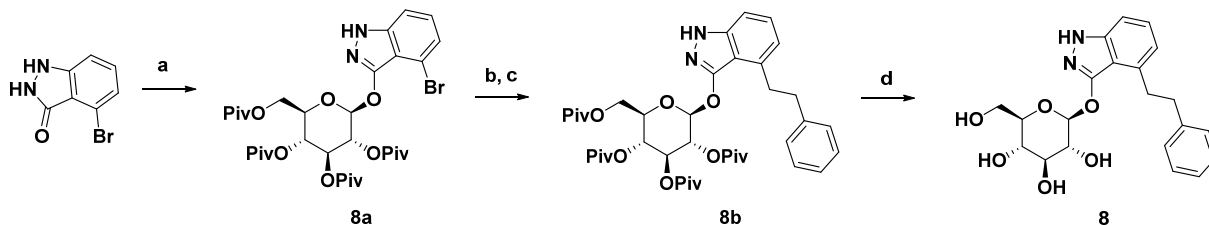
Compound	n	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	1	CF ₃	H	H	SMe
2	1	Me	H	H	SMe
3	1	Et	H	H	SMe
4	1	<i>i</i> Pr	H	H	SMe
5	1	Me	H	H	H
6	2	Me	H	H	H
7	3	Me	H	H	H
9	1	Me	Me	H	H
10	1	Me	H	Me	H
11	1	Me	H	H	Me
12	1	Me	H	H	Et
13	1	Me	H	H	<i>n</i> Pr
14	1	Me	H	H	<i>i</i> Pr
15	1	Me	H	H	OMe
16	1	Me	H	H	OEt
17	1	Me	H	H	OnPr

Scheme 1. Reagents and conditions: (a) MsCl, Et₃N, THF, 0 °C; (b) NaH, R¹COCH₂CO₂Et, THF or DME, 0 °C to reflux; (c) K₂CO₃, methyl acetoacetate, toluene, 75 °C; (d) N₂H₄-H₂O, toluene, rt to reflux, (2 or 3 steps, 16–70%); (e) K₂CO₃, acetobromoglucose, CH₃CN, rt, 57%; (f) 5 M NaOH aq., BnN(*n*Bu)₃Cl, acetobromoglucose, CH₂Cl₂, rt, (6–25%); (g) NaOMe, MeOH, rt, (43–74%).

4-ベンジルピラゾール *O*-グルコシド誘導体 **1-7** 及び **9-17** を Scheme 1 に示す方法により合成した。ベンジルアルコール体を原料として用いる場合、ヒドロキシ基を塩化メタンシルホニル (MsCl) とトリエチルアミンを用いてメタンシルホニル化し次の反応に用いた。ベンジルハライドまたはメシラートを水素化ナトリウムの存在下、ケトエステルと反応させて 2 置換ケトエス

テルを得た。続いて、ヒドラジン 1 水和物を用いてピラゾロン環を構築し、アグリコン **2a-7a** 及び **9a-17a** を得た。ジクロロメタン及び水酸化ナトリウム水溶液からなる 2 相系溶媒中、相間移動触媒 ($\text{BnN}(n\text{Bu})_3\text{Cl}$) (**1a** の場合はアセトニトリル中、炭酸カリウム) の存在下、アセトブロモグルコースを用いて配糖化を行い、グルコシド **1b-7b** 及び **9b-17b** を得た。最後に、保護基であるアセチル基を、メタノール溶媒中、ナトリウムメトキシドによる加溶媒分解によって除去して、**1-7** 及び **9-17** を得た²²⁾。

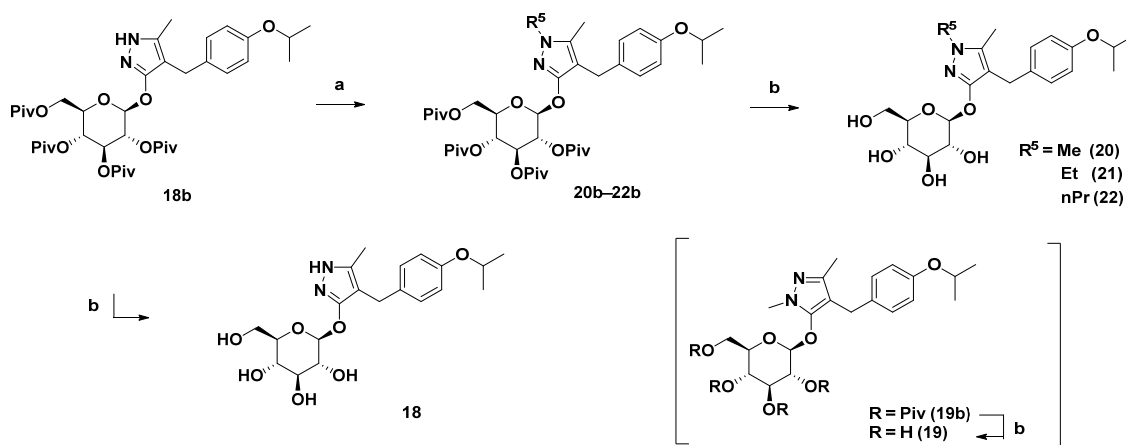
第2節 4-(2-フェニルエチル)インダゾール-3-イル O-グルコシド誘導体 **8** の合成



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) 2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- α -D-glucopyranosyl bromide, K_2CO_3 , CH_3CN , rt, 30%; (b) styrene, $Pd(OAc)_2$, tri(*o*-tolyl)phosphine, Et_3N , CH_3CN , reflux, 41%; (c) H_2 , Pd-C, THF, rt, 94%; (d) LiOH- H_2O , MeOH, rt, 60%.

4-(2-フェニルエチル)インダゾール-3-イル O-グルコシド誘導体 **8** を Scheme 2 に示す方法により合成した。4-ブロモ-1,2-ジヒドロ-3*H*-インダゾール-3-オンを 2,3,4,6-テトラ-*O*-ピバロイル- α -D-グルコピラノシルブロミドと炭酸カリウムを用いて配糖化した。スチレンを用いた Mizoroki-Heck 反応、続く二重結合の接触水素化によってフェネチル基を導入した **8b** を得た。**8b** の構造は単結晶 X 線構造解析により確認した²³⁾。最後に、メタノール中、水酸化リチウムを用いた加溶媒分解によって糖上の保護基であるピバロイル基を除去し、**8** を得た。

第3節 18 及び N-置換ピラゾール-3-イル O-グルコシド誘導体
19-22 の合成



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) R^5I , NaH, 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone, rt, 6.9% (**19b**), 51% (**20b**), 71% (**21b**), 78% (**22b**); (b) NaOMe, MeOH, rt, (59-67%).

18 及び N-置換ピラゾール-3-イル O-グルコシド誘導体 **19-22** を Scheme 3 に示す方法により合成した。**18** は、小林らによって報告された方法²⁴⁾に従って合成した **18b** をメタノール溶媒中、ナトリウムメトキシドを用いて加溶媒分解することにより合成した。N-置換ピラゾール-3-イル O-グルコシド誘導体 **19b-22b** は、水素化ナトリウムの存在下、対応するヨウ化アルキルと **18b** のアルキル化によって合成した。**19b** は、**20b** の副生成物としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって単離された。メタノール溶媒中、ナトリウムメトキシドを用いた加溶媒分解により糖上の保護基であるピバロイル基を除去し、**19-22** を得た²⁴⁾。

第3章 リード化合物の探索

第1節 WAY-123783 のマウスにおける尿糖排泄促進効果のメカニズム考察

著者らは、フロリジン誘導体とは異なる新規骨格の SGLT2 阻害薬創製を目指し、WAY-123783 に着目した。Wyeth 社（現ファイザー）によって見出されたピラゾール誘導体 WAY-123783 は、db/db マウスへの経口投与により血糖降下作用を示し、また、正常マウスへの投与により、尿糖排泄を亢進することが報告されている²⁵⁾。本化合物が非配糖体の新規骨格の SGLT2 阻害物質であると考え、WAY-123783 の SGLT2 阻害活性を評価したところ、予想に反し、10 μ M まで阻害活性が認められなかった。このことから、WAY-123783 の尿糖排泄促進作用には、活性代謝物が関与している可能性があると考えた。WAY-123783 をマウスに経口投与し、尿中代謝物を探索したところ、主要な代謝物として、グルクロン酸及びグルコース抱合体が検出された。フロリジンや T-1095 の構造を参考に、 β -D-グルコシド誘導体 **1** を化学合成したところ、HPLC において代謝物と保持時間が一致した。続く活性評価により、強力な SGLT2 阻害活性が認められたことから、WAY-123783 の活性代謝物は、O-グルコース抱合体であると判断した。興味深いことに、ラットでは本代謝反応はほとんど起こらないため、ラットにおいては、WAY-123783 の投与による尿糖排泄作用は確認されない。

化合物 **1** は、フロリジンと異なり、糖に結合する芳香環がピラゾール環であり、フロリジンの有するジヒドロカルコン骨格の水酸基と比較し、グルコシダーゼ耐性が改善されている可能性がある。著者らは、新規な骨格からなる化合物 **1** を本研究のリード化合物に設定し、最適化展開を実施する事とした。なお、WAY-123783 のグルコース抱合体活性代謝物に関する検討結果は、我々の検討と同時期に大角（味の素）らのグループからも報告されている²⁶⁾。大角らは、末端ベンゼンの置換基がエチル基である WA-2-12 を用いて配糖体を合成し、SGLT 阻害活性を確認している。

第2節 リード化合物と展開方針

化合物 **1** の初期プロファイリングを実施した結果、比較的強力な SGLT1 阻害活性を示し、また、ラット PK 試験において、低バイオアベイラビリティであることが確認された。この原因を検証するため、ラット消化管 S9 による代謝安定性を確認したところ、速やかにグルコシド結合が加水分解されたアグリコンへの変換が認められた。このことより、糖に結合する芳香環の違いによる β -グルコシダーゼ耐性獲得に期待したものの、フロリジンと同様にグルコシド結合の安定性に乏しいことが確認された。以上の結果から、hSGLT2 に対する選択性の向上と代謝安定性の向上による経口吸収性の改善を目指し最適化研究を開始した。

第4章 リード化合物の最適化1

第1節 グルコシド結合の代謝安定性の改善を志向したアグリコン部の変換

フェニルグルコシドの β -グルコシダーゼによる加水分解は、ベンゼン環への電子求引性置換基の導入により促進されることが報告されている²⁷⁾。フロリジンの配糖化部位であるフェノールも、オルト位に電子求引性置換基であるカルボニル基を有している。これらの情報に基づき、化合物 **1** の β -グルコシダーゼ耐性を獲得するために、電子求引性置換基であるピラゾール 5 位のトリフルオロメチル基の変換を検討した (Table 1)。化合物 **1** のトリフルオロメチル基をメチル基 (**2**) に変換したところ、SGLT2 阻害活性が約 3 倍上昇した一方で、SGLT1 阻害活性は 4 倍減弱した。結果として、SGLT2 選択性が大きく向上したことから、SGLT2 阻害活性向上と選択性獲得のために好ましい変換であることが確認された。続いて、ラット消化管 S9 による代謝安定性を評価したところ、代謝クリアランスが 73.2 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ から 3.2 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ に顕著に改善したことから、本骨格においても、ベンゼン環同様、ピラゾール環置換基の電子求引性が β -グルコシダーゼによる加水分解に対する安定性の低下の一因になることが示唆された。一方、メチル基 (**2**) のエチル基 (**3**) やイソプロピル基 (**4**) への伸長においては、SGLT2 阻害活性が大きく低下し、SGLT2 選択性も低下したことから、この部位の置換基は、メチル基が最適であると判断した。フロリジンの SGLT1 及び SGLT2 とのドッキングモデルに関する最近の研究において²⁸⁾、アグリコンテイルの中心環の周囲のアミノ酸が SGLT1 と SGLT2 で異なっており、SGLT2 においては、芳香環で囲まれたポケット (H80、F98、H268) を形成しているのに対し、SGLT1 では、ヒスチジンはグルタミン酸であり、D268 は、近傍の R267 と塩橋を形成していることが報告されている。このようなアグリコン中心環部の周囲のアミノ酸環境が、ピラゾール 5 位置換基の立体的かさ高さの違いによる選択性の差異の要因である可能性がある (Figure 2)。

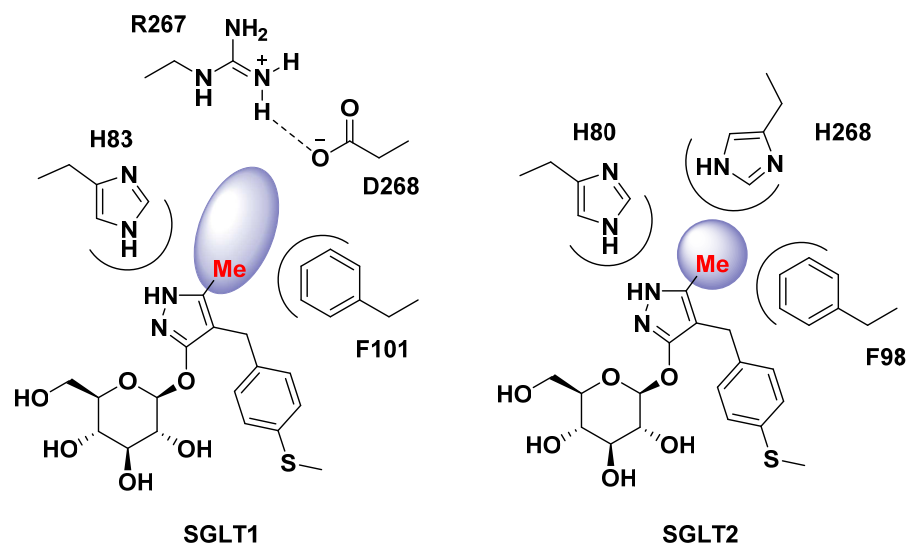
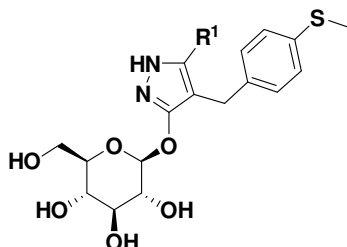


Figure 2. The consideration of the subtype selectivity related to the bulkiness of the pyrazole substituent.

Table 1. In vitro inhibitory activity, selectivity, and metabolic stability of compounds 1–4



Compound	R ¹	IC ₅₀ (nM) ^a		Selectivity ^b	Metabolic stability ^c CL int (μL/min/mg)
		hSGLT2	hSGLT1		
1	CF ₃	16.3 ± 0.7	109 ± 19	6.7	73.2
2	Me	4.9 ± 0.5	405 ± 29	83	3.2
3	Et	51.2 ± 14.9	378 ± 18	7.4	4.8
4	<i>i</i> Pr	154 ± 23	468 ± 37	3.0	4.6

^a Concentration of each compound required to inhibit [¹⁴C]-α-methyl-D-glucopyranoside by 50%. Data represent the mean ± standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments unless otherwise stated. ^b Selectivity values were calculated as IC₅₀ hSGLT1/IC₅₀ hSGLT2. ^c Incubated with rat intestinal S9.

第2節 リンカー部の活性コンフォメーションに与える影響

続いて、フロリジンとの構造活性相関の比較と基本骨格の妥当性を検証するために、最適なリンカー長について検討した (Table 2)。メチルチオ基を除去した基本構造である化合物 **5** においても、一定の SGLT2 阻害活性が残ることを確認した後に、メチレン部をエチレン (**6**) 及びプロピレン (**7**) に伸長したところ、著しく活性が低下した。フロリジンでは、両ベンゼン環は 3 炭素リンカーである一方、本骨格では、同じ 3 炭素リンカーで連結した誘導体 (**7**) では活性が低下し、1 炭素リンカーが最も良好な活性となったことから、コンフォメーションの違いによる影響を想定した。過去に報告されているフロリジンのコンフォメーションの検討において、リンカー部のカルボニル基とフェノール性水酸基は分子内水素結合を形成しており²⁹⁾、この擬似環の形成により、末端ベンゼン環を含む側鎖のコンフォメーションは規制されると考えられる (Figure 3)。

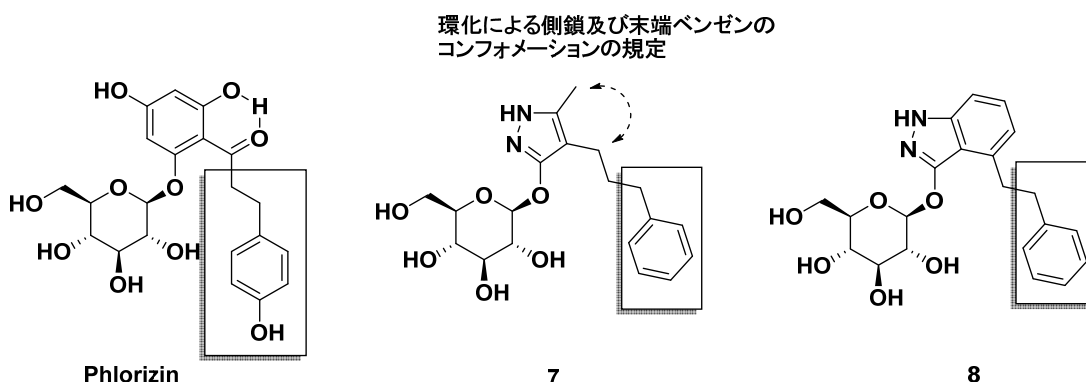
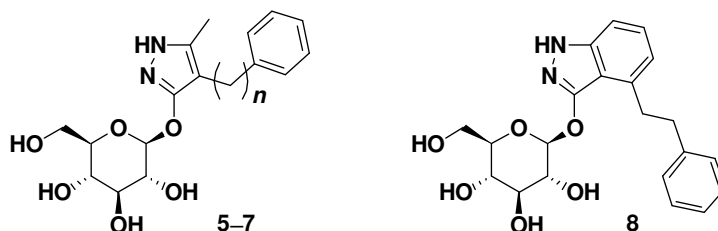


Figure 3. The consideration of the difference of SAR between phlorizin and compound 7.

従って、この擬似 6 員環をベンゼン環でミミックしたインダゾール誘導体 (**8**) を評価したところ、強力な SGLT2 阻害活性が確認され、仮説が検証された (Table 2)。一方、本誘導体においては、SGLT1 阻害活性も向上し、フロリジンと同様 SGLT2 選択性が低下したため、これ以上の検討は中止した。なお、類似のコンセプトで、フロリジンのケト/フェノールを 5 員ヘテロ環で縮環した誘導体も複数報告されている³⁰⁾。化合物 **8** と同様、強力な SGLT2 阻害活性

は魅力的ではあるものの、SGLT2 への選択性は低く、高選択的な SGLT2 阻害薬の取得を目指す上では、不利な骨格系列であると考えられた。

Table 2. In vitro inhibitory activity and selectivity of compounds 5–8



Compound	n	IC ₅₀ (nM) ^a		Selectivity ^b
		hSGLT2	hSGLT1	
5	1	181 ± 12	1320 ± 69	7.3
6	2	5290 ± 939	31500 ± 7610	6.0
7	3	3950 ± 651	23700 ± 1700	6.0
8	-	86.0 ± 2.9	150 ± 15	1.7

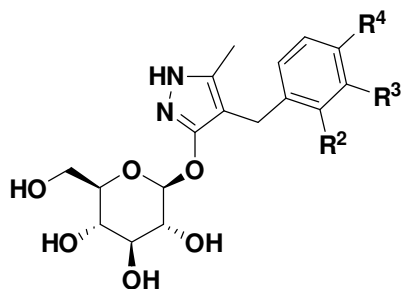
^a Concentration of each compound required to inhibit [¹⁴C]- α -methyl-D-glucopyranoside by 50%. Data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments unless otherwise stated. ^b Selectivity values were calculated as IC₅₀ hSGLT1/IC₅₀ hSGLT2.

第3節 末端ベンゼンの置換基導入位置の検討と置換基展開

フロリジン誘導体の展開において、末端ベンゼン環部への置換基導入が尿糖の排泄促進に影響を及ぼすことが報告されていることから、SGLT2 阻害活性への寄与が示唆される³¹⁾。我々の研究においても、末端ベンゼン環が無置換である化合物 **5** と比較し、4 位にメチルチオ基を有する化合物 **2** で SGLT2 阻害活性の向上が確認されている。フロリジン誘導体における展開を参考に、メチル基導入の置換基効果を 2 位から 4 位まで確認したところ、明確な傾向が確認され、4 位への導入のみ、SGLT2 活性の向上が認められた (Table 3)。近年、精力的に展開されているベンジルフェニル骨格を有する C-グルコシド誘導体においても、末端ベンゼン環部の 4 位置換基が中心的に展開されており³²⁾、種々の骨格を通じ、有力な展開部位の一つと考えられた。

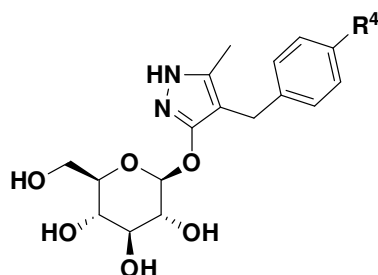
続いて、最適な 4 位置換基を探索した (Table 4)。メチル基 (**11**) のエチル基 (**12**) への伸長は SGLT2 阻害活性と選択性の両方を改善し、イソプロピル誘導体 (**14**) は活性が減弱したものの、アルキル基の展開の中では最も高い選択性を示した。続いて、アルコキシ基の導入について検討した結果、化合物 **15-18** は化合物 **11** と同程度の SGLT2 阻害活性を示した。アルコキシ基の伸長は、SGLT2 阻害活性に変化はないものの、炭素数の増加とともに SGLT1 阻害活性を低下させ、結果として SGLT2 に対する選択性を向上させた。中でもイソプロポキシ基の導入された化合物 **18** は、良好な SGLT2 阻害活性と高い選択性を示し、最もバランスの取れた化合物であることから、さらなる評価に進める化合物として選定した。

C-アリアルグルコシド誘導体の上市薬において、末端ベンゼン環部の 4 位置換基は、エチル基やエトキシ基等、直鎖のアルキルやアルコキシ基が選択されている^{12), 32)}。筆者らは、ピラゾール誘導体 **1** を起点とした構造活性相関研究により、末端ベンゼン環の置換基としてイソプロポキシ基が優れた特徴を有することを明らかにした。

Table 3. In vitro inhibitory activity and selectivity for compound **9–11**

Compound	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ (nM) ^a		Selectivity ^b
				hSGLT2	hSGLT1	
9	Me	H	H	914 ± 211	1630 ± 349	1.8
10	H	Me	H	757 ± 82	8710 ± 1630	12
11	H	H	Me	12.2 ± 1.2	321 ± 29	26

^a Concentration of each compound required to inhibit [¹⁴C]- α -methyl-D-glucopyranoside by 50%. Data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments unless otherwise stated. ^b Selectivity values were calculated as IC₅₀ hSGLT1/IC₅₀ hSGLT2.

Table 4. In vitro inhibitory activity and selectivity of compounds **12–18**

Compound	R ⁴	IC ₅₀ (nM) ^a		Selectivity ^b
		hSGLT2	hSGLT1	
12	Et	3.9 ± 0.6	233 ± 48	60
13	<i>n</i> Pr	8.8 ± 1.2	345 ± 38	39
14	<i>i</i> Pr	16.2 ± 0.9	1690 ± 416	104
15	OMe	12.3 ± 1.6	626 ± 133	51
16	OEt	10.8 ± 0.4	1030 ± 64	95
17	<i>On</i> Pr	15.4 ± 2.3	1630 ± 143	106
18	O<i>i</i>Pr	10.0 ± 1.2	2780 ± 148	279

^a Concentration of each compound required to inhibit [¹⁴C]- α -methyl-D-glucopyranoside by 50%. Data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments unless otherwise stated. ^b Selectivity values were calculated as IC₅₀ hSGLT1/IC₅₀ hSGLT2.

第5章 リード化合物の最適化2

第1節 膜透過性向上を志向した新たな展開部位の探索

化合物 **18** のラット PK 試験を実施したところ、ラット消化管 S9 代謝安定性試験において良好な安定性を示したにも関わらず、低バイオアベイラビリティであることが確認された (Table 6)。この原因として、化合物 **18** は、複数の水素結合性ドナーを有することに起因する高い親水性により、膜透過性が低下している可能性が考えられた。この考察から、未検討の展開部位であるピラゾール 1 位もしくは 2 位への置換基導入による脂溶性の調整について検討した。まず、メチル基を 2 位に導入した化合物 **19** は SGLT2 阻害活性の顕著な低下が確認された (Table 5)。一方で、メチル基を 1 位に導入した化合物 **20** では、10 倍程度 SGLT2 阻害活性が低下するものの SGLT2 阻害活性は保持し、一定の SGLT2 選択性も確認された。本展開で確認された、ピラゾール環上の置換基導入部位による活性に与える影響の違いについて、1 位への導入時、¹H-NMR スペクトルの変化は無置換 **18** と比較し小さいものの、2 位への導入においては、糖部を中心に ¹H-NMR スペクトルの変化が大きい (Figure 4)。グルコピラノシルオキシ基の近傍への置換基導入は、立体的要因により、本化合物のコンフォメーション変化を引き起こし、活性配座からの乖離が大きくなった可能性を推察している。

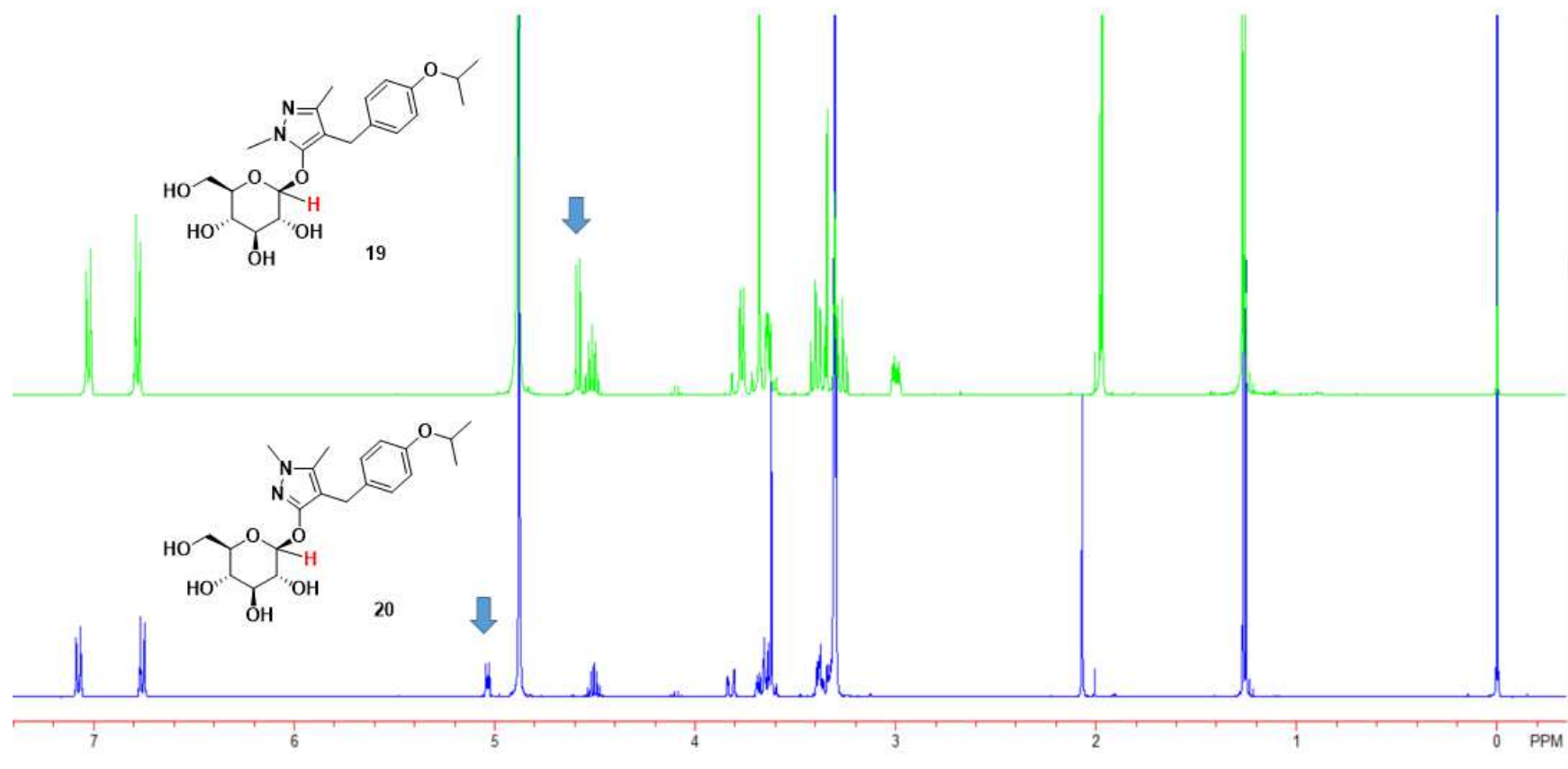
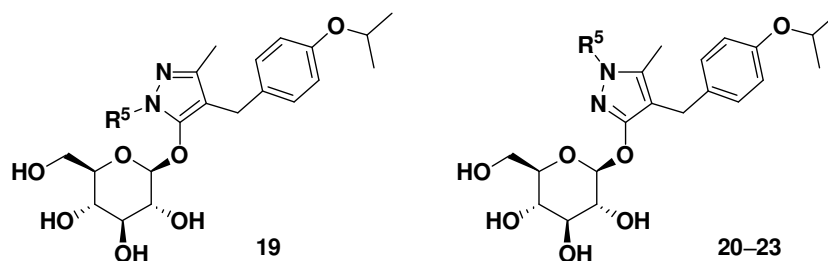


Figure 4. The change of $^1\text{H-NMR}$ spectra by pyrazole N-methylation.

続いて、メチル基の炭素鎖伸長の効果を確認したところ、エチル基 (**21**) 及びプロピル基 (**22**) では、メチル基 (**20**) と比較し、活性が向上したことから、脂溶性が許容される展開部位であることが確認された。さらに、イソプロピル基 (**23**) へと伸長することにより、化合物 **18** に対し、SGLT2 阻害活性は2倍程度減弱しているものの、SGLT2 選択性に優れた化合物 **23** を獲得した。

化合物 **23** の Caco-2 膜透過性を確認したところ、無置換体 **18** と比較し、期待通り P_{app} (apparent permeability coefficient) が 1.02 から 3.16 に改善していることが確認された。一方、N-アルキル誘導体は、一般に酸化的開裂による代謝的不安定性が懸念される³³⁾。N-アルキル誘導体 **19-23** についてヒト肝臓ミクロソーム代謝安定性評価を実施したところ、直鎖アルキル基が導入された誘導体においては、脂溶性の増加に伴い代謝安定性の悪化傾向が確認されたものの、分岐型であるイソプロピル基 **23** では、最も高い安定性を有することが確認された。以上の結果から、良好な血中動態が期待された化合物 **23** について、ラット PK 試験を実施したところ、化合物 **18** と比較し、バイオアベイラビリティが 0.43%から 3.23%に改善され、ピラゾール窒素原子をマスクする明確な効果が確認された。なお、この際に、血中には、脱 N-イソプロピル化した化合物 **18** が検出され、イソプロピル基は、プロドラッグとしての潜在的な機能も持つことが明らかになった。

Table 5. In vitro activity, selectivity, ClogP analysis, and metabolic stability of compounds **18–23**



Compound	R ⁵	IC ₅₀ (nM) ^a		Selectivity ^b	ClogP ^c	Metabolic stability ^d CL int (μL/min/mg)
		hSGLT2	hSGLT1			
18	H	10.0 ± 1.2	2780 ± 148	278	1.21	1.44
19	Me	> 1000	> 100 μM	-	-	N.T.
20	Me	110 ± 21	13600 ± 2270	124	1.33	3.73
21	Et	43.4 ± 16.0	13300 ± 2080	306	1.69	4.15
22	<i>n</i> Pr	66.1 ± 29.6	10300 ± 1190	156	2.21	6.75
23	<i>i</i> Pr	18.4 ± 1.6	16600 ± 1810	902	2.10	0.85

^a Concentration of each compound required to inhibit [¹⁴C]- α -methyl-D-glucopyranoside by 50%. Data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments unless otherwise stated. ^b Selectivity values were calculated as IC₅₀ hSGLT1/IC₅₀ hSGLT2. ^c ClogP was calculated by Chemaxon's Marvin ver. 19.21. ^d Incubated with human liver microsome. N.T., not tested.

第2節 プロドラッグ化

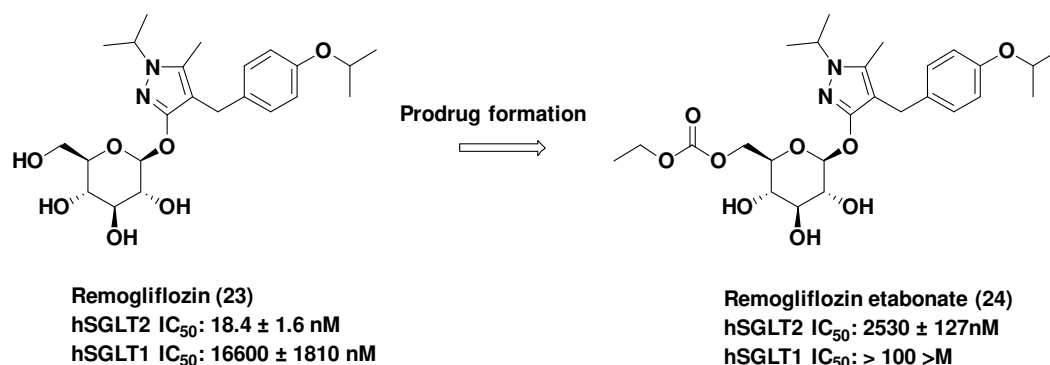


Figure 5. Structure of Remogliflozin (23) and Remogliflozin etabonate (24).

最後に、更なる血中曝露量の改善を目指し、糖部のプロドラッグ化を検討した。フロリジン誘導体の検討において、糖部へのプロドラッグ修飾により、経口投与による尿糖排泄効果の改善が確認されている²¹⁾。フロリジン誘導体での検討を参考に、医薬品としての使用実績や、代謝後に生成するアルコールの影響を考慮し、糖部 6 位水酸基をエトキシカルボニル基で保護したプロドラッグをデザインした (Figure 5)。得られた化合物 **24** は活性が減弱し、また Caco-2 膜透過性は、活性本体 **23** と比較しさらに改善された (Table 6)。Caco-2 膜透過性実験において、基底膜側に活性本体 **23** も多量に検出され、プロドラッグ体の良好な膜透過性が確認された。プロドラッグ体 **24** のラット PK 試験を実施したところ、血中にプロドラッグ体 **24** はほとんど検出されず、活性本体 **23** 及び N-脱アルキル化した活性代謝物である化合物 **18** が検出され、これら化合物の総 AUC は、化合物 **23** を経口投与した際と比べ、大きく改善していることが確認された。化合物 **24** は、正常マウス及び正常ラットへの単回経口投与により尿中への糖の排泄を用量依存的に増加させることが確認された¹⁹⁾。また、STZ 誘発糖尿病ラットにおいても化合物 **24** は用量依存的に糖負荷後の血糖上昇を有意に抑制した¹⁹⁾。以上の検討結果から、SGLT2 阻害活性と SGLT2 選択性に優れ、経口吸収性の良好な化合物 **24** を、開発化合物レモグリフロジンエタボネート (RE : Remogliflozin etabonate) として選定した。

Table 6. ADME profiles and pharmacokinetics data in rats for **18**, **23** and **24**

Compound	Metabolic stability ^a CL int (μL/min/mg)	Caco-2 P _{app} ^b			AUC _(0-tz) (ng*min/mL) ^c		F (%)
		18	23	24	18 ^d	23 ^e	
18	4.1	1.02	N.A.	N.A.	385 ± 130	N.A.	0.43 ^f
23	3.9	N.D.	3.16	N.A.	1833 ± 568	1677 ± 504	3.23 ^g
24	3.4	N.D.	10.11	4.29	4088 ± 1597	3005 ± 1147	5.79 ^h

^a Incubated with rat intestinal S9, ^b P_{app} (10⁻⁶ cm/s) = mL/(μM)·1/cm²·(μM/s)·10⁻⁶, ^c 3 mg/kg oral administration, 0.5% MC (mean ± standard deviation), ^d Plasma concentrations of **18** after single oral administration of **18**, **23**, and **24**, ^e Plasma concentrations **23** after single oral administration of **23** and prodrug **24**, ^f F value of **18** was calculated as a ratio between the AUC of **18** after oral administration and the AUC of **18** after iv administration (1 mg/kg, 20% DMA / 80% saline) of **18**, ^g F value of **23** was calculated as a ratio between the AUC of **23** after oral administration of **23** and the AUC of **23** after iv administration of **23**, ^h F value of **24** was calculated as a ratio between the AUC of **23** after oral administration of **24** and the AUC of **23** after iv administration of **23**, AUC_{0-tz}: the area under the plasma concentration-time curve up to the last observation point, F: bioavailability, N.D.: not detected, N.A.: not applicable.

第6章 総括

本研究では、経口投与可能な新規骨格である SGLT2 選択的阻害薬の創製を目指し、WAY-123783 の活性代謝物 **1** をリード化合物として、構造活性相関を研究した (Figure 6)。ピラゾール 5 位置換基が消化管における代謝安定性と SGLT2 阻害活性に重要であることを見出し、化合物 **1** のトリフルオロメチル基をメチルに変換した。リンカー長について検討した結果、本ピラゾール誘導体においてはメチレンが最適であった。末端ベンゼン環部への置換基導入位置は 4 位が好ましく、イソプロポキシ基が活性と選択性のバランスに優れた置換基であることを明らかにした。また、経口吸収性の改善において、ピラゾール窒素原子が活性及び選択性の観点から修飾可能であることを見出し、ピラゾール 1 位にイソプロピル基を導入し化合物 **23** を獲得した。最後に、フロリジン誘導体での検討を参考に、糖部 6 位水酸基をエトキシカルボニル基で保護したプロドラッグ体である化合物 **24** をデザイン・合成し、経口吸収性の更なる改善を達成した。

最適化された化合物 **24** は、正常マウス及び正常ラットへの単回経口投与により尿中への糖の排泄を用量依存的に増加させ、STZ 誘発糖尿病ラットにおいても用量依存的に糖負荷後の血糖上昇を有意に抑制することが確認されている¹⁹⁾。

創薬段階の合成ルートでは配糖化が低収率であったが、ピラゾール 1 位の NH をアセチル化することで高収率かつ安定的に配糖体を得られることが確認されている。また、糖の保護基をアセチルから塩基性条件に安定なピバロイルに変換することで、配糖化収率の向上だけでなく、配糖化後にピラゾールのアセチルのみを選択的に除去することが可能となり、続くイソプロピル化が効率的に実施可能となった。本検討の詳細は小林らによって報告されている²⁴⁾。

化合物 **24** はレモグリフロジンエタボネート (Remogliflozin etabonate) として臨床開発で有用性が確認され、2019 年、インドにおいて、2 型抗糖尿病薬として上市されている³⁴⁾。また、臨床での知見も既に複数の報告がなされて

いる³⁵⁾。近年、SGLT2 阻害薬は、糖尿病治療効果以外にも CKD の治療効果や心臓病の予防効果等、様々な有益な効果が確認されている³⁶⁾。O-グルコシド型 SGLT2 阻害薬として唯一上市されているレモグリフロジンエタボネートのあらゆる可能性に今後も期待する³⁷⁾。

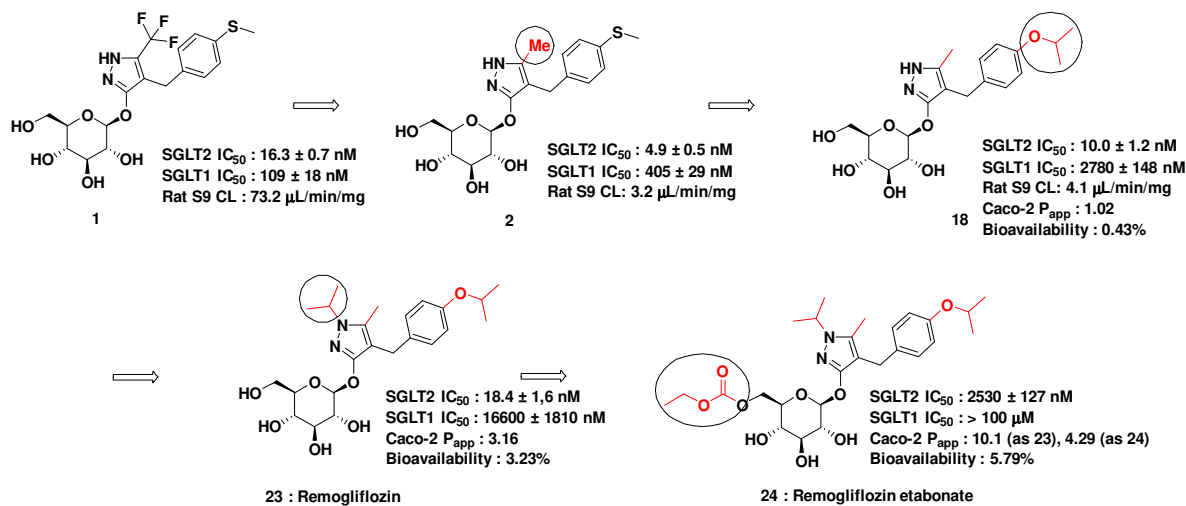


Figure 6 本研究のまとめ

謝辞

本論文の執筆に際し、終始ご懇切なるご指導及びご鞭撻を賜りました東邦大学薬学部 東屋功教授に深甚なる謝意を表します。

有益なご助言を頂きました東邦大学薬学部 加藤恵介教授、宮内正二教授、野口修治教授に謹んで感謝の意を表します。

また、終始多岐にわたりご助言を頂きました東邦大学薬学部 氷川英正准教授、吉川晶子助教に深く感謝いたします。

本研究に際し、多大なるご支援と発表の機会を与えてくださいました、キッセイ薬品工業株式会社代表取締役 神澤陸雄会長並びに代表取締役 降旗喜男社長に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、多大なるご支援とご助言を頂きました、キッセイ薬品工業株式会社監査役 伊佐治正幸博士、常務取締役 竹花泰雄博士、取締役 研究本部長 菊池伸次博士、理事研究統括部長 保屋野雄志博士、研究統括部 参与 伊東史顕博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行と論文化の機会を与えてくださいました、キッセイ薬品工業株式会社システム企画部長 内田雅彦博士、研究統括部研究企画室長 平柄正博博士、CMC 研究部プロセス化学研究所参事 向山晴信博士に深く感謝いたします。本研究を進めるにあたり、終始ご指導賜りました、キッセイ薬品工業株式会社知的財産部知的財産課長 藤倉秀紀氏、研究統括部創薬戦略室長 伏見信彦博士に深く感謝いたします。本研究の遂行にあたり、化学合成においては、西村俊洋氏、田谷和也博士、薬理学実験においては、勝野健次博士、藤森芳和博士、渡邊信次郎氏、薬物動態学実験においては、中林毅司氏、鎌田昇氏、荒川公一氏、X 線結晶構造解析においては、古屋憲孝博士、HRMS 測定においては、村仲秀幸博士、ご助言を頂きました、遠藤拓郎博士、竹内秀樹博士、以上の皆様のほか、キッセイ薬品工業株式会社中央研究所の皆様にも多大なるご協力とご助言を承りましたことを感謝いたします。

最後に、本研究の遂行を陰ながら支えてくれた家族に感謝します。

第7章 実験の部

All reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without further purification. All moisture and air sensitive reactions were carried out under an argon atmosphere. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using Merck Kieselgel 60 F254 plates. Flash column chromatography was performed on YAMAZEN amino packed inject column and Biotage prepacked columns using an automated flash chromatography system (Biotage, Isolera One). ^1H NMR spectra were recorded on a Bruker AV400 M spectrometer at 400.1 MHz. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) units using tetramethylsilane as an internal standard. Data are presented as follows; chemical shift, integration, multiplicity (s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broad), and coupling constant. ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AV400M spectrometer at 100.6 MHz with complete proton decoupling. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) with the solvent as the internal reference (δ 20.00 in AcOH- d_4 , 49.00 in CD_3OD).^{38,39} Mass spectra (MS) were measured using an Agilent Technologies 6150 (ESI). High resolution mass spectra (HRMS) were recorded on an Agilent Technologies 6520 Accurate-Mass Q-TOF instrument using electrospray ionization (ESI, positive or negative ion mode).

Chemistry

5-Methyl-4-[4-(methylsulfonyl)benzyl]-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (2a)

NaH (161 mg, 4.03 mmol, 60% oil dispersion), under ice cooling, was added to a solution of ethyl 3-oxobutanoate (0.50 g, 3.84 mmol) in 1,2-dimethoxyethane (5 mL), and the mixture was stirred for 5 min. 4-(Methylsulfonyl)benzyl chloride (663 mg, 3.84 mmol) was added, and the mixture was refluxed for 12 h. After cooling to room temperature, saturated NH_4Cl aq. was added, and the resulting mixture was extracted with EtOAc. The extract was washed with brine and dried over anhydrous MgSO_4 . The solvent was removed in vacuo to give crude ethyl 2-[4-(methylsulfonyl)benzyl]-3-oxobutanoate. This material was dissolved in toluene (5 mL), and hydrazine monohydrate (192 mg, 3.84 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 90°C for 10 h and then cooled to

room temperature. The precipitate was filtered off, washed with toluene and water and dried in vacuo to give **2a** (350 mg, 39%) as a white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2.00 (3H, s), 2.42 (3H, s), 3.50 (2H, s), 7.07–7.18 (4H, m), 8.80–11.6 (2H, br); MS *m/z*: 235 (M+H)⁺.

5-Ethyl-4-[4-(methylsulfanyl)benzyl]-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (3a)

The title compound was prepared from ethyl 3-oxopentanoate, as described for the synthesis of **2a**, in 65% yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.02 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.39 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 2.42 (3H, s), 3.51 (2H, s), 7.05–7.20 (4H, m), 8.80–11.6 (2H, br); MS *m/z*: 249 (M+H)⁺.

5-Isopropyl-4-[4-(methylsulfanyl)benzyl]-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (4a)

The title compound was prepared from ethyl 4-methyl-3-oxopentanoate, as described for the synthesis of **2a**, in 34% yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.07 (6H, d, *J* = 7.1 Hz), 2.42 (3H, s), 2.83 (1H, heptet, *J* = 7.1 Hz), 3.53 (2H, s), 7.06–7.17 (4H, m), 8.95–9.70 (1H, br), 10.9–11.5 (1H, br); MS *m/z*: 263 (M+H)⁺.

4-Benzyl-5-methyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (5a)

NaH (323 mg, 8.07 mmol, 60% oil dispersion), under ice cooling, was added to a solution of ethyl 3-oxobutanoate (1.00 g, 7.68 mmol) in THF (10 mL), and the mixture was stirred for 30 min. Benzyl chloride (973 mg, 7.68 mmol) was added, and the mixture was refluxed overnight. After cooling to room temperature, saturated NH₄Cl aq. was added, and the resulting mixture was extracted with EtOAc. The extract was washed with water and brine, and dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was removed in vacuo to give crude ethyl 2-benzyl-3-oxobutanoate. This material was dissolved in toluene (10 mL), and hydrazine monohydrate (1.15 g, 23.1 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at 80°C overnight. The reaction mixture was cooled to room temperature, and subjected to phase separation after the addition of water (10 mL) and EtOAc (10 mL). The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and then concentrated in vacuo. The precipitate was washed with Et₂O to give **5a** as a white solid (828 mg, 57%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2.04 (3H, s), 3.60 (2H, s), 7.10–7.19 (3H, m), 7.20–7.29 (2H, m), 9.00–13.3 (2H, br); MS *m/z*: 189 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(2-phenylethyl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (6a)

To a mixture of (2-bromoethyl)benzene (3.00 g, 16.2 mmol), ethyl 3-oxo-butanoate (2.32 g, 17.8 mmol) and toluene (5 mL) were added K₂CO₃ (5.68 g, 40.7 mmol) and water (0.1 mL). The mixture was heated to 75°C and stirred at the same temperature overnight. The reaction mixture was cooled to room temperature, and subjected to phase separation after the addition of water (10 mL) and toluene (2 mL). The organic layer was washed twice with water, dried over MgSO₄ and then concentrated in vacuo to give the crude product of ethyl 3-oxo-2-(2-phenylethyl)butanoate. This material was dissolved in toluene (15 mL), and hydrazine monohydrate (2.43 g, 48.6 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 12 h then cooled to room temperature. The resulting slurry was stirred at 0°C for 1 h. The precipitate was filtered off, washed with cooled toluene and water and dried in vacuo at 60°C to give **6a** (2.20 g, 67%) as a white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.84 (3H, s), 2.40–2.50 (2H, m), 2.60–2.72 (2H, m), 7.10–7.20 (3H, m), 7.21–7.30 (2H, m), 8.70–11.5 (2H, br); MS *m/z*: 203 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(3-phenylpropyl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (7a)

The title compound was prepared from (3-bromopropyl)benzene, as described for the synthesis of **2a**, in 49% yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.62–1.76 (2H, m), 2.01 (3H, s), 2.21 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 2.54 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.12–7.21 (3H, m), 7.23–7.31 (2H, m), 8.70–11.5 (2H, br); MS *m/z*: 217 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(2-methylbenzyl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (9a)

NaH (299 mg, 7.47 mmol, 60% oil dispersion), under ice cooling, was added to a solution of ethyl 3-oxobutanoate (0.93 g, 7.11 mmol) in THF (10 mL), and the mixture was stirred for 30 min. 1-(chloromethyl)-2-methylbenzene (1.00 g, 7.11 mmol) was added, and the mixture was refluxed overnight. After cooling to room temperature, saturated NH₄Cl aq. was added, and the resulting mixture was extracted with EtOAc. The extract was washed with brine and dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was removed in vacuo to give crude ethyl 2-(2-methylbenzyl)-3-oxobutanoate. This material was dissolved in toluene (10 mL), and hydrazine monohydrate (1.07 g, 21.3 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 80°C overnight and then stirred under ice cooling for 1 h. The precipitate was filtered off, washed with toluene and water and dried in vacuo to give **9a**

(834 mg, 58%) as a white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.92 (3H, s), 2.28 (3H, s), 3.49 (2H, s), 6.90–6.99 (1H, m), 7.00–7.14 (3H, m), 8.70–11.8 (2H, m); MS *m/z*: 203 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(3-methylbenzyl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (10a)

The title compound was prepared from 1-(chloromethyl)-3-methylbenzene, as described for the synthesis of **9a**, in 43 % yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2.00 (3H, s), 2.24 (3H, s), 3.50 (2H, s), 6.87–6.99 (3H, m), 7.06–7.15 (1H, m), 8.60–11.8 (2H, br); MS *m/z*: 203 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(4-methylbenzyl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (11a)

The title compound was prepared from 1-(chloromethyl)-4-methylbenzene, as described for the synthesis of **9a**, in 70 % yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.98 (3H, s), 2.23 (3H, s), 3.48 (2H, s), 7.03 (4H, s), 8.60–11.8 (2H, br); MS *m/z*: 203 (M+H)⁺.

4-(4-Ethylbenzyl)-5-methyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (12a)

The title compound was prepared from 1-(chloromethyl)-4-ethylbenzene, as described for the synthesis of **9a**, in 43% yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.13 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.99 (3H, s), 2.52 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 3.49 (2H, s), 7.06 (4H, s), 9.00–9.80 (1H, br), 10.5–11.5 (1H, br); MS *m/z*: 217 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(4-propylbenzyl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (13a)

MsCl (4.06 g, 35.4 mmol), under ice cooling, was added to a solution of (4-propylphenyl)methanol (5.1 g, 33.7 mmol) and Et₃N (3.76g, 37.1 mmol) in THF (30 mL), and the mixture was stirred for 10 min. The insoluble material was removed by filtration and washed with THF (20 mL). The filtrate and washing were added to the mixture prepared by the addition of NaH (1.62 g, 37.1 mmol, 55% oil dispersion) into a solution of ethyl 3-oxobutanoate (4.39 g, 33.7 mmol) in THF (50 mL) under ice cooling and stirring for 5 min, then the mixture was refluxed for 8 h. After cooling to room temperature, and to the resulting mixture was added water and extracted with EtOAc. The aqueous layer was washed with EtOAc, and combined organic layers were washed with water and brine and dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was removed in vacuo to give crude ethyl 3-oxo-2-(4-propylbenzyl) butanoate. This material was dissolved in toluene (40 mL), and hydrazine monohydrate (2.94 g, 58.8 mmol) was added to the

solution. The reaction mixture was stirred at 100°C for 5 h and then cooled to room temperature. The precipitate was filtered off, washed with toluene and water and dried in vacuo to give **13a** (2.30 g, 34%) as a white solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 0.86 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.46–1.60 (2H, m), 1.99 (3H, s), 2.46–2.50 (2H, m), 3.49 (2H, s), 7.06 (4H, s), 8.50–12.0 (2H, br); MS *m/z*: 231 (M+H)⁺.

4-(4-Isopropylbenzyl)-5-methyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (14a)

The title compound was prepared from 1-(chloromethyl)-4-isopropylbenzene, as described for the synthesis of **9a**, in 47% yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.16 (6H, d, *J* = 6.9 Hz), 2.01 (3H, s), 2.81 (1H, heptet, *J* = 6.9 Hz), 3.49 (2H, s), 7.02–7.13 (4H, m), 9.00–9.80 (1H, br), 10.6–11.4 (1H, br); MS *m/z*: 231 (M+H)⁺.

4-(4-Methoxybenzyl)-5-methyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (15a)

The title compound was prepared from 1-(chloromethyl)-4-methoxybenzene, as described for the synthesis of **9a**, in 66% yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.99 (3H, s), 3.45 (2H, s), 3.69 (3H, s), 6.75–6.83 (2H, m), 7.02–7.10 (2H, m), 8.50–12.0 (2H, m); MS *m/z*: 219 (M+H)⁺.

4-(4-Ethoxybenzyl)-5-methyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (16a)

The title compound was prepared from (4-ethoxyphenyl)methanol, as described for the synthesis of **13a**, in 16% yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.29 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.98 (3H, s), 3.46 (2H, s), 3.95 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 6.75–6.81 (2H, m), 7.00–7.08 (2H, m), 9.00–9.70 (1H, br), 10.7–11.4 (1H, br); MS *m/z*: 233 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(4-propoxybenzyl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (17a)

The title compound was prepared from (4-propoxyphenyl)methanol, as described for the synthesis of **13a**, in 55% yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 0.95 (3H, t, *J* = 7.4), 1.63–1.75 (2H, m), 1.98 (3H, s), 3.46 (2H, s), 3.85 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 6.75–6.82 (2H, m), 7.00–7.07 (2H, m), 8.60–11.8 (2H, m); MS *m/z*: 247 (M+H)⁺.

4-[4-(Methylsulfanyl)benzyl]-5-trifluoromethyl-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (1b)

A mixture of 4-[4-(methylthio)benzyl]-5-trifluoromethyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one ¹⁹ (WAY-12783) (830 mg, 2.88 mmol), acetobromoglucose (1.18 g, 2.88 mmol), K₂CO₃

(438 mg, 3.17 mmol) and CH₃CN (10 mL) was stirred at room temperature for 22 h. To the mixture was added water (10 mL) and extracted with EtOAc (30 mL). The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was removed in vacuo, and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (eluent: hexane/EtOAc = 2:1–1:1) to give **1b** (1.01 g, 57%) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.91 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.08 (3H, s), 2.44 (3H, s), 3.73 (2H, s), 3.78–3.88 (1H, m), 4.20 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 2.0 Hz), 4.27 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 4.2 Hz), 5.15–5.30 (3H, m), 5.32–5.52 (1H, br), 7.05–7.11 (2H, m), 7.12–7.20 (2H, m), 9.20–10.8 (1H, br); MS *m/z*: 617(M-H)⁻.

5-Methyl-4-[4-(methylsulfanyl)benzyl]-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (2b)

Aqueous 5 M NaOH (0.84 mL, 4.27 mmol) was added to a mixture of **2a** (250 mg, 1.07 mmol), acetobromoglucose (439 mg, 1.07 mmol), and benzyltributylammonium chloride (333 mg, 1.07 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL), and the mixture was stirred at room temperature overnight. 1 M HCl (5 mL) was added, and the resulting mixture was extracted with EtOAc. The extract was washed with brine and dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was removed in vacuo, and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (eluent: hexane/EtOAc = 2:1–1:4) to give **2b** (70 mg, 12%) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.88 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.12 (3H, s), 2.44 (3H, s), 3.55 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.62 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.82–3.89 (1H, m), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 2.4 Hz), 4.31 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 4.1 Hz), 5.17–5.30 (3H, m), 5.55–5.63 (1H, m), 7.03–7.09 (2H, m), 7.12–7.17 (2H, m), 8.65–8.85 (1H, br); MS *m/z*: 565 (M+H)⁺.

5-Ethyl-4-[4-(methylsulfanyl)benzyl]-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (3b)

The title compound was prepared from **3a**, as described for the synthesis of **2b**, in 12% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.13 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.88 (3H, s), 2.01 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.44 (3H, s), 2.51 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 3.56 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 3.63 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 3.83–3.89 (1H, m), 4.14 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 2.3 Hz), 4.31 (1H, dd, *J* =

12.4 Hz, 4.0 Hz), 5.17–5.30 (3H, m), 5.56–5.62 (1H, m), 7.03–7.09 (2H, m), 7.11–7.16 (2H, m), 8.80–9.20 (1H, br); MS m/z : 579 (M+H)⁺.

5-Isopropyl-4-[4-(methylsulfanyl)benzyl]-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (4b)

The title compound was prepared from **4a**, as described for the synthesis of **2b**, in 17% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.17 (6H, dd, J = 7.0 Hz, 1.0 Hz), 1.86 (3H, s), 2.01 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.44 (3H, s), 2.91 (1H, heptet, J = 7.0 Hz), 3.58 (1H, d, J = 16.2 Hz), 3.65 (1H, d, J = 16.2 Hz), 3.83–3.90 (1H, m), 4.14 (1H, dd, J = 12.4 Hz, 2.2 Hz), 4.32 (1H, dd, J = 12.4 Hz, 4.0 Hz), 5.17–5.30 (3H, m), 5.56–5.59 (1H, m), 7.03–7.08 (2H, m), 7.11–7.16 (2H, m); MS m/z : 593 (M+H)⁺.

4-Benzyl-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (5b)

The title compound was prepared from **5a**, as described for the synthesis of **2b**, in 20% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.86 (3H, s), 2.01 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.12 (3H, s), 3.59 (1H, d, J = 16.0 Hz), 3.66 (1H, d, J = 16.0 Hz), 3.81–3.90 (1H, m), 4.13 (1H, dd, J = 12.5 Hz, 2.2 Hz), 4.31 (1H, dd, J = 12.5 Hz, 4.0 Hz), 5.17–5.30 (3H, m), 5.54–5.60 (1H, m), 7.09–7.18 (3H, m), 7.19–7.30 (2H, m); MS m/z : 519 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(2-phenylethyl)-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (6b)

The title compound was prepared from **6a**, as described for the synthesis of **2b**, in 6.0% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.85 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.036 (3H, s), 2.042 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.41–2.81 (4H, m), 3.86–3.92 (1H, m), 4.16 (1H, dd, J = 12.4 Hz, 2.4 Hz), 4.34 (1H, dd, J = 12.4 Hz, 4.1 Hz), 5.20–5.37 (3H, m), 5.56–5.63 (1H, m), 7.08–7.13 (2H, m), 7.15–7.20 (1H, m), 7.21–7.26 (2H, m), 8.40–9.10 (1H, br); MS m/z : 533 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(3-phenylpropyl)-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (7b)

The title compound was prepared from **7a**, as described for the synthesis of **2b**, in 17% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.70–1.82 (2H, m), 1.90 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.13 (3H, s), 2.21–2.43 (2H, m), 2.57 (2H, t, J = 8.0 Hz), 3.84–3.91 (1H, m),

4.15 (1H, dd, $J = 12.4$ Hz, 2.2 Hz), 4.32 (1H, dd, $J = 12.4$ Hz, 4.0 Hz), 5.18–5.33 (3H, m), 5.55–5.64 (1H, m), 7.11–7.32 (5H, m), 8.50–9.40 (1H, br); MS m/z : 547 (M+H)⁺.

4-(2-Phenylethyl)-1H-indazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- β -D-glucopyranoside (8b)

Step 1: A mixture of 4-bromo-1,2-dihydro-3*H*-indazol-3-one (**2g**, 9.39 mmol), 2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- α -D-glucopyranosyl bromide (6.53 g, 11.3 mmol), K₂CO₃ (2.60 g, 18.8 mmol) and CH₃CN (30 mL) was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (eluent: *n*-hexane/EtOAc = 10:1–2:1) to give 4-bromo-1*H*-indazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- β -D-glucopyranoside **8a** (2.02 g, 30%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.09 (9H, s), 1.14 (9H, s), 1.17 (9H, s), 1.20 (9H, s), 3.96–4.04 (1H, m), 4.16 (1H, dd, $J = 12.4$ Hz, 4.9 Hz), 4.26 (1H, dd, $J = 12.4$ Hz, 1.8 Hz), 5.28–5.35 (1H, m), 5.40–5.52 (2H, m), 5.88 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.14–7.20 (1H, m), 7.21–7.27 (2H, m), 8.59–9.15 (1H, br); MS m/z : 710, 712 (M-H)⁻.

Step 2: A mixture of **8a** (2.00 g, 2.81 mmol), styrene (0.877 g, 8.42 mmol), Pd(OAc)₂ (0.0637 g, 0.284 mmol), tri(*o*-tolyl)phosphine (0.171 g, 0.562 mmol), Et₃N (1.42 g, 14.0 mmol) and CH₃CN (60 mL) was refluxed for 8 h. After volatile components were removed in vacuo, the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (eluent: hexane/EtOAc = 10:1–2:1). The obtained material (1.61 g) was recrystallized from hexane–EtOAc to afford 4-[(*E*)-styryl]-1*H*-indazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- β -D-glucopyranoside (0.841 g, 41 %) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.98 (9H, s), 1.16 (9H, s), 1.18 (9H, s), 1.19 (9H, s), 3.97–4.05 (1H, m), 4.10–4.30 (2H, m), 5.25–5.35 (1H, m), 5.45–5.63 (2H, m), 5.96 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.10–7.40 (4H, m), 7.41–7.51 (3H, m), 7.67 (2H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.78 (1H, d, $J = 16.4$ Hz), 8.89 (1H, br); MS m/z : 733 (M-H)⁻.

Step 3: A mixture of the 4-[(*E*)-styryl]-1*H*-indazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- β -D-glucopyranoside (0.600 g, 0.817 mmol) and 10% Pd/C (60 mg) in THF (12 mL) was stirred under an atmosphere of H₂ at room temperature for 3 h. The mixture was filtered through celite and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was purified by

flash column chromatography on silica gel to provide **8b** (0.564 g, 94 %) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.04 (9H, s), 1.13 (9H, s), 1.15 (9H, s), 1.17 (9H, s), 2.88–3.22 (3H, m), 3.26–3.36 (1H, m), 3.93–4.02 (1H, m), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 4.8 Hz), 4.21 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 1.9 Hz), 5.25–5.33 (1H, m), 5.40–5.52 (2H, m), 6.05 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.68–6.74 (1H, m), 7.10–7.24 (5H, m), 7.27–7.32 (2H, m), 8.94 (1H, s); MS *m/z*: 735 (M-H)⁻.

5-Methyl-4-(2-methylbenzyl)-1H-pyrazol-3-yl **2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside (9b)**

The title compound was prepared from **9a**, as described for the synthesis of **2b**, in 12% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.80 (3H, s), 2.00 (3H, s), 2.025 (3H, s), 2.032 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.30 (3H, s), 3.54 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 3.65 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 3.79–3.88 (1H, m), 4.15–4.17 (1H, m), 4.30 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 3.9 Hz), 5.15–5.28 (3H, m), 5.52–5.57 (1H, m), 6.90–6.97 (1H, m), 7.02–7.15 (3H, m); MS *m/z*: 533 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(3-methylbenzyl)-1H-pyrazol-3-yl **2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside (10b)**

The title compound was prepared from **10a**, as described for the synthesis of **2b**, in 13% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.86 (3H, s), 2.01 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.12 (3H, s), 2.30 (3H, s), 3.56 (1H, d, *J* = 15.9 Hz), 3.63 (1H, d, *J* = 15.9 Hz), 3.81–3.89 (1H, m), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 2.3 Hz), 4.32 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 4.1 Hz), 5.16–5.30 (3H, m), 5.54–5.61 (1H, m), 6.90–6.99 (3H, m), 7.08–7.16 (1H, m), 8.50–9.10 (1H, br); MS *m/z*: 533 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(4-methylbenzyl)-1H-pyrazol-3-yl **2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside (11b)**

The title compound was prepared from **11a**, as described for the synthesis of **2b**, in 20% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.87 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.12 (3H, s), 2.28 (3H, s), 3.55 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.63 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.80–3.89 (1H, m), 4.08–4.17 (1H, m), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 4.0 Hz), 5.15–5.31 (3H, m), 5.50–5.60 (1H, m), 6.89–7.15 (5H, m); MS *m/z*: 533 (M+H)⁺.

4-(4-Ethylbenzyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl **2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside (12b)**

The title compound was prepared from **12a**, as described for the synthesis of **2b**, in 12% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.19 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.86 (3H, s), 2.01 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.12 (3H, s), 2.58 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 3.55 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.64 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.81–3.89 (1H, m), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 2.3 Hz), 4.31 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 3.9 Hz), 5.16–5.34 (3H, m), 5.51–5.61 (1H, m), 6.98–7.18 (4H, m); MS *m/z*: 547 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(4-propylbenzyl)-1H-pyrazol-3-yl **2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside (13b)**

The title compound was prepared from **13a**, as described for the synthesis of **2b**, in 25% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.91 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.50–1.65 (2H, m), 1.86 (3H, s), 2.01 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.12 (3H, s), 2.47–2.55 (2H, m), 3.56 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.64 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.81–3.88 (1H, m), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 2.2 Hz), 4.31 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 4.0 Hz), 5.16–5.32 (3H, m), 5.52–5.62 (1H, m), 7.00–7.11 (4H, m), 8.45–9.45 (1H, br); MS *m/z*: 561 (M+H)⁺.

4-(4-Isopropylbenzyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl **2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside (14b)**

The title compound was prepared from **14a**, as described for the synthesis of **2b**, in 16% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.20 (6H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.84 (3H, s), 2.01 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.13 (3H, s), 2.84 (1H, heptet, *J* = 6.9 Hz), 3.56 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.63 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.80–3.89 (1H, m), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 2.3 Hz), 4.31 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 4.0 Hz), 5.15–5.35 (3H, m), 5.50–5.60 (1H, m), 7.01–7.15 (4H, m), 8.70–9.30 (1H, br); MS *m/z*: 561 (M+H)⁺.

4-(4-Methoxybenzyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl **2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside (15b)**

The title compound was prepared from **15a**, as described for the synthesis of **2b**, in 9.9% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.89 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.11 (3H, s), 3.53 (1H, d, *J* = 15.9 Hz), 3.60 (1H, d, *J* = 15.9 Hz), 3.76 (3H, s), 3.81–3.90 (1H, m), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.6 Hz, 2.3 Hz), 4.31 (1H, dd, *J* = 12.6 Hz, 4.0 Hz), 5.16–5.31 (3H, m), 5.54–5.60 (1H, m), 6.74–6.82 (2H, m), 7.01–7.10 (2H, m), 8.20–9.20 (1H, br); MS *m/z*: 549 (M+H)⁺.

4-(4-Ethoxybenzyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (16b)

The title compound was prepared from **16a**, as described for the synthesis of **2b**, in 23% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.38 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.89 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.10 (3H, s), 3.53 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.59 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.81–3.90 (1H, m), 3.98 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 2.3 Hz), 4.31 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 4.0 Hz), 5.15–5.30 (3H, m), 5.52–5.60 (1H, m), 6.72–6.80 (2H, m), 6.99–7.08 (2H, m), 8.50–9.80 (1H, br); MS *m/z*: 563 (M+H)⁺.

5-Methyl-4-(4-propoxybenzyl)-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (17b)

The title compound was prepared from **17a**, as described for the synthesis of **2b**, in 18% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.01 (3H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.70–1.83 (2H, m), 1.89 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.11 (3H, s), 3.53 (1H, d, *J* = 15.7 Hz), 3.59 (1H, d, *J* = 15.7 Hz), 3.81–3.92 (3H, m), 4.14 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 2.3 Hz), 4.31 (1H, dd, 12.4 Hz, 4.0 Hz), 5.15–5.32 (3H, m), 5.52–5.60 (1H, m), 6.73–6.80 (2H, m), 7.00–7.07 (2H, m), 8.50–9.50 (1H, br); MS *m/z*: 577 (M+H)⁺.

4-(4-Isopropoxybenzyl)-2,5-dimethyl-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-pivaloyl-β-D-glucopyranoside (19b)

4-(4-Isopropoxybenzyl)-1,5-dimethyl-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-pivaloyl-β-D-glucopyranoside (20b)

A solution of 4-[(4-Isopropoxyphenyl)methyl]-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-O-pivaloyl-β-D-glucopyranoside **18b**²⁴ (500 mg, 0.671 mmol) and iodomethane (381 mg, 2.69 mmol) in 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone (DMI) (2 mL) was added dropwise to a suspension of NaH (81 mg, 2.01 mmol, 60% oil dispersion) in DMI (3 mL) while maintaining the internal temperature between 10 and 20 °C. The reaction mixture was stirred at this temperature for 2h. The reaction mixture was added dropwise to a mixture of H₂O (10 mL), glacial acetic acid (80.6 mg, 1.34 mmol) and the resulting mixture was extracted with EtOAc. The extract was washed with water and brine, and dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was removed in vacuo, and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (gradient: 10-30% EtOAc in hexane) to give

19b (35 mg, 6.9%) as a white solid and **20b** (262 mg, 51%) as a white solid. **19b**: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.11 (9H, s), 1.12 (9H, s), 1.147 (9H, s), 1.152 (9H, s), 1.32 (3H, d, *J* = 6.1 Hz), 1.33 (3H, d, *J* = 6.1 Hz), 2.03 (3H, s), 3.22–3.34 (1H, m), 3.60 (1H, d, *J* = 16.7 Hz), 3.62 (3H, s), 3.68 (1H, d, *J* = 16.7 Hz), 3.97 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 2.2 Hz), 4.04 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 5.2 Hz), 4.52 (1H, heptet, *J* = 6.1 Hz), 4.71 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 5.08–5.19 (2H, m), 5.20–5.29 (1H, m), 6.77–6.85 (2H, m), 6.92–7.01 (2H, m); MS *m/z*: 759 (M+H)⁺; **20b**: ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.05 (9H, s), 1.12 (9H, s), 1.15 (9H, s), 1.18 (9H, s), 1.292 (3H, d, *J* = 6.1 Hz), 1.295 (3H, d, *J* = 6.1 Hz), 2.02 (3H, s), 3.51 (2H, s), 3.56 (3H, s), 3.82–3.92 (1H, m), 4.10 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 5.1 Hz), 4.20 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 1.7 Hz), 4.46 (1H, heptet, *J* = 6.1 Hz), 5.16–5.44 (3H, m), 5.65 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.70–6.79 (2H, m), 6.99–7.08 (2H, m); MS *m/z*: 759 (M+H)⁺.

Ethyl-4-(4-isopropoxybenzyl)-5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl-β-D-glucopyranoside (21b)

The title compound was prepared using iodoethane instead of iodomethane, as described for the synthesis of **20b**, in 71% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.05 (9H, s), 1.12 (9H, s), 1.15 (9H, s), 1.18 (9H, s), 1.25–1.35 (9H, m), 2.03 (3H, s), 3.52 (2H, s), 3.82–3.92 (3H, m), 4.11 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 4.8 Hz), 4.18 (1H, dd, *J* = 12.4 Hz, 1.9 Hz), 4.47 (1H, heptet, *J* = 6.0 Hz), 5.18–5.32 (2H, m), 5.34–5.44 (1H, m), 5.69 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.70–6.78 (2H, m), 7.00–7.08 (2H, m); MS *m/z*: 773 (M+H)⁺.

4-(4-Isopropoxybenzyl)-5-methyl-1-propyl-1*H*-pyrazol-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl-β-D-glucopyranoside (22b)

The title compound was prepared using iodopropane instead of iodomethane, as described for the synthesis of **20b**, in 78% yield. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.86 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.04 (9H, s), 1.12 (9H, s), 1.15 (9H, s), 1.18 (9H, s), 1.293 (3H, d, *J* = 6.1 Hz), 1.296 (3H, d, *J* = 6.1 Hz), 1.64–1.82 (2H, m), 2.03 (3H, s), 3.52 (2H, s), 3.77 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 3.81–3.90 (1H, m), 4.11 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 4.7 Hz), 4.18 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 1.7 Hz), 4.47 (1H, heptet, *J* = 6.1 Hz), 5.18–5.43 (3H, ms), 5.70 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.70–6.78 (2H, m), 6.98–7.08 (2H, m); MS *m/z*: 787 (M+H)⁺.

4-[4-(Methylsulfanyl)benzyl]-5-trifluoromethyl-1*H*-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (1)

A mixture of **1b** (900 mg, 1.46 mmol), NaOMe (28% MeOH solution, 0.56 mL, 2.91 mmol), and MeOH (6 mL) was stirred at room temperature for 20 h. The solvent was removed in vacuo, and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (eluent: CH₂Cl₂/MeOH = 19:1-9:1-4:1) to give **1** (398 mg, 61%) as an amorphous solid. ¹H NMR (AcOH-*d*₄) δ: 2.42 (3H, s), 3.54–3.62 (1H, m), 3.64–3.80 (3H, m), 3.85 (2H, s), 3.89 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 4.5 Hz), 4.00 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, 2.3 Hz), 5.15 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.16 (4H, s); ¹³C NMR (AcOH-*d*₄) δ: 15.82, 27.10, 61.71, 70.18, 74.14, 76.92, 77.34, 103.27, 106.43, 121.85 (q, *J* = 263 Hz), 127.67, 129.78, 136.17 (q, *J* = 37.9 Hz), 137.39, 137.62, 155.58 ; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₂₂F₃N₂O₆S, 451.1145; found 451.1145.

5-Methyl-4-[4-(methylsulfanyl)benzyl]-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (2)

NaOMe (28% MeOH solution, 0.020 mL, 0.104 mmol) was added to a solution of **2b** (59 mg, 0.104 mmol) in MeOH (2 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 20 h. Acetic acid (6.3 mg, 0.105 mmol) was added to this reaction mixture, and the solvent was removed in vacuo. The residue was loaded on amino packed inject column and purified by flash column chromatography on silica gel (gradient: 0–20% MeOH in CH₂Cl₂) to give **2** (21 mg, 51%) as an amorphous solid. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 2.06 (3H, s), 2.42 (3H, s), 3.20–3.45 (4H, m), 3.63–3.70 (2H, m), 3.72 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 3.80–3.88 (1H, m), 5.00–5.10 (1H, m), 7.10–7.20 (4H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 10.08, 16.19, 27.65, 62.68, 71.23, 74.93, 77.99, 78.39, 102.59, 104.06, 128.05, 129.96, 136.86, 139.67, 139.85, 161.61; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₂₅N₂O₆S, 397.1428; found 397.1430.

5-Ethyl-4-[4-(methylsulfanyl)benzyl]-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (3)

The title compound was prepared from **3b**, as described for the synthesis of **2**, in 54% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.06 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.42 (3H, s), 2.47 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 3.32–3.44 (4H, m), 3.64–3.77 (2H, m), 3.74 (1H, d, *J* = 16.2 Hz), 3.81–3.88 (1H, m), 5.04–5.10 (1H, m), 7.12–7.17 (4H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 13.65, 16.16, 19.20, 27.61, 62.70, 71.24, 74.95, 78.01, 78.40, 102.58, 103.25, 128.00, 129.96, 136.89, 139.88, 145.65, 161.52; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₉H₂₇N₂O₆S, 411.1584; found 411.1586.

5-Isopropyl-4-[4-(methylsulfanyl)benzyl]-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (4)

The title compound was prepared from **4b**, as described for the synthesis of **2**, in 43% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.125 (3H, d, *J* = 7.1 Hz), 1.132 (3H, d, *J* = 7.1 Hz), 2.42 (3H, s), 2.89 (1H, heptet, *J* = 7.1 Hz), 3.32–3.42 (4H, m), 3.61–3.73 (2H, m), 3.76 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 3.84 (1H, dd, *J* = 12.2 Hz, 1.7 Hz), 5.05–5.15 (1H, m), 7.15–7.20 (4H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 16.16, 21.98, 21.99, 26.60, 27.60, 62.73, 71.26, 74.96, 78.02, 78.40, 102.46, 102.53, 127.97, 129.94, 136.87, 140.04, 149.44, 161.69; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₀H₂₉N₂O₆S, 425.1741; found 425.1742.

4-Benzyl-5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (5)

The title compound was prepared from **5b**, as described for the synthesis of **2**, in 54% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 2.05 (3H, s), 3.32–3.45 (4H, m), 3.63–3.74 (2H, m), 3.77 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 3.80–3.87 (1H, m), 5.01–5.10 (1H, m), 7.05–7.25 (5H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 10.05, 28.20, 62.68, 71.22, 74.94, 77.99, 78.38, 102.55, 104.17, 126.77, 129.27, 129.37, 139.85, 142.52, 161.68; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₇H₂₃N₂O₆, 351.1551; found 351.1551.

5-Methyl-4-(2-phenylethyl)-1*H*-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (6)

The title compound was prepared from **6b**, as described for the synthesis of **2**, in 62% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.80 (3H, s), 2.55–2.70 (2H, m), 2.71–2.86 (2H, m), 3.32–3.47 (4H, m), 3.69 (1H, dd, *J* = 12.1 Hz, 5.2 Hz), 3.87 (1H, dd, *J* = 12.1 Hz, 1.8 Hz), 4.99–5.07 (1H, m), 7.08–7.16 (3H, m), 7.17–7.24 (2H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 9.53, 24.89, 37.25, 62.80, 71.34, 75.00, 78.05, 78.42, 102.55, 104.14, 126.74, 129.16, 129.92, 139.70, 143.48, 161.73; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₂₅N₂O₆, 365.1707; found 365.1710.

5-Methyl-4-(3-phenylpropyl)-1*H*-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (7)

The title compound was prepared from **7b**, as described for the synthesis of **2**, in 65% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.75–1.88 (2H, m), 2.11 (3H, s), 2.32–2.46 (2H, m), 2.56–2.65 (2H, m), 3.32–3.47 (4H, m), 3.67 (1H, dd, *J* = 12.0 Hz, 5.3 Hz), 3.85 (1H, dd, *J* = 12.0 Hz, 1.9 Hz), 5.03–5.11 (1H, m), 7.09–7.27 (5H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 9.91, 22.11, 32.98, 36.54, 62.76, 71.31, 74.97, 78.07, 78.40, 102.29, 104.71, 126.63, 129.26, 129.47, 139.32, 143.84, 161.55; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₉H₂₇N₂O₆, 379.1864; found 379.1865.

4-(2-Phenylethyl)-1H-indazol-3-yl β -D-glucopyranoside (8)

LiOH-H₂O (525 mg, 12.5 mmol) and water (1 mL) were added to a solution of **8b** (461 mg, 0.626 mmol) in MeOH (10 mL), and the mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was dissolved in water, and acetic acid (939 mg, 16.6 mmol) was added to the solution. The mixture was extracted by solid-phase extraction on a C18 Bond Elute cartridge (eluent: MeOH) and the extracts were concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (gradient: 10–20% MeOH in CH₂Cl₂) to give **8** (151 mg, 60%) as an amorphous solid. ¹H NMR (CD₃OD) δ : 2.90–3.08 (2H, m), 3.10–3.24 (1H, m), 3.35–3.65 (5H, m), 3.71 (1H, dd, *J* = 12.2 Hz, 5.5 Hz), 3.89 (1H, dd, *J* = 12.2 Hz, 2.2 Hz), 5.66 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 6.76 (1H, d, *J* = 6.9 Hz), 7.10–7.30 (7H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ : 36.44, 39.10, 62.60, 71.27, 75.14, 78.40, 78.55, 101.49, 108.86, 111.87, 120.99, 126.75, 129.02, 129.26, 129.63, 137.64, 143.65, 144.05, 156.80; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₁H₂₅N₂O₆, 401.1707; found 401.1706.

5-Methyl-4-(2-methylbenzyl)-1H-pyrazol-3-yl β -D-glucopyranoside (9)

The title compound was prepared from **9b**, as described for the synthesis of **1**, in 65% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ : 1.96 (3H, s), 2.31 (3H, s), 3.32–3.38 (4H, m), 3.60–3.86 (4H, m), 4.97–5.05 (1H, m), 6.94–7.15 (4H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ : 10.15, 19.78, 26.00, 62.67, 71.20, 74.89, 77.94, 78.35, 102.61, 102.94, 126.77, 127.02, 129.44, 130.90, 137.38, 139.82, 140.16, 161.66; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₂₅N₂O₆, 365.1707; found 365.1710.

5-Methyl-4-(3-methylbenzyl)-1H-pyrazol-3-yl β -D-glucopyranoside (10)

The title compound was prepared from **10b**, as described for the synthesis of **1**, in 53% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ : 2.05 (3H, s), 2.27 (3H, s), 3.32–3.43 (4H, m), 3.61–3.75 (3H, m), 3.80–3.87 (1H, m), 5.00–5.08 (1H, m), 6.91–7.04 (3H, m), 7.06–7.13 (1H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ : 10.07, 21.47, 28.12, 62.70, 71.23, 74.95, 77.99, 78.40, 102.55, 104.20, 126.43, 127.45, 129.17, 130.02, 138.90, 139.85, 142.39, 161.69; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₂₅N₂O₆, 365.1707; found 365.1709.

5-Methyl-4-(4-methylbenzyl)-1H-pyrazol-3-yl β -D-glucopyranoside (11)

The title compound was prepared from **11b**, as described for the synthesis of **2**, in 61% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 2.04 (3H, s), 2.26 (3H, s), 3.32–3.43 (4H, m), 3.61–3.76 (3H, m), 3.83 (1H, d, *J* = 12.1 Hz), 5.00–5.07 (1H, m), 7.00–7.10 (4H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 10.10, 21.02, 27.76, 62.68, 71.22, 74.94, 77.97, 78.37, 102.59, 104.33, 129.26, 129.87, 136.22, 139.39, 139.96, 161.53; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₂₅N₂O₆, 365.1707; found 365.1709.

4-(4-Ethylbenzyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (12)

The title compound was prepared from **12b**, as described for the synthesis of **2**, in 52% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.18 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.05 (3H, s), 2.57 (2H, q, *J* = 7.6 Hz), 3.32–3.43 (4H, m), 3.62–3.76 (3H, m), 3.83 (1H, d, *J* = 12.1 Hz), 5.01–5.07 (1H, m), 7.03–7.13 (4H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 10.10, 16.32, 27.77, 29.44, 62.67, 71.21, 74.94, 77.97, 78.37, 102.58, 104.33, 128.71, 129.31, 139.68, 139.96, 142.84, 161.49; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₉H₂₇N₂O₆, 379.1864; found 379.1866.

5-Methyl-4-(4-propylbenzyl)-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (13)

The title compound was prepared from **13b**, as described for the synthesis of **2**, in 43% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 0.91 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.54–1.65 (2H, m), 2.05 (3H, s), 2.48–2.56 (2H, m), 3.32–3.44 (4H, m), 3.60–3.75 (3H, m), 3.83 (1H, d, *J* = 11.9 Hz), 5.02–5.06 (1H, m), 7.01–7.06 (2H, m), 7.07–7.12 (2H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 10.11, 14.09, 25.85, 27.79, 38.65, 62.67, 71.21, 74.94, 77.97, 78.37, 102.59, 104.33, 129.22, 129.36, 139.71, 139.99, 141.15, 161.48; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₀H₂₉N₂O₆, 393.2020; found 393.2023.

4-(4-Isopropylbenzyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (14)

The title compound was prepared from **14b**, as described for the synthesis of **2**, in 41% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.20 (6H, d, *J* = 7.0 Hz), 2.05 (3H, s), 2.83 (1H, heptet, *J* = 7.0 Hz), 3.32–3.43 (4H, m), 3.58–3.86 (4H, m), 5.00–5.08 (1H, m), 7.06–7.13 (4H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 10.10, 24.53, 27.75, 34.99, 62.67, 71.21, 74.94, 77.98, 78.37, 102.56, 104.32, 127.23, 129.28, 139.84, 140.04, 147.47, 161.66; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₀H₂₉N₂O₆, 393.2020; found 393.2021.

4-(4-Methoxybenzyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (15)

The title compound was prepared from **15b**, as described for the synthesis of **2**, in 74% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 2.05 (3H, s), 3.32–3.42 (4H, m), 3.60–3.72 (3H, m), 3.73 (3H, s), 3.84 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 5.00–5.09 (1H, m), 6.73–6.81 (2H, m), 7.07–7.14 (2H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 10.08, 27.30, 55.61, 62.69, 71.23, 74.95, 77.99, 78.38, 102.58, 104.54, 114.66, 130.26, 134.51, 139.83, 159.30, 161.57; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₂₅N₂O₇, 381.1656; found 381.1657.

4-(4-Ethoxybenzyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (16)

The title compound was prepared from **16b**, as described for the synthesis of **2**, in 63% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.34 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 2.05 (3H, s), 3.32–3.44 (4H, m), 3.60–3.72 (3H, m), 3.84 (1H, d, *J* = 12.1 Hz), 3.97 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 5.00–5.08 (1H, m), 6.72–6.84 (2H, m), 7.04–7.15 (2H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 10.10, 15.21, 27.31, 62.69, 64.40, 71.23, 74.95, 77.98, 78.37, 102.58, 104.55, 115.30, 130.24, 134.45, 139.93, 158.55, 161.45; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₉H₂₇N₂O₇, 395.1813; found 395.1814.

5-Methyl-4-(4-propoxybenzyl)-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (17)

The title compound was prepared from **17b**, as described for the synthesis of **2**, in 48% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.02 (3H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.70–1.80 (2H, m), 2.05 (3H, s), 3.32–3.43 (4H, m), 3.60–3.73 (3H, m), 3.80–3.86 (1H, m), 3.87 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 5.00–5.08 (1H, m), 6.74–6.85 (2H, m), 7.06–7.12 (2H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 10.06, 10.85, 23.71, 27.31, 62.69, 70.53, 71.23, 74.95, 77.99, 78.37, 102.55, 104.55, 115.32, 130.24, 134.41, 139.77, 158.74, 161.62; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₀H₂₉N₂O₇, 409.1969; found 409.1970.

4-(4-Isopropoxybenzyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (18)

The title compound was prepared from **18b**²⁴, as described for the synthesis of **2**, in 59% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.26 (6H, d, *J* = 6.1 Hz), 2.05 (3H, s), 3.30–3.43 (4H, m), 3.60–3.73 (3H, m), 3.80–3.87 (1H, m), 4.51 (1H, heptet, *J* = 6.1 Hz), 5.00–5.08 (1H, m), 6.73–6.80 (2H, m), 7.04–7.14 (2H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 10.10, 22.38, 27.32, 62.69, 71.04, 71.23, 74.95, 77.99, 78.38, 102.59, 104.53, 116.96, 130.28, 134.59, 139.93, 157.35, 161.45; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₀H₂₉N₂O₇, 409.1969; found 409.1969.

4-(4-Isopropoxybenzyl)-2,5-dimethyl-1H-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (19)

The title compound was prepared from **19b**, as described for the synthesis of **1**, in 67% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.27 (6H, d, *J* = 6.1 Hz), 1.97 (3H, s), 2.95–3.05 (1H, m), 3.23–3.32 (1H, m), 3.33–3.44 (2H, m), 3.58–3.66 (2H, m), 3.68 (3H, s), 3.74 (1H, d, *J* = 16.4 Hz), 3.80 (1H, d, *J* = 16.4 Hz), 4.52 (1H, heptet, *J* = 6.1 Hz), 4.58 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.74–6.82 (2H, m), 6.98–7.07 (2H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 12.69, 22.38, 27.69, 34.48, 62.08, 70.80, 71.05, 74.87, 77.80, 78.31, 104.71, 106.58, 117.03, 130.06, 134.16, 147.53, 151.21, 157.47; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₁H₃₁N₂O₇, 423.2126; found 423.2123.

4-(4-Isopropoxybenzyl)-1,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (20)

The title compound was prepared from **20b**, as described for the synthesis of **2**, in 67% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.26 (6H, d, *J* = 6.1 Hz), 2.07 (3H, s), 3.30–3.42 (4H, m), 3.58–3.72 (3H, m), 3.62 (3H, s), 3.79–3.86 (1H, m), 4.51 (1H, heptet, *J* = 6.1 Hz), 5.01–5.06 (1H, m), 6.73–6.84 (2H, m), 7.04–7.12 (2H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 9.80, 22.38, 27.61, 35.70, 62.64, 71.02, 71.19, 74.95, 77.98, 78.35, 102.69, 105.46, 116.95, 130.22, 134.58, 139.93, 157.36, 159.97; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₁H₃₁N₂O₇, 423.2126; found 423.2126.

1-Ethyl-4-(4-isopropoxybenzyl)-5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (21)

The title compound was prepared from **21b**, as described for the synthesis of **2**, in 67% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 1.26 (6H, d, *J* = 6.1 Hz), 1.29 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.09 (3H, s), 3.30–3.45 (4H, m), 3.58–3.72 (3H, m), 3.78–3.85 (1H, m), 3.96 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.51 (1H, heptet, *J* = 6.1 Hz), 5.01–5.07 (1H, m), 6.70–6.80 (2H, m), 7.02–7.10 (2H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 9.67, 15.70, 22.38, 27.60, 44.35, 62.65, 71.02, 71.22, 75.00, 78.00, 78.31, 102.72, 105.52, 116.96, 130.21, 134.62, 138.89, 157.36, 160.13; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₂H₃₃N₂O₇, 437.2282; found 437.2283.

4-(4-Isopropoxybenzyl)-5-methyl-1-propyl-1*H*-pyrazol-3-yl β-D-glucopyranoside (22)

The title compound was prepared from **22b**, as described for the synthesis of **2**, in 60% yield. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 0.87 (3H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.26 (6H, d, *J* = 6.1 Hz), 1.68–1.80 (2H, m), 2.07 (3H, s), 3.30–3.42 (4H, m), 3.59–3.73 (3H, m), 3.81 (1H, dd, *J* = 12.1 Hz, 2.0 Hz), 3.88 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 4.51 (1H, heptet, *J* = 6.1 Hz), 5.00–5.07 (1H, m), 6.72–

6.80 (2H, m), 7.03–7.10 (2H, m); ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 9.88, 11.28, 22.38, 24.59, 27.58, 50.91, 62.63, 71.02, 71.21, 75.00, 78.00, 78.28, 102.75, 105.33, 116.96, 130.18, 134.60, 139.45, 157.36, 160.14; HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₃H₃₅N₂O₇, 451.2439; found 451.2439.

23 (Remogliflozin) and **24** (Remogliflozin etabonate) were prepared as reported previously.²⁴

Biology

SGLT1 and SGLT2 inhibition assay

Human SGLT expression plasmids were constructed and cell culture, transfection, and [¹⁴C]-AMG (α -methyl-D-glucopyranoside) uptake experiments were performed as reported previously.¹⁹ In the experiments, 0.3 mM AMG concentration in the uptake buffer was used. The concentration of test compounds required to inhibit a 50% uptake of [¹⁴C]-AMG (IC₅₀) was calculated using a logit plot. Phlorizin was included in all experiments as a reference standard.

Human liver microsome stability

Each test compound (30 μ M) was incubated with human liver microsomes (Thermo Fisher Scientific) at a protein concentration of 1 mg/mL in phosphate buffer (pH 7.4, 100 mmol/L) containing MgCl₂·6H₂O (10 mM) and NADPH (1 mg/mL). An aliquot (50 μ L) of each reaction mixture was collected at 0, 15, 30, and 60 min. Reactions were quenched with 2.5 volumes of ice-cold acetonitrile and centrifuged at 2280 \times g for 20 min. Supernatants were analyzed using LC-MS/MS (QTRAP 6500, AB SCIEX, Framingham, MA). The half-life ($t_{1/2}$) and intrinsic clearance (CL_{int}) calculated from the remaining test compound at 15, 30, and 60 min were estimated as metabolic stability.

Rat intestinal S9 stability

Each test compound (10 μ M) was incubated with rat intestinal S9 (Sekisui XenoTech, Kansas City, KS) at a protein concentration of 0.5 mg/mL in Tris HCl buffer (pH 7.4, 50 mM) containing MgCl₂·6H₂O (10 mM) and NADPH (1 mg/mL). Reaction mixtures (50 μ L) were incubated at 37°C for 0, 15, 30, and 60 min and subsequently quenched with cold acetonitrile before centrifugation at 2280 \times g for 20 min. Supernatants were analyzed using LC-MS/MS (API-3000, AB SCIEX). The half-life ($t_{1/2}$) and intrinsic clearance (CL_{int}) calculated from the remaining test compound at 15, 30, and 60 min were estimated as metabolic stability.

Rat PK study

Test compounds (**1**, **18**, **23**, or **24**) were dissolved in dimethylacetamide (DMA) and diluted five-fold with saline to prepare intravenous dosing formulations (1 mg/kg/mL). For the oral formulations (3 mg/kg/5 mL), test compounds were suspended in 0.5 w/v% methyl cellulose 400 solution (MC). Rat blood was collected from the jugular vein at 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, and 360 min after single oral or intravenous administration of the test compound to rats. Plasma concentrations were measured using LC-MS/MS (API-3000, AB SCIEX).

Permeability of test compounds across Caco-2 cell monolayers

Caco-2 cells were plated at a density of 1.0×10^5 cells/well on polycarbonate membranes (BD Falcon 24 multiwell insert systems, 0.3 cm² growth area, 1 μm pores, Corning, Corning, NY). Cell confluence was monitored by transepithelial electrical resistance (TEER) measurements. Transport experiments were performed on monolayers at 21 days post-seeding. Bi-directional transport of the compounds was investigated using Caco-2 cell monolayers. HBSS with pH adjusted to 7.4 using 10 mM HEPES was used as the transport buffer (TB).

Following pre-incubation (30 min) of both sides of the monolayers with compound-free TB, the TB was removed from the apical (A) side while TB containing each compound was added to the removal side. Following incubation in a CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂) for 60 min at 37 °C, a portion (50 μL) of buffer was collected from the opposite side. The concentrations of test compounds were measured using LC-MS/MS (API-3000, AB SCIEX).

第8章 参考文献

1. 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告（国際標準化対応版）：糖尿病診断基準に関する調査検討委員会 糖尿病 55 巻 7 号（2012）
2. 医学と医療の最前線：日本人 2 型糖尿病患者の特徴と病態についての臨床疫学. 日本内科学会雑誌第 102 巻第 10 号
3. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107843. doi:10.1016/j.diabres.2019.107843
4. 平成 30 年 国民健康・栄養調査 結果の概要. 厚生労働省
5. 経口血糖降下薬の臨床評価方法に関するガイドライン 2017
6. 糖尿病治療ガイドライン 2019：糖尿病治療の指針
7. Kerru N, Singh-Pillay A, Awolade P, Singh P. Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review. *Eur J Med Chem.* 2018;152:436–488. doi:10.1016/j.ejmech.2018.04.061
8. Kanai Y, Lee WS, You G, Brown D, Hediger MA. The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest.* 1994;93(1):397-404. doi:10.1172/JCI116972
9. van den Heuvel LP, Assink K, Willemsen M, Monnens L. Autosomal recessive renal glucosuria attributable to a mutation in the sodium glucose cotransporter (SGLT2). *Hum Genet.* 2002;111(6):544-547. doi:10.1007/s00439-002-0820-5
10. Chao EC, Henry RR. SGLT2 inhibition-a novel strategy for diabetes treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:551-559. doi:10.1038/nrd3180
11. Patel AK, Fonseca V. Turning glucosuria into a therapy: Efficacy and safety with SGLT2 inhibitors. *Curr Diab Rep.* 2010;10:101–107. doi:10.1007/s11892-010-0095-5
12. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes

- Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2018;41:2669-2701. doi:10.2337/dci18-0033
13. Cherney DZ, Odutayo A, Aronson R, Ezekowitz J, Parker JD. Sodium Glucose Cotransporter-2 Inhibition and Cardiorenal Protection: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74:2511–2524. doi:10.1016/j.jacc.2019.09.022
 14. Toyama T, Neuen BL, Jun M, et al. Effect of SGLT2 inhibitors on cardiovascular, renal and safety outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab*. 2019;21:1237–1250. doi:10.1111/dom.13648
 15. Bhattacharya S, Rathore A, Parwani D, et al. An exhaustive perspective on structural insights of SGLT2 inhibitors: A novel class of antidiabetic agent. *Eur J Med Chem*. 2020;204:112523. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112523
 16. Chatzopoulos G, Tziomalos K. An up-to-date evaluation of sotagliflozin for the treatment of type 1 diabetes. *Expert Opin Pharmacother*. 2020;21:1799–1803. doi:10.1080/14656566.2020.1793961
 17. Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005;21:31–38. doi:10.1002/dmrr.532
 18. Whaley JM, Tirmenstein M, Reilly TP, et al. Targeting the kidney and glucose excretion with dapagliflozin: preclinical and clinical evidence for SGLT2 inhibition as a new option for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2012;5:135–148. doi:10.2147/DMSO.S22503
 19. Fujimori Y, Katsuno K, Nakashima I, Ishikawa-Takemura Y, Fujikura H, Isaji M. Remogliflozin etabonate, in a novel category of selective low-affinity sodium glucose cotransporter (SGLT2) inhibitors, exhibits antidiabetic efficacy in rodent models. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327:268–276. doi:10.1124/jpet.108.140210
 20. Turk E, Zabel B, Mundlos S, Dyer J, Wright EM. Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature*. 1991;350:354–356. doi:10.1038/350354a0
 21. Tsujihara K, Hongu M, Saito K, et al. Na⁺-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors as antidiabetic agents. 4. Synthesis and pharmacological properties of

- 4'-dehydroxyphlorizin derivatives substituted on the B ring. *J Med Chem.* 1999;42:5311–5324. doi:10.1021/jm990175n
22. Fushimi N, Fujikura H, Shiohara H, et al. Structure-activity relationship studies of 4-benzyl-1*H*-pyrazol-3-yl β -D-glucopyranoside derivatives as potent and selective sodium glucose co-transporter 1 (SGLT1) inhibitors with therapeutic activity on postprandial hyperglycemia. *Bioorg Med Chem.* 2012;20:6598–6612. doi:10.1016/j.bmc.2012.09.037
23. The crystal structures of **8b** has been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre and the CCDC deposition number are 2034277.
24. Kobayashi M, Isawa H, Sonehara J, Kubota M, Ozawa T. *O*-Glycosylation of 4-(substituted benzyl)-1,2-dihydro-3*H*-pyrazol-3-one derivatives with 2,3,4,6-tetra-*O*-acyl- α -D-glucopyranosyl bromide via N1-acetylation of the pyrazole ring. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2016;64:1009–1018. doi:10.1248/cpb.c15-00982
25. Kees KL, Fitzgerald JJ Jr, Steiner KE, et al. New potent antihyperglycemic agents in db/db mice: synthesis and structure-activity relationship studies of (4-substituted benzyl) (trifluoromethyl)pyrazoles and -pyrazolones. *J Med Chem.* 1996;39:3920-3928. doi:10.1021/jm960444z
26. Ohsumi K, Matsueda H, Hatanaka T, et al. Pyrazole-*O*-glucosides as novel Na⁺-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003;13:2269–2272. doi:10.1016/s0960-894x(03)00466-9
27. Nath RL, Rydon HN. The influence of structure on the hydrolysis of substituted phenyl β -D-glucosides by emulsin. *Biochem J.* 1954;57:1–10. doi:10.1042/bj0570001
28. Bisignano P, Ghezzi C, Jo H, et al. Inhibitor binding mode and allosteric regulation of Na⁺-glucose symporters. *Nat Commun.* 2018;9:5245. Published 2018 Dec 7. doi:10.1038/s41467-018-07700-1
29. Wielert-Badt S, Lin JT, Lorenz M, Fritz S, Kinne RK. Probing the conformation of the sugar transport inhibitor phlorizin by 2D-NMR, molecular dynamics studies, and pharmacophore analysis. *J Med Chem.* 2000;43:1692–1698. doi:10.1021/jm9905460

30. (a) Zhang X, Urbanski M, Patel M, et al. Indole-glucosides as novel sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors. Part 2. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16:1696-1701. doi:10.1016/j.bmcl.2005.12.006 (b) Zhang X, Urbanski M, Patel M, et al. Indole-glucosides as novel sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors. Part 2. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16:1696–1701. doi:10.1016/j.bmcl.2005.12.006
31. Hongu M, Tanaka T, Funami N, et al. Na⁺-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetic agents. II. Synthesis and structure-activity relationships of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1998;46:22–33. doi:10.1248/cpb.46.22
32. Haider K, Pathak A, Rohilla A, Haider MR, Ahmad K, Yar MS. Synthetic strategy and SAR studies of C-glucoside heteroaryls as SGLT2 inhibitor: A review. *Eur J Med Chem*. 2019;184:111773. doi:10.1016/j.ejmech.2019.111773
33. Heimann D, Börgel F, de Vries H, et al. Optimization of pharmacokinetic properties by modification of a carbazole-based cannabinoid receptor subtype 2 (CB₂) ligand. *Eur J Med Chem*. 2018;143:1436–1447. doi:10.1016/j.ejmech.2017.10.049
34. Mohan V, Mithal A, Joshi SR, Aravind SR, Chowdhury S. Remogliflozin Etabonate in the Treatment of Type 2 Diabetes: Design, Development, and Place in Therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:2487–2501. Published 2020 Jun 24. doi:10.2147/DDDT.S221093
35. (a) Dobbins RL, O'Connor-Semmes R, Kapur A, et al. Remogliflozin etabonate, a selective inhibitor of the sodium-dependent transporter 2 reduces serum glucose in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14:15–22. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01462.x (b) Hussey EK, Kapur A, O'Connor-Semmes R, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of remogliflozin etabonate, a novel SGLT2 inhibitor, and metformin when co-administered in subjects with type 2 diabetes mellitus. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2013;14:25. Published 2013 Apr 30. doi:10.1186/2050-6511-14-25 (c) Sykes AP, O'Connor-Semmes R, Dobbins R, et al. Randomized trial showing efficacy and safety of twice-daily remogliflozin etabonate for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2015;17:94–97. doi:10.1111/dom.12391 (d)

- Dharmalingam M, Aravind SR, Thacker H, et al. Efficacy and Safety of Remogliflozin Etabonate, a New Sodium Glucose Co-Transporter-2 Inhibitor, in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A 24-Week, Randomized, Double-Blind, Active-Controlled Trial. *Drugs*. 2020;80:587–600. doi:10.1007/s40265-020-01285-0
36. Bonora BM, Avogaro A, Fadini GP. Extraglycemic Effects of SGLT2 Inhibitors: A Review of the Evidence. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:161–174.
37. Nakano S, Katsuno K, Isaji M, et al. Remogliflozin Etabonate Improves Fatty Liver Disease in Diet-Induced Obese Male Mice. *J Clin Exp Hepatol*. 2015;5:190–198. doi:10.1016/j.jceh.2015.02.005
38. Gottlieb HE, Kotlyar V, Nudelman A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J Org Chem*. 1997;62:7512–7515. doi:10.1021/jo971176v
39. Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Seventh Edition