

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03806484.7

C07H 15/203 (2006.01)
A61K 31/7034 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 3 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1307190C

[22] 申请日 2003.3.4 [21] 申请号 03806484.7

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 22 [33] JP [31] 81038/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/002466 2003. 3. 4

[87] 国际公布 WO2003/080635 日 2003. 10. 2

[85] 进入国家阶段日期 2004. 9. 20

[73] 专利权人 橘生药品工业株式会社

地址 日本长野县

[72] 发明人 伊与部亮 寺西弘孝 田谷和也

米洼滋 伊佐治正幸

[56] 参考文献

WO 0168660A1 2001. 9. 20

WO 0174834A1 2001. 10. 11

审查员 孙 燕

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

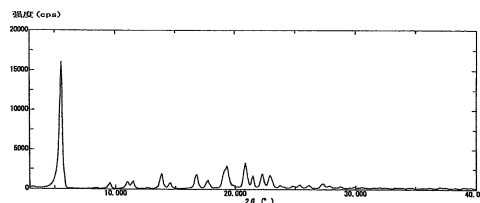
权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 2 页

[54] 发明名称

吡喃葡萄糖基氧代苄基苯衍生物的晶体

[57] 摘要

本发明提供 2 - (4 - 甲氧基苄基) 苯基 6 - O - 乙氧基羰基 - β - D - 吡喃葡萄糖苷的晶体、包含它的药物组合物以及它们的用途, 它表现出极好的 SGLT2 抑制活性, 并且用于治疗或预防与高血糖有关的疾病。



1. 一种 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的晶体，它的 X 射线粉末衍射图在衍射角 $2\theta \pm 0.1$ 为 5.6 度、13.8 度、14.6 度、16.8 度、17.7 度和 20.8 度时具有特征峰。

2. 一种 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的晶体，它的 X 射线粉末衍射图在衍射角 $2\theta \pm 0.1$ 为 4.7 度、5.5 度、7.3 度、8.6 度、14.5 度和 16.7 度时具有特征峰。

3. 一种药物组合物，所述组合物包含权利要求 1-2 任一项所述晶体作为活性成分，它用于预防或治疗与高血糖有关的疾病。

4. 权利要求 1-2 任一项所述晶体的用途，它用于制造预防或治疗与高血糖有关的疾病的药物。

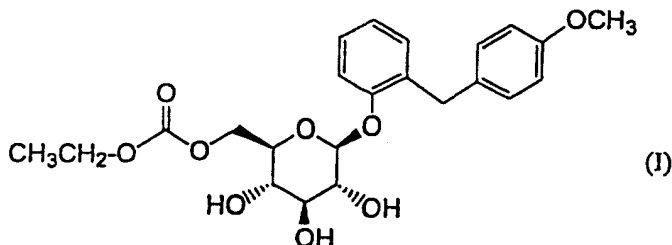
吡喃葡萄糖基氧代苄基苯衍生物的晶体

技术领域

本发明涉及 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基-β-D-吡喃葡萄糖苷的结晶以及它们的用途。

技术背景

通式(I)所示 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基-β-D-吡喃葡萄糖苷是文献中未知的新化合物，它是本发明申请人发现的。



这种化合物在体内转化成 2-(4-甲氧基苄基)苯基β-D-吡喃葡萄糖苷的活性形式，它对 SGLT2 具有极好的抑制活性，且用于治疗或预防与高血糖有关的疾病，如糖尿病、糖尿病并发症、肥胖症等。迄今为止，并不知道这种化合物的任一结晶形式。

发明内容

到目前为止，仅已制备呈无定形形式的 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基-β-D-吡喃葡萄糖苷。为了制备所述化合物高纯度的无定形形式，需要麻烦的纯化步骤。而且，所述化合物的无定形形式的稳定性不能令人满意，而且由于其粘性，难以制备制剂。

本发明人充分地研究了 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基-β-D-吡喃葡萄糖苷的结晶形式，所述结晶形式具有良好的储存稳定性，且适合制成制剂，并已发现 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基-β-D-吡喃葡萄糖苷具有两种结晶形式，“结晶形式α”和“结晶形式β”。而且，本发明人已经出乎意料地发现可以通过方便的纯化步骤来制备高纯度的结晶形式，所述结晶形式具有良好的储存稳

定性和流动性，因此适合制成制剂。基于这些发现，完成了本发明。

因此，本发明提供：

- (1) 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-0-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的晶体；
- (2) 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-0-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的晶体，其 X 射线粉末衍射图在衍射角($2\theta \pm 0.1$)为 5.6 度、13.8 度、14.6 度、16.8 度、17.7 度和 20.8 度时具有特征峰(下文称为“结晶形式 α ”)；
- (3) 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-0-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的晶体，其 X 射线粉末衍射图在衍射角($2\theta \pm 0.1$)为 4.7 度、5.5 度、7.3 度、8.6 度、14.5 度和 16.7 度时具有特征峰(下文称为“结晶形式 β ”)；
- (4) 药物组合物，它包含以上(1)-(3)任一项所述作为活性成分的晶体；
- (5) 以上(4)所述的药物组合物，它用于预防或治疗与高血糖有关的疾病；
- (6) 以上(1)-(3)任一项所述晶体的用途，它用于制造预防或治疗与高血糖有关的疾病的药物；
- (7) 预防或治疗与高血糖有关的疾病的方法，它包括施用治疗有效量的以上(1)-(3)任一项所述的晶体。

附图简要说明

图 1 是实施例 1 中制备的 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-0-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的结晶形式 α 的 X 射线粉末衍射图，所述纵坐标显示以 cps 表示的 X 射线强度，所述横坐标显示以 2θ 表示的衍射角。

图 2 是实施例 4 中制备的 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-0-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的结晶形式 β 的 X 射线粉末衍射图，所述纵坐标显示以 cps 表示的 X 射线强度，所述横坐标显示以 2θ 表示的衍射角。

最佳实施方式

本发明 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-0-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的结晶形式 α 和 β 可如下所述制备。

在加热条件下，将所述化合物的无定形形式溶于乙醇中，然后刮下冰冷却条件下容器壁上的结晶，首先制得 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-0-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的晶体。所述晶体为结晶形式 α 和 β 的混合物。本发明人迫切研究了结晶条件，并发现通过在下述具体溶剂中进行结晶可以制备本发明纯结晶形式的结晶

形式 α 和 β 。

本发明结晶形式 α 可以如下所述制备。在加热条件下，将 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的任意形式溶于合适的第一溶剂中(也称为“良好溶剂”)。之后，若需要的话，向所述溶液中加入第二溶剂(也称为“差溶剂”)，并搅拌所得混合物，或静置结晶。收集所沉积的结晶，并干燥提供结晶形式 α 。第一溶剂的例子包括乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、丙酮或甲基乙基酮，它们可以单独使用或者作为一种或多种溶剂的混合液使用。第一溶剂的量随溶剂的种类而异，通常约为 2-20 重量份(以 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的重量份计)。第二溶剂的例子可以在第一溶剂中与所述化合物的溶液混溶，包括己烷、庚烷或水。第二溶剂的量随溶剂的种类而异，通常约为 0.1-5 重量份(以第一溶剂的重量份计)。结晶形式 α 的结晶温度通常低于约 50 $^{\circ}\text{C}$ ，优选约为 20-50 $^{\circ}\text{C}$ 。结晶时间随结晶温度而异，通常约为 1-24 小时。

本发明结晶形式 β 可以如下所述制备。将 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的任意形式溶解在甲醇中，甲醇量通常约为 3-10 重量份，优选约 4-6 重量份(以 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的重量份计)。之后，在约 30-40 $^{\circ}\text{C}$ 的温度，在减压条件下浓缩所述溶液，并收集所沉积的结晶，并干燥提供结晶形式 β 。或者，在约 120-140 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下加热 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的无定形形式约 1-4 小时，由此制备结晶形式 β 。

由此制得的结晶形式 α 和 β 可以通过其特征衍射峰来识别，如图 1 或 2 中所示的 X-射线粉末衍射图；

(1) 结晶形式 α 在衍射角($2\theta\pm 0.1$)为 5.6 度、13.8 度、14.6 度、16.8 度、17.7 度和 20.8 度时具有特征峰，如图 1 所示；

(2) 结晶形式 β 在衍射角($2\theta\pm 0.1$)为 4.7 度、5.5 度、7.3 度、8.6 度、14.5 度和 16.7 度时具有特征峰，如图 2 所示。

本发明结晶形式 α 和 β 可以长时间储存在普通储存条件下，如 25 $^{\circ}\text{C}$ /60%相对湿度等，而不会改变其结晶形式，而且它在化学上稳定。本发明结晶形式 α 和 β 具有极好的流动性和良好的运输性质，它可以按照常规方法制成粉末、细颗粒、颗粒、片剂、胶囊等。

在使用包含本发明晶体作为活性成分的药物组合物时，根据其用途可以施用各种剂型。示范性的剂型包括粉末、颗粒、细颗粒、干燥糖浆、片剂、胶囊、注

射剂、液体、软膏、栓剂、泥敷剂等，它们可以口服或者肠外施用。

根据其剂型，使用常规的制制方法使之和合适量的药物添加剂如赋形剂、崩解剂、粘结剂、润滑剂、稀释剂、缓冲剂、等渗剂(isotonic agent)、防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、稳定剂、增溶剂等混合、稀释或溶解，可以配制药物组合物。

当使用药物组合物进行医学治疗时，本发明晶体作为活性成分的剂量根据个体患者的年龄、性别或体重，疾病的严重程度，治疗的条件等适当地确定。口服的一般剂量约为 0.1-1000mg/天/成人。肠外施用的一般剂量约为 0.01-300mg/天/成人。所述剂量可以以单独或均分剂量施用，例如每天 1 至几次。

实施例

以下实施例、参考例和测试例更详细地说明了本发明。但是应理解，它们决不是用于限制本发明的范围。

使用 X-射线衍射分析器 RINT2100(Rigaku)获得各结晶形式的 X-射线粉末衍射图，它在 40kV 的电子管电压和 40mA 电子管电流下操作，并使用 Cu 光束。

参考例 1

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

向 2-(4-甲氧基苄基)苯酚(46mg)溶液和 2, 3, 4, 6-四-O-乙酰基-1-O-三氯乙酰亚氨基- α -D-吡喃葡萄糖(0.13g)的二氯甲烷(2mL)溶液中加入三氟二乙醚硼复合物(0.033mL)，并在室温下搅拌 1 小时。使用柱色谱在氨基丙基硅胶上纯化所述反应混合物(洗脱液：二氯甲烷)，制得 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(0.11g)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta_{\text{ppm}}$: 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, $J=2.5, 12.2\text{Hz}$), 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)。

参考例 2

2-(4-甲氧基苄基)苯基 β -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- β -D-吡喃葡萄糖苷(0.11g)的甲醇(4mL)溶液中,混合液在室温下搅拌30分钟。在减压条件下除去所述溶剂。使用柱色谱在硅胶上纯化所述残留物(洗脱液:二氯甲烷/甲醇=10/1),制得2-(4-甲氧基苄基)苯基 β -D-吡喃葡萄糖苷(65mg)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})\delta_{\text{ppm}}$: 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, $J=15.1\text{Hz}$), 4.91(1H, d, $J=7.4\text{Hz}$), 6.75-6.85(2H, m), 6.85-6.95(1H, m), 6.95-7.10(1H, m), 7.10-7.20(4H, m)。

参考例 3

2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷

在室温下,向2-(4-甲氧基苄基)苯基 β -D-吡喃葡萄糖苷(0.075g)的2,4,6-三甲基吡啶(2mL)溶液中加入氯甲酸乙酯(0.04mL)中。在室温下搅拌所述混合物16小时后,将柠檬酸的饱和水溶液加入所述反应混合物中,并用乙酸乙酯萃取所述混合物。用水洗涤所述萃取物,并在无水硫酸镁上干燥,并在减压条件下除去溶剂。使用制备型薄层色谱法在硅胶上纯化所述残留物(洗脱液:二氯甲烷/甲醇=10/1),制得2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的无定形形式(0.032g)。通过X射线粉末衍射分析,所述无定形物质没有性质不同的峰。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})\delta_{\text{ppm}}$: 1.23(3H, t, $J=7.1\text{Hz}$), 3.30-3.65(4h, m), 3.74(3H, s), 3.93(1H, d, $J=15.1\text{Hz}$), 4.02(1H, d, $J=15.1\text{Hz}$), 4.05-4.20(2H, m), 4.29(1H, dd, $J=6.4, 11.7\text{Hz}$), 4.45(1H, dd, $J=2.2, 11.7\text{Hz}$), 4.89(1H, d, $J=7.4\text{Hz}$), 6.75-6.85(2H, m), 6.85-7.05(2H, m), 7.05-7.2(4H, m)。

实施例 1

2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的结晶形式 α

在约5-10 $^{\circ}\text{C}$ 下,向2-(4-甲氧基苄基)苯基 β -D-吡喃葡萄糖苷(220g)和2,6-二甲基吡啶(136mL)的丙酮(834mL)搅拌溶液中加入氯甲酸乙酯(84mL)。之后,在约10-20 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌所述混合物4小时。向所述反应混合物中加入水和乙酸乙酯,并分离所述有机层。连续用10%柠檬酸水溶液、盐水、10%碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤所述有机层,并在无水硫酸钠上干燥。通过过滤除去所述干燥剂,并在减压条件下除去所述滤液的溶剂。在加热条件下,将残留物(326g)溶于乙醇(1039mL)中,并用活性炭(11g)处理所得溶液。在搅拌所述混合物5分钟之后,通过硅藻土过滤不溶物。在30-40 $^{\circ}\text{C}$ 下,约45分钟内向所述滤液中加入正己烷(2046mL),并使所

得混合物在室温下静置 17 小时。之后，在冰冷却条件下搅拌所述混合物 2 小时，过滤收集所沉淀的晶体，制得 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的粗晶体(202g)。

使用另一 2-(4-甲氧基苄基)苯基 β -D-吡喃葡萄糖苷(220g)和 2, 6-二甲基吡啶(136mL)如上所述的相同步骤制得 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的粗晶体(200g)。将所述粗晶体混合，并边搅拌边加热 300g 粗晶体、异丙醇(4260mL)和甲基乙基酮(225mL)，直到呈清晰溶液。用活性炭(15g)处理所述溶液，并搅拌所述混合物 15 分钟，并过滤。在约 50 $^{\circ}$ C 向所述滤液中加入结晶形式 α 的晶种，并在搅拌下在 1 小时内将所述混合物冷却至约 35 $^{\circ}$ C。之后，使所述混合物静置过夜，然后在冰冷却条件下搅拌 2 小时。过滤收集所沉淀的晶体，用冷的异丙醇洗涤，并在减压条件下在约 60 $^{\circ}$ C 干燥 12 小时，提供 240g 晶体。

通过 X-射线粉末衍射图分析，所述结晶鉴别为结晶形式 α 。所述结晶的 X-射线粉末衍射图如图 1 所示。

实施例 2

2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的结晶形式 α

在搅拌条件下，在 60-65 $^{\circ}$ C 加热 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷(5.0g)和乙醇(30mL)的混合物，直到呈清晰溶液。将所述溶液冷却至 40-45 $^{\circ}$ C，并在相同温度下搅拌 1 小时，并在 20-30 $^{\circ}$ C 下再搅拌 1 小时。过滤收集所沉淀的晶体，并在减压条件下在约 70 $^{\circ}$ C 干燥 4 小时，提供 3.33g 晶体。

通过 X-射线粉末衍射图分析，所述结晶鉴别为结晶形式 α 。

实施例 3

2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的结晶形式 α

在搅拌条件下，在 40-45 $^{\circ}$ C 加热 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷(90.0g)和丙酮(300mL)的混合物，直到呈清晰溶液。将所述溶液冷却至 35 $^{\circ}$ C，并在 25-35 $^{\circ}$ C 向其中加入正己烷(300mL)。所述混合物在 30-35 $^{\circ}$ C 搅拌 15 分钟，并在 20 分钟内加入另一正己烷。而且，在 5 分钟内加入正己烷(300mL)，在室温搅拌所得混合物过夜。过滤收集所沉淀的晶体，并在减压条件下在约 70 $^{\circ}$ C 干燥 5 小时，提供 81.9g 晶体。

通过 X-射线粉末衍射图分析，所述结晶鉴别为结晶形式 α 。

实施例 4

2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的结晶形式 β

将参考例 3 中得到的 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷(5.0g)无定形式置于烘箱中,并在 125°C 下加热 3 小时。冷却至室温后,得到 4.9g 晶体。

通过 X-射线粉末衍射图分析,所述晶体为结晶形式 β 。所述晶体的 X-射线粉末衍射图如图 2 所示。

实施例 5

2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的结晶形式 β

在搅拌时加热 2-(4-甲氧基苄基)苯基 6-O-乙氧基羰基- β -D-吡喃葡萄糖苷(1.0g)和甲醇(5mL)的混合物,直到呈清晰溶液。在减压条件下浓缩所述溶液至干燥。收集所沉淀的晶体,并在减压条件下在约 70°C 干燥 5 小时,提供 0.9g 晶体。

通过 X-射线粉末衍射图分析,所述结晶鉴别为结晶形式 β 。

测试例 1

稳定性测试

在以下条件下进行结晶形式 α 和 β 的稳定性。使用 HPLC 确定测试物质的残留物百分数,并使用 X-射线粉末衍射分析来检测结晶形式的变化。

HPLC 条件:

检波: 225nm

柱: Inertsil ODS-3

柱温: 30°C

移动相: 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液(pH3.0):乙腈=58:42→30:70

流速: 1.0mL/分钟

储存条件:

- 1) 40°C/75%相对湿度, 2 个月, 塞紧
- 2) 60°C, 2 个月, 塞紧

因此,本发明结晶形式 α 和 β 的结晶形式和残留百分数没有变化,并具有极好的储存稳定性。

测试例 2

对人类 SGLT2 活性的抑制效果的测定

1) 表达人类 SGLT2 的质粒载体的构建

使用 SUPERScript 预扩增系统(Gibco-BRL: LIFE TECHNOLOGIES), 用作为引物的寡核苷酸 dT 反转录来自人肾脏的总 RNA(Ori 基因)制备 PCR 扩增的 cDNA 文库。通过使用 Pfu 聚合酶(Stratagene)的 PCR 反应来扩增编码人类 SGLT2 的 DNA 片段, 其中, 使用上述人肾脏 cDNA 文库作为模板, 使用以下分别表示为序列号 1 和 2 的寡核苷酸作为引物。按照试剂盒的标准方法, 所述扩增的 DNA 片段接入 PCR-Blunt(Invitrogen), 用于克隆的载体。感受态细胞大肠杆菌 HB101(Toyobo)按照常规方法转化, 然后在含有 50 微克/毫升卡那霉素的 LB 琼脂培养基上进行转化体的选择。在提取质粒 DNA 并从一个转化体纯化之后, 通过使用 Pfu 聚合酶(Stratagene)的 PCR 反应进行编码人类 SGLT2 的 DNA 片段的扩增, 其中, 使用以下寡核苷酸 0714F 和 0715R 作为引物, 它们分别表示为序列号 3 和 4。用限制性内切酶 Xho I 和 Hind III 消化所述扩增的 DNA 片段, 然后用 Wizard 纯化系统(Promega)纯化。所述纯化的 DNA 片段插入 pcDNA3.1(-)Myc/His-B(Invitrogen) (一种表达融合蛋白的载体)的相应多克隆位点。感受态细胞大肠杆菌 HB101(Toyobo)按照常规方法转化, 然后在含有 100 微克/毫升氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上进行转化体的选择。在提取质粒 DNA 并从此转化体纯化之后, 分析插入 pcDNA3.1(-)Myc/His-B 的多克隆位点的 DNA 片段的碱基序列。相比 Wells 等人(Am. J. Physiol. 第 263 卷, 第 459-465(1992))所报道的人类 SGLT2, 这种克隆具有单一的碱基取代(编码异亮氨酸-433 的 ATC 由 GTC 取代)。

顺序地得到其中缬氨酸被异亮氨酸-433 取代的克隆。这种表达人类 SGLT2 的质粒载体称为 KL29, 其中表示为序列号 5 的多肽与羧基末端丙氨酸残基融合。

序列号 1	ATGGAGGACACAGAGGC
序列号 2	GGCATAGAAGCCCCAGACCA
序列号 3	AACCTCGAGATGGAGGAGCACACAGAGGC
序列号 4	AACAAGCTTGGCATAGAAGCCCCAGAGGA
序列号 5	KLGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

2) 瞬时表达人类 SGLT2 的细胞的制备

将 KL29(编码人类 SGLT2 的质粒)通过电穿孔方法转染到 COS-7 细胞(RIKEN CELL BANK RCB0539)中。在以下条件下,在 0.4cm 型小池中的 500 微升 OPTI-MEM I 介质(Gibco-BRL:LIFE TECHNOLOGIES)中用 GENE PULSER II(Bio-Rad Laboratories)进行电穿孔:0.290 千伏、975 微法, 2×10^6 个 COS-7 细胞以及 20 微克 KL29。在基因转移之后,通过离心收集所述细胞,并用 OPTI-MEM I 介质(1mL/小池)重悬浮。在 96 孔平皿的各孔中加入 125 微升这种细胞悬浮液。在 37°C, 5%CO₂ 下培养过夜之后,在各孔中加入 125 微升 DMEM 培养基,培养基含 10%血清(Sankojyunyaku)、100 单位/mL 青霉素 G 钠(Gibco-BRL:LIFE TECHNOLOGIES)、100 微克/毫升硫酸链霉素(Gibco-BRL:LIFE TECHNOLOGIES)。在培养到次日后,使用这些细胞来测定其抑制甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷吸收的活性。

3) 测定抑制甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷吸收的活性

在将测试化合物溶于二甲基亚砜,并用吸收缓冲剂(pH7.4 缓冲液,含有 140mM 氯化钠, 2mM 氯化钾、1mM 氯化钙, 1mM 氯化镁, 5mM 甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷, 10mM 2-[4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸和 5mM 三(羟甲基)氨基甲烷)稀释之后,使用各稀释液作为测定抑制活性的测试样品。在除去瞬时表达人类 SGLT2 的 COS-7 细胞的培养基之后,向各孔加入 200 微升预处理缓冲液(pH7.4 的缓冲液,含有 140mM 氯化胆碱, 2mM 氯化钾、1mM 氯化钙, 1mM 氯化镁, 10mM 2-[4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸和 5mM 三(羟甲基)氨基甲烷),并在 37°C 孵化所述细胞 10 分钟。在除去所述预处理缓冲液之后,再次加入 200 微升相同的缓冲液,并在 37°C 孵化所述细胞 10 分钟。通过将 7 微升甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷(Amersham Pharmacia Biotech)加入 525 微升制备的测试样品中来制备测定用缓冲液。作为对照,制备没有测试化合物的测定用缓冲液。为了评价在没有测试化合物和钠时的基本吸收,类似地制备用于测定基本吸收的缓冲液,它含有 140mM 氯化胆碱(代替氯化钠)。在除去预处理缓冲液之后,向各孔中加入 75 微升测量用缓冲液,在 37°C 孵化所述细胞 2 小时。在除去用于测定的缓冲液之后,向各孔中加入 200 微升洗涤缓冲液(pH7.4 缓冲液,含有 140mM 氯化胆碱, 2mM 氯化钾、1mM 氯化钙, 1mM 氯化镁, 10mM 甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷, 10mM 磺酸 2-[4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基]乙烷和 5mM 三(羟甲基)氨基甲烷),并立即除去。在洗涤两次之后,通过向各孔中加入 75 微升 0.2N 氢氧化钠来溶解所述细胞。在将细胞裂解物转移到 picoplate(Packard)并向各孔中加入 150 微升 MicroScint-40(Packard)之后,用

微型板闪烁计数器 TopCount (packard)测定辐射活性。所得吸收的差异为对照中辐射活性减去基本吸收中辐射活性的 100%值，然后，由浓度-抑制曲线通过最小二乘方法计算抑制 50%吸收时的浓度 (IC₅₀ 值)。结果列于下表 1。

表 1

测试化合物	IC ₅₀ 值 (nM)
参考例 2	350

工业应用性

通过方便的纯化方法可以制备高纯度的本发明结晶形式 α 和 β ，并且适合商业生产。本发明结晶形式 α 和 β 具有良好的储存稳定性，且适合生产并提供质量恒定的药品质量。而且，本发明结晶形式 α 和 β 具有良好的流动性和操作性质，且适合配制。因此，本发明结晶形式 α 和 β 可用作药物。

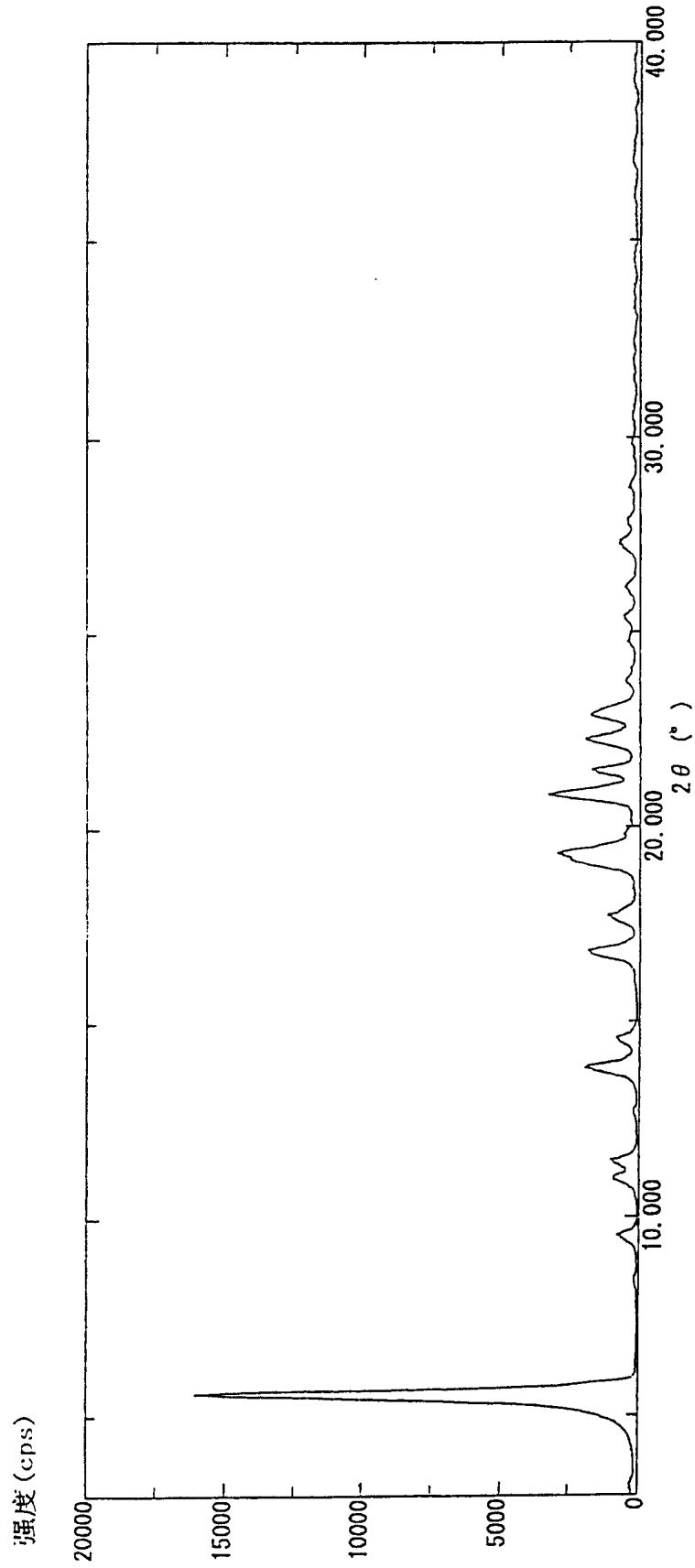


图 1

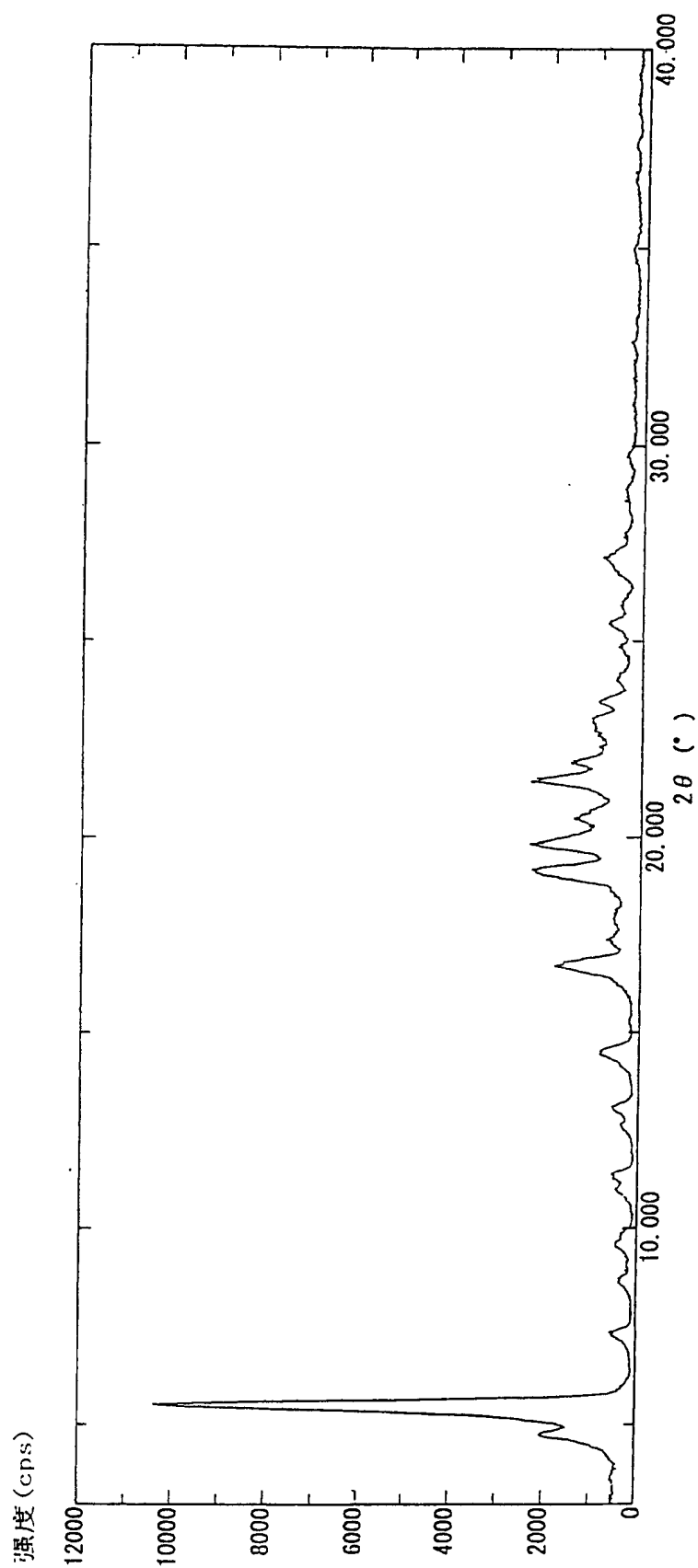


图 2