

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年10月2日 (02.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/080635 A1

- (51) 国際特許分類: C07H 15/203, A61K 31/7034, A61P 3/04, 3/10
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/02466
- (22) 国際出願日: 2003年3月4日 (04.03.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-81038 2002年3月22日 (22.03.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): キッセイ薬品工業株式会社 (KISSEI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒399-8710 長野県 松本市 芳野 1 9 番 4 8 号 Nagano (JP).

町北穂高 4 4 9-2 Nagano (JP). 寺西 弘孝 (TERANISHI, Hiroataka) [JP/JP]; 〒399-0005 長野県 松本市 野溝木工 1-2-3 4 キッセイ第二青友寮 Nagano (JP). 田谷 和也 (TATANI, Kazuya) [JP/JP]; 〒390-0805 長野県 松本市 清水 1-3-5 サンスーシ 2 1-2 0 3 Nagano (JP). 米窪 滋 (YONEKUBO, Shigeru) [JP/JP]; 〒399-8101 長野県 南安曇郡 三郷村明盛 4 1 5-1 カーサ 3 7 A 1 0 2 Nagano (JP). 伊佐治 正幸 (ISAJI, Masayuki) [JP/JP]; 〒399-0704 長野県 塩尻市 広丘郷原 1 7 6 3-1 8 9 Nagano (JP).

- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊與部 亮 (IY-OBE, Akira) [JP/JP]; 〒399-8302 長野県 南安曇郡 穂高

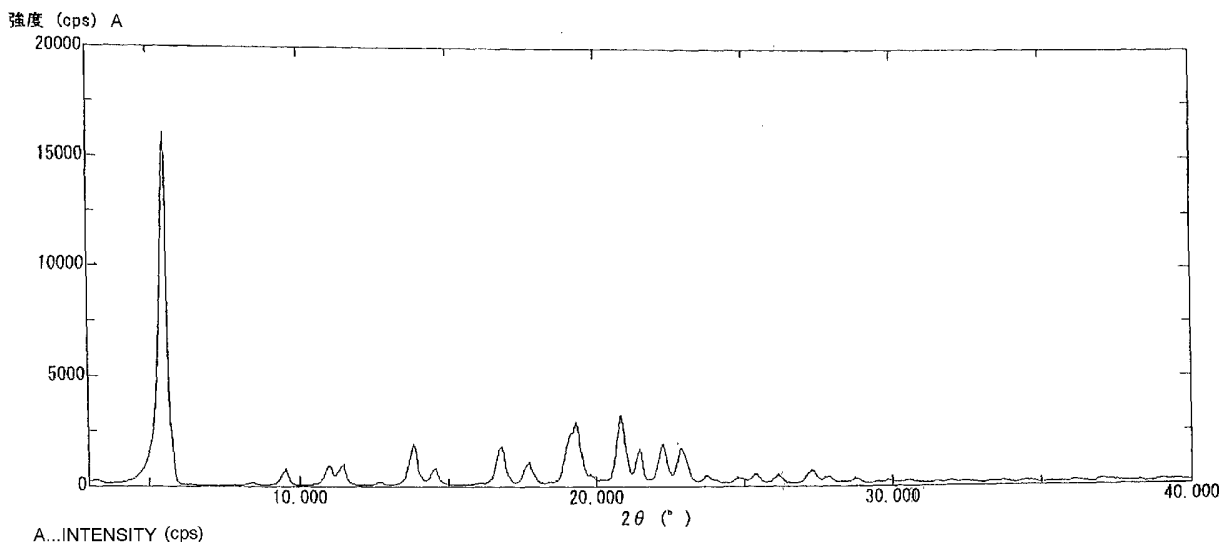
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,

[続葉有]

(54) Title: CRYSTALS OF GLUCOPYRANOSYLOXYBENZYL BENZENE DERIVATIVE

(54) 発明の名称: グルコピラノシルオキシベンジルベンゼン誘導体の結晶



(57) Abstract: It is intended to provide crystals of 2-(4-methoxybenzyl)phenyl 6-O-ethoxycarbonyl-β-D-glucopyranoside, which exhibits an excellent SGLT2 inhibitory effect and is useful as a preventive or a remedy for diseases caused by hyperglycemia, medicinal compositions containing the same and use thereof.

(57) 要約: 本発明は、優れたSGLT2阻害作用を示し、高血糖症に起因する疾患の予防または治療薬として有用である、2-(4-メトキシベンジル)フェニル6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドの結晶、それを含有する医薬組成物およびそれらの用途を提供する。

WO 03/080635 A1



AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

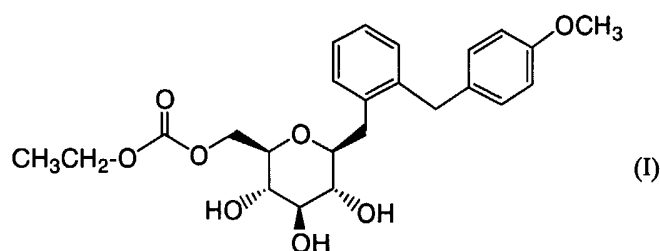
グルコピラノシルオキシベンジルベンゼン誘導体の結晶

5 [技術分野]

本発明は、2-(4-メトキシベンジル)フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドの結晶およびその用途に関する。

[背景技術]

10 式(I) :



で表される2-(4-メトキシベンジル)フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドは、当該出願人により見出された文献未記載の新規な化合物である。当該化合物は、生体内において活性本体である2-(4-メトキシベンジル)フェニル β-D-グルコピラノシドに変換されて優れたSGLT2阻害作用を示し、糖尿病、糖尿病性合併症、肥満症などの高血糖症に起因する疾患の予防または治療薬として有用な化合物である。これまで当該化合物の結晶物については知られていない。

[発明の開示]

20 従来、2-(4-メトキシベンジル)フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドは、アモルファスの形態でしか製造できなかった。このアモルファス形態は、高純度のものを製造するために煩雑な精製工程を要し、工業的生産に不向きであった。またこのアモルファス形態は、保存安定性が悪く、粘稠であるため製剤化するのが困難であった。

25 そこで、本発明者らは、保存安定性が良好であり、製剤化に適した2-(4

ーメトキシベンジル) フェニル 6-0-エトキシカルボニル-β-D-グル
コピラノシドの結晶について鋭意研究を重ねた結果、α型結晶およびβ型結晶
の2種類の結晶を見出し、これらの結晶が簡便な精製操作により高純度とする
ことができ工業的生産に適していること、さらにはこれらの結晶が、予想外にも
5 も優れた保存安定性を示し、流動性に優れ製剤化に適した結晶であることを見
出し、これらの知見に基づき本発明を完成した。

すなわち本発明は、

- (1) 2-(4-メトキシベンジル) フェニル 6-0-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドの結晶；
- 10 (2) 粉末X線回折による回折パターンが、回折角(2θ±0.1) 5.6、13.8、14.6、16.8、17.7および20.8度に特徴的なピークを有する2-(4-メトキシベンジル) フェニル 6-0-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドの結晶(以下、α型結晶と称する)；
- 15 (3) 粉末X線回折による回折パターンが、回折角(2θ±0.1) 4.7、5.5、7.3、8.6、14.5および16.7度に特徴的なピークを有する2-(4-メトキシベンジル) フェニル 6-0-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドの結晶(以下、β型結晶と称する)；
- (4) 上記(1)~(3)のいずれか一項に記載の結晶を有効成分として含有する医薬組成物；
- 20 (5) 高血糖症に起因する疾患を予防又は治療するための上記(4)に記載の医薬組成物；
- (6) 高血糖症に起因する疾患の予防又は治療剤を製造するための上記(1)~(3)のいずれか一項に記載の結晶の使用；および
- (7) 上記(1)~(3)のいずれか一項に記載の結晶の治療的有効量を投
25 与することを特徴とする高血糖症に起因する疾患の予防または治療方法に関する。

[図面の簡単な説明]

図1は、実施例1で得られた2-(4-メトキシベンジル) フェニル 6-

〇-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドのα型結晶の粉末X線回折図である。縦軸はX線の強度(cps)を示し、横軸は回折角(2θ)を示す。

図2は、実施例4で得られた2-(4-メトキシベンジル)フェニル6-
5 〇-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドのβ型結晶の粉末X線回折図である。縦軸はX線の強度(cps)を示し、横軸は回折角(2θ)を示す。

[発明を実施するための最良の形態]

10 本発明の最初の結晶は、アモルファス形態の2-(4-メトキシベンジル)フェニル6-〇-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドをエタノールに加熱溶解後、氷冷下で器壁をこすりながら結晶化させた。このようにして得られた結晶はα型結晶およびβ型結晶の混合物であったが、下記に示すような特定の溶媒から晶出させることによりα型結晶およびβ型結晶が純度の高い結晶として製造できるようになった。

すなわち本発明のα型結晶は、任意の形態の2-(4-メトキシベンジル)フェニル6-〇-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドを、適切な第一の溶媒(良溶媒)に加熱溶解し、必要に応じて第二の溶媒(貧溶媒)を加え、攪拌または放置して結晶を析出させ、次いで析出した結晶を単離し、乾燥することによって製造することができる。

20 上記第一の溶媒としては、エタノール、イソプロパノール、酢酸エチル、アセトンまたはメチルエチルケトンが使用され、必要に応じてこれらの溶媒を2種以上組み合わせて使用することができる。第一の溶媒の量は、溶媒の種類によっても異なるが、通常、当該化合物1重量部に対して約2~約20重量部が使用される。

25 上記第二の溶媒としては、当該化合物を第一の溶媒に溶かした溶液と混和する溶媒であればよく、例えば、ヘキサン、ヘプタンまたは水が使用される。第二の溶媒の量は、通常、第一の溶媒1重部に対して約0.1~約5重量部が使用される。

α 型結晶を晶出する際の晶出温度は、約50℃以下、好ましくは約20～約50℃であり、晶出時間は、晶出温度によっても異なるが、通常、約1時間～約24時間である。

一方、 β 型結晶は、任意の形態の2-(4-メトキシベンジル)フェニル
5 6-O-エトキシカルボニル- β -D-グルコピラノシドを、当該化合物1重量部に対して約3重量部～約10重量部、好ましくは約4重量部～約6重量部のメタノールに加熱溶解し、この溶液を約30℃～約40℃の温度で減圧下に濃縮して結晶を析出させ、次いで析出した結晶を単離し、乾燥することによって製造することができる。また β 型結晶は、アモルファス形態の2-(4-メ
10 トキシベンジル)フェニル 6-O-エトキシカルボニル- β -D-グルコピラノシドを約120℃～約130℃の温度に約1～約4時間保存することによっても製造することができる。

このようにして得られた2-(4-メトキシベンジル)フェニル 6-O-エトキシカルボニル- β -D-グルコピラノシドの α および β 型結晶は、図1
15 ～2の粉末X線回折チャートに示すように、以下の特徴的な回折ピークによって識別される：すなわち、

- (1) α 型結晶は、図1に示すような回折角($2\theta \pm 0.1$) 5.6、13.8、14.6、16.8、17.7および20.8度に特徴的なピークを有する；
- 20 (2) β 型結晶は、図2に示すような回折角($2\theta \pm 0.1$) 4.7、5.5、7.3、8.6、14.5および16.7度に特徴的なピークを有する。

本発明の α 型結晶および β 型結晶は、通常の保存条件(例えば、25℃/60%相対湿度など)では結晶形が変化することなく保存することができ、かつ化学的に安定である。さらにこれらの結晶は、流動性に優れ取り扱いが容易で
25 あり、常法により散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤などに製剤化することができる。

本発明の結晶を有効成分として含有する医薬組成物を実際の治療に用いる場合、用法に応じ種々の剤型のものが使用される。このような剤型としては、例えば、散剤、顆粒剤、細粒剤、ドライシロップ剤、錠剤、カプセル剤、注射剤、

液剤、軟膏剤、坐剤、貼付剤などを挙げることができ、経口または非経口的に投与される。

これらの医薬組成物は、その剤型に応じ製剤学的に公知の手法により、適切な賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、希釈剤、緩衝剤、等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解補助剤などの医薬品添加物と適宜混合または希釈・溶解することにより調剤することができる。

本発明の医薬組成物を実際の治療に用いる場合、その有効成分である本発明の結晶の投与量は患者の年齢、性別、体重、疾患および治療の程度等により適宜決定されるが、経口投与の場合成人1日当たり約0.1mg～約100.0mgの範囲で、非経口投与の場合は、成人1日当たり約0.01mg～約300mgの範囲で、一回または数回に分けて適宜投与することができる。

〔実施例〕

本発明の内容を以下の参考例、実施例および試験例でさらに詳細に説明するが、本発明はその内容に限定されるものではない。

尚、各結晶の粉末X線回折データは、株式会社リガクのX線回折装置RINT2100を用いて測定した（測定条件；Cu線、管電圧40kV、管電流40mA）。

20 参考例1

2-(4-メトキシベンジル)フェニル 2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-β-D-グルコピラノシド

2-(4-メトキシベンジル)フェノール(46mg)および2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-1-O-トリクロロアセトイミドイル-α-D-グルコピラノース(0.13g)の塩化メチレン(2mL)溶液に、三フッ化ホウ素-ジエチルエーテル錯体(0.033mL)を加え、室温にて1時間攪拌した。反応混合物をアミノプロピルシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒：塩化メチレン)にて精製し、2-(4-メトキシベンジル)フェニル 2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-β-D-グルコピラノシド(0.

1.1 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 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-メトキシベンジル)フェニル β -D-グルコピラノシド

10 2-(4-メトキシベンジル)フェニル 2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシド (0.11 g) のメタノール (4 mL) 溶液に、ナトリウムメトキシド (28%メタノール溶液、0.12 mL) を加え、室温にて30分間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 塩化メチレン/メタノール=10/1) で精製し、2-(4-メトキシベンジル)フェニル β -D-グルコピラノシド (6.5 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 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-メトキシベンジル)フェニル 6-O-エトキシカルボニル- β -D-グルコピラノシド

25 2-(4-メトキシベンジル)フェニル β -D-グルコピラノシド (0.075 g) の2, 4, 6-トリメチルピリジン (2 mL) 溶液に、室温にてクロロギ酸エチル (0.04 mL) を加えた。室温にて16時間攪拌後、反応混合物に飽和クエン酸水溶液を加え酢酸エチルで抽出した。抽出物を水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカ

ゲル分取薄相クロマトグラフィー（展開溶媒：塩化メチレン／メタノール＝10／1）により精製し、目的とするバンドをかき取った後、塩化メチレン／メタノールにより溶出した。得られた溶出液を減圧下に溶媒留去し、アモルファス形態の2-（4-メトキシベンジル）フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシド（0.032g）を得た。このものは、粉末X線回折測定の結果、識別可能なピークを示さなかった。

¹H-NMR (CD₃OD) δ ppm: 1.23 (3H, t, J=7.1Hz), 3.30-3.65 (4H, m), 3.74 (3H, s), 3.93 (1H, d, J=15.1Hz), 4.02 (1H, d, J=15.1Hz), 4.05-4.20 (2H, m), 4.29 (1H, dd, J=6.4, 11.7Hz), 4.45 (1H, dd, J=2.2, 11.7Hz), 4.89 (1H, d, J=7.4Hz), 6.75-6.85 (2H, m), 6.85-7.05 (2H, m), 7.05-7.2 (4H, m)

実施例 1

2-（4-メトキシベンジル）フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドのα型結晶

2-（4-メトキシベンジル）フェニル β-D-グルコピラノシド（220g）および2,6-ルチジン（136mL）のアセトン（834mL）溶液に、攪拌下、5～10℃の温度でクロロギ酸エチル（84mL）を滴下し、約10℃～20℃にてさらに4時間攪拌した。反応混合物に水および酢酸エチルを加え、有機層を分離した。有機層を10%クエン酸水溶液、食塩水、10%重曹水溶液、食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾別し、減圧下に溶媒留去した。濃縮物（326g）をエタノール（1039mL）に加熱溶解し、活性炭（11g）を加え5時間攪拌した後、不溶物をセライト濾過した。ろ液にn-ヘキサン（2046mL）を約30～約40℃の温度で約45分間かけて滴下し、室温で17時間静置した。この混合物を氷冷下でさらに2時間攪拌した後、析出した結晶を濾取し、2-（4-メトキシベンジル）フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドの粗結晶（202g）を得た。

2-（4-メトキシベンジル）フェニル β-D-グルコピラノシド（22

0 g) および 2, 6-ルチジン (136 mL) を用いて上記と同様の操作を行い、2-(4-メトキシベンジル) フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドの粗結晶をさらに 200 g 得た。これらの粗結晶を合わせ、その 300 g をイソプロパノール (4260 mL) およびメチルエチルケトン (225 mL) に加熱溶解し、活性炭 (15 g) を加え 15 分間攪拌した後、熱時濾過した。このろ液に、約 50℃ で α 型結晶の種晶を加え、攪拌下、約 35℃ まで約 1 時間かけて冷却し、さらに室温で一晩静置した。この混合物を氷冷下でさらに 2 時間攪拌し、析出した結晶を濾取した。得られた結晶を冷イソプロパノールで洗浄し、減圧下、約 60℃ で 12 時間乾燥して結晶 (240 g) を得た。この結晶の粉末 X 線回折図は図 1 に示す通りであり、α 型結晶であることが確認された。

実施例 2

2-(4-メトキシベンジル) フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドの α 型結晶

2-(4-メトキシベンジル) フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシド (5.0 g) およびエタノール (30 mL) の混合物を 60~65℃ に加熱し、完全に溶解するまで攪拌した。この混合物を 40~45℃ まで冷却し、同温度で 1 時間攪拌し、さらに 20~30℃ で 1 時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下、約 70℃ で 4 時間乾燥し、結晶 (3.33 g) を得た。この結晶は、粉末 X 線回折測定の結果、α 型結晶であることが確認された。

実施例 3

2-(4-メトキシベンジル) フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドの α 型結晶

2-(4-メトキシベンジル) フェニル 6-O-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシド (90.0 g) およびアセトン (300 mL) の混合物を 40~45℃ に加熱し、完全に溶解するまで攪拌した。この混合物を 35

℃まで冷却し、25～35℃の温度でn-ヘキサン（300 mL）を滴下した。この混合物を30～35℃で15分間攪拌した後、さらにn-ヘキサン（300 mL、300 mL）をそれぞれ20分、5分間かけて加え、室温にて一夜攪拌した。析出した結晶を濾取し、アセトン-ヘキサン（1：3）で洗浄した。

5 減圧下、約70℃で5時間乾燥し、結晶（81.9 g）を得た。この結晶は、粉末X線回折測定の結果、 α 型結晶であることが確認された。

実施例 4

2-（4-メトキシベンジル）フェニル 6-O-エトキシカルボニル- β -D-グルコピラノシドの β 型結晶

10

参考例 3 で得られたアモルファス形態の2-（4-メトキシベンジル）フェニル 6-O-エトキシカルボニル- β -D-グルコピラノシド（5.0 g）をオープン中にて125℃で3時間加熱した。室温まで冷却し、結晶（4.96 g）を得た。この結晶の粉末X線回折図は、図 2 に示す通りであり、 β 型結晶であることが確認された。

15

実施例 5

2-（4-メトキシベンジル）フェニル 6-O-エトキシカルボニル- β -D-グルコピラノシドの β 型結晶

20

2-（4-メトキシベンジル）フェニル 6-O-エトキシカルボニル- β -D-グルコピラノシド（1.0 g）をメタノール（5 mL）に加熱溶解し、この溶液を約40℃の温度で減圧下濃縮して結晶を析出させた。この結晶を取りだし、減圧下、約70℃で5時間乾燥し、結晶（0.9 g）を得た。この結晶は、粉末X線回折測定の結果、 β 型結晶であることが確認された。

25

試験例 1

安定性試験

α 型結晶および β 型結晶を下記の条件に保存し、以下の条件のHPLCにより残存率を測定し、粉末X線回折により結晶形の変化の有無を調べた。

HPLC条件：

- 検出波長； 225nm
カラム； Inertsil ODS-3
カラム温度； 30℃
- 5 移動相； 0.02mol/Lリン酸緩衝液(pH3.0)：アセトリル混液
(58：42→30：70)
- 流速； 1.0mL/min

保存条件1； 40℃／75%相対湿度、密栓状態、2ヶ月

保存条件2； 60℃、密栓状態、2ヶ月

- 10 その結果、本発明の α 型結晶および β 型結晶は、残存率および結晶形に変化が見られず、優れた保存安定性を示した。

試験例2

ヒトSGLT2活性阻害作用確認試験

- 15 1) ヒトSGLT2発現プラスミドベクターの作製

SUPERSCRIPT Preamplification System (Gibco-BRL:LIFE TECHNOLOGIES製)を用いて、ヒト腎臓由来のtotal RNA (Origene製)をオリゴdTをプライマーとして逆転写し、PCR増幅用cDNAライブラリーを作製した。上記ヒト腎cDNAライブラリーを鋳型として、配列番号1及び2で示される下記のオリゴヌクレオチド0702F及び0712Rをプライマーに用い、Pfu DNA Polymerase (Stratagene社製)を用いたPCR反応によりヒトSGLT2をコードするDNA断片を増幅した。増幅されたDNA断片をクローニング用ベクターpCR-Blunt (Invitrogen製)にこのキットの標準法に従いライゲーションした。常法により大腸菌HB101コンピテントセル(東洋紡(株)製)に導入した後、形質転換株をカナマイシン50 μ g/mLを含むLB寒天培地で選択した。この形質転換株の1つからプラスミドDNAを抽出精製し、配列番号3及び4で示される下記のオリゴヌクレオチド、0714Fおよび0715Rをプライマーとして用

20

25

い、Pfu DNA Polymerase (Stratagene社製) を用いたPCR反応によりヒトSGLT2をコードするDNA断片を増幅した。増幅されたDNA断片を制限酵素XhoI及びHindIIIで消化した後、Wizard Purification System (Promega製) により精製した。この精製したDNA断片を融合化蛋白質発現用ベクターpcDNA3.1(-)Myc/His-B (Invitrogen製) の対応する制限酵素部位に組み込んだ。常法により大腸菌HB101コンピテントセル (東洋紡 (株) 製) に導入した後、形質転換株を、アンピシリン100 μ g/mLを含むLB寒天培地で選択した。この形質転換株からプラスミドDNAを抽出精製し、ベクターpcDNA3.1(-)Myc/His-Bのマルチクローニング部位に挿入されたDNA断片の塩基配列を調べた。Wellisらにより報告されたヒトSGLT2 (Am. J. Physiol., Vol. 263, pp. 459-465 (1992)) に対し、このクローンは1塩基の置換 (433番目のイソロイシンをコードするATCがGTCに置換) を有していた。この結果433番目の残基のイソロイシンがバリンに置換したクローンを得た。このカルボキシ末端側最終残基のアラニンの次から配列番号5で示されるペプチドを融合化したヒトSGLT2を発現するプラスミドベクターをKL29とした。

配列番号1 ATGGAGGAGCACACAGAGGC

20 配列番号2 GGCATAGAAGCCCCAGAGGA

配列番号3 AACCTCGAGATGGAGGAGCACACAGAGGC

配列番号4 AACCAAGCTTGGCATAGAAGCCCCAGAGGA

配列番号5 KLGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHH

25 2) ヒトSGLT2一過性発現細胞の調製

ヒトSGLT2発現プラスミドKL29を電気穿孔法によりCOS-7細胞 (RIKEN CELL BANK RCB0539) に導入した。電気穿孔法はジーンパルサーII (Bio-Rad Laboratories製) を使い、OPTI-MEM I培地 (Gibco-BRL:LIFE TECH

NOLOGIES製) 500 μ Lに対しCOS-7細胞 2×10^6 個とKL2
9 20 μ gを含む0.4 cmキューベット内で0.290 kV、975 μ Fの
条件下行った。遺伝子導入後、細胞を遠心分離により回収し細胞1キューベット
分に対し1 mLのOPTI-MEM I培地を加え懸濁した。この細胞懸濁液
5 を96ウェルプレートの1ウェルあたり125 μ Lずつ分注した。37 $^{\circ}$ C、5
%CO₂の条件下一晩培養した後、10%ウシ胎仔血清(三光純薬(株)製)
100 units/mLペニシリンGナトリウム(Gibco-BRL:LIFE TECHNOLOGIES製)、
100 μ g/mL硫酸ストレプトマイ
シン(Gibco-BRL:LIFE TECHNOLOGIES製)を含む
10 DMEM培地(Gibco-BRL:LIFE TECHNOLOGIES製
)を1ウェルあたり125 μ Lずつ加えた。翌日まで培養しメチル- α -D-
グルコピラノシド取り込み阻害活性の測定に供した。

3) メチル- α -D-グルコピラノシド取り込み阻害活性の測定

15 試験化合物をジメチルスルホキシドに溶解し、取り込み用緩衝液(140 mM
塩化ナトリウム、2 mM塩化カリウム、1 mM塩化カルシウム、1 mM塩化
マグネシウム、5 mMメチル- α -D-グルコピラノシド、10 mM2-[4-
(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸、5 mM
トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを含む緩衝液pH7.4)で希釈し、
20 阻害活性測定用の検体とした。ヒトSGLT2一過性発現COS-7細胞の培
地を除去し、1ウェルあたり前処置用緩衝液(140 mM塩化コリン、2 mM
塩化カリウム、1 mM塩化カルシウム、1 mM塩化マグネシウム、10 mM2-
(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸、
5 mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを含む緩衝液pH7.4)を
25 200 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間静置した。前処置用緩衝液を除去し、再度
同一緩衝液を200 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間静置した。作製した検体52
5 μ Lに7 μ Lのメチル- α -D-(U-14C)グルコピラノシド(Ame
rsham Pharmacia Biotech)を加え混合し、測定用緩
衝液とした。対照群用に試験化合物を含まない測定用緩衝液を調製した。また

試験化合物非存在下並びにナトリウム非存在下の基礎取り込み測定用に塩化ナトリウムに替えて140 mMの塩化コリンを含む基礎取り込み測定用緩衝液を同様に調製した。前処置用緩衝液を除去し、測定用緩衝液を1ウェルあたり75 μ Lずつ加え37°Cで2時間静置した。測定用緩衝液を除去し、洗浄用緩衝液（140 mM塩化コリン、2 mM塩化カリウム、1 mM塩化カルシウム、1 mM塩化マグネシウム、10 mMメチル- α -D-グルコピラノシド、10 mM 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸、5 mMトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを含む緩衝液pH 7.4）を1ウェルあたり200 μ Lずつ加えすぐに除去した。この洗浄操作をさらに2回行い、0.2 N水酸化ナトリウムを1ウェルあたり75 μ Lずつ加え細胞を可溶化した。可溶化液をピコプレート（Packard）に移し、150 μ Lのマイクロシンチ40（Packard）を加えマイクロプレートシンチレーションカウンター トップカウント（Packard）にて放射活性を計測した。対照群の取り込み量から基礎取り込み量を差し引いた値を100%とし、取り込み量の50%阻害する濃度（IC₅₀値）を濃度-阻害曲線から最小二乗法により算出した。その結果は以下の表1に示す通りである。

〔表1〕

試験化合物	IC ₅₀ (nM)
参考例 2	350

〔産業上の利用可能性〕

20 本発明の α 型結晶および β 型結晶は、簡便な精製操作により容易に高純度とすることができるので工業的生産に適しており、優れた保存安定性を有するので一定の品質の医薬品を製造し、供給する上で有用である。さらに当該結晶は、流動性に優れ取り扱いが容易であるので製剤化に適している。それ故、本発明の α 型結晶および β 型結晶は、医薬品原体として極めて好適である。

請求の範囲

1. 2-(4-メトキシベンジル)フェニル 6-0-エトキシカルボニル-β-D-グルコピラノシドの結晶。

5

2. 粉末X線回折による回折パターンが、回折角(2θ±0.1)5.6、13.8、14.6、16.8、17.7および20.8度に特徴的なピークを有する、請求項1に記載の結晶。

10

3. 粉末X線回折による回折パターンが、回折角(2θ±0.1)4.7、5.5、7.3、8.6、14.5および16.7度に特徴的なピークを有する、請求項1に記載の結晶。

15

4. 請求項1～3のいずれか一項に記載の結晶を有効成分として含有する医薬組成物。

5. 高血糖症に起因する疾患を予防または治療するための、請求項4に記載の医薬組成物。

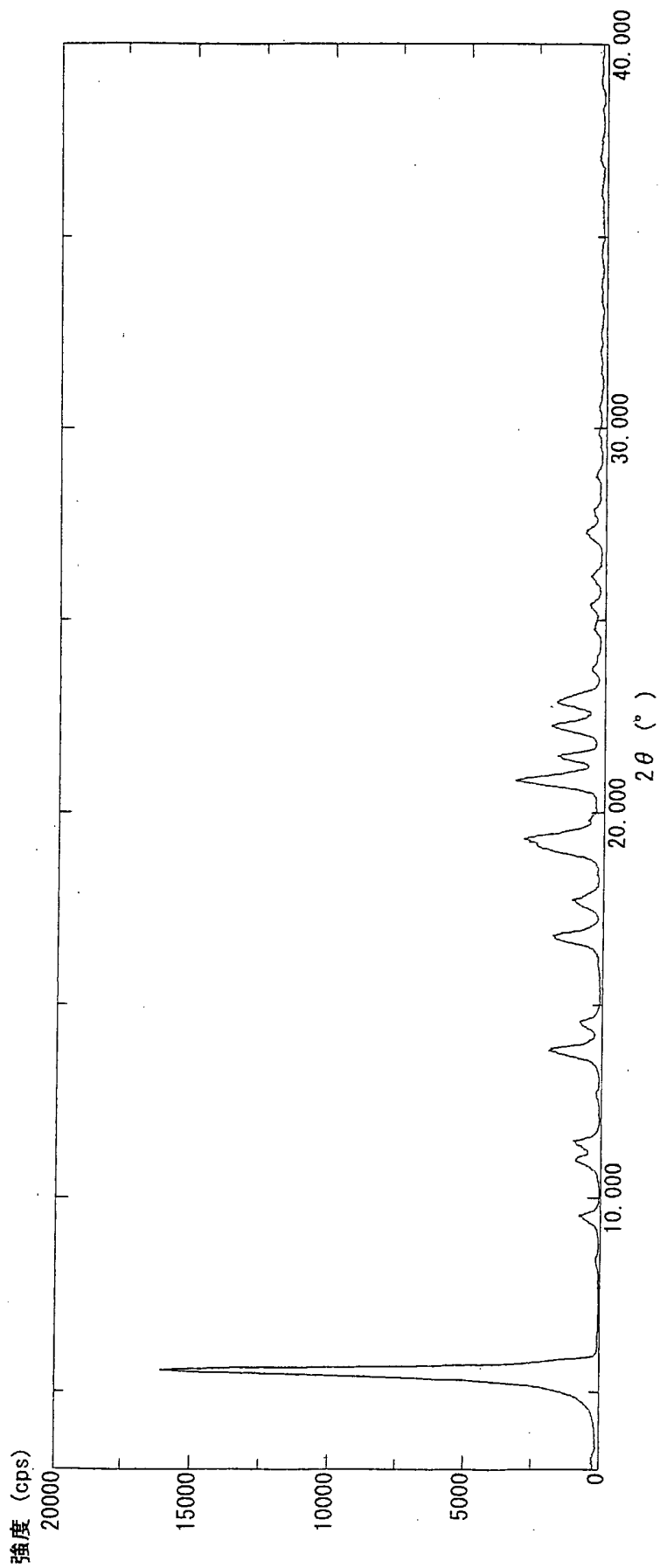
20

6. 高血糖症に起因する疾患の予防または治療剤を製造するための、請求項1～3のいずれか一項に記載の結晶の使用。

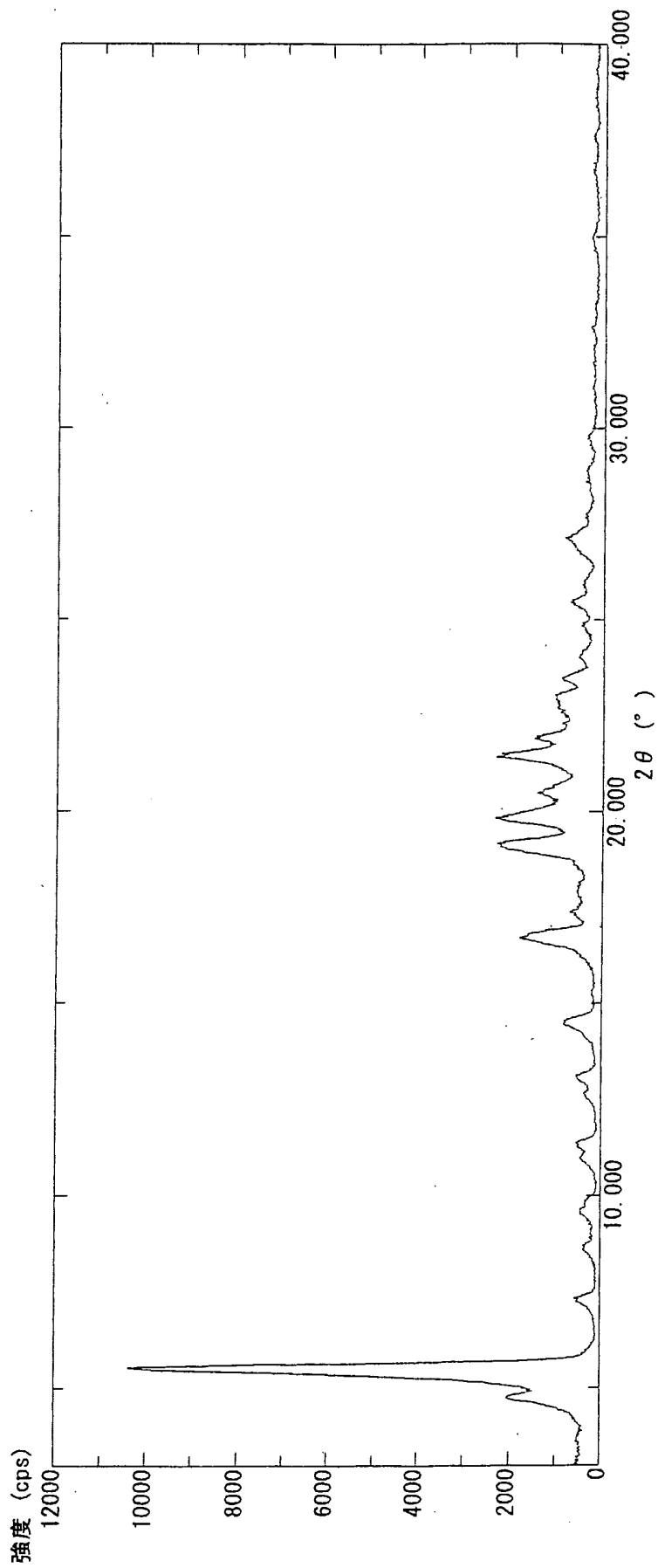
7. 請求項1～3のいずれか一項に記載の結晶の治療的有効量を投与することを特徴とする、高血糖症に起因する疾患の予防または治療方法。

25

第1図



第2図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02466

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl⁷ C07H15/203, A61K31/7034, A61P3/04, 3/10</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>													
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl⁷ C07H15/203, A61K31/7034, A61P3/04, 3/10</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN)</p>													
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P, X</td> <td>WO 02/28872 A1 (Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 April, 2002 (11.04.02), Full text; particularly, example 1; page 10, lines 11 to 13 & AU 2001090257 A</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 01/74834 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.), 11 October, 2001 (11.10.01), Full text; particularly, page 33, line 15 to page 34, lines 4, 23 to 26; example 8 & US 2002/111315 A1 & EP 1268502 A1 & NO 2002004642 A</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 01/68660 A1 (Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.), 20 September, 2001 (20.09.01), & AU 2001041146 A & BR 2001009323 A & EP 1270584 A1 & NO 2002004424 A</td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table>		Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	P, X	WO 02/28872 A1 (Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 April, 2002 (11.04.02), Full text; particularly, example 1; page 10, lines 11 to 13 & AU 2001090257 A	1-6	X	WO 01/74834 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.), 11 October, 2001 (11.10.01), Full text; particularly, page 33, line 15 to page 34, lines 4, 23 to 26; example 8 & US 2002/111315 A1 & EP 1268502 A1 & NO 2002004642 A	1-6	A	WO 01/68660 A1 (Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.), 20 September, 2001 (20.09.01), & AU 2001041146 A & BR 2001009323 A & EP 1270584 A1 & NO 2002004424 A	1-6
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.											
P, X	WO 02/28872 A1 (Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 April, 2002 (11.04.02), Full text; particularly, example 1; page 10, lines 11 to 13 & AU 2001090257 A	1-6											
X	WO 01/74834 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.), 11 October, 2001 (11.10.01), Full text; particularly, page 33, line 15 to page 34, lines 4, 23 to 26; example 8 & US 2002/111315 A1 & EP 1268502 A1 & NO 2002004642 A	1-6											
A	WO 01/68660 A1 (Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.), 20 September, 2001 (20.09.01), & AU 2001041146 A & BR 2001009323 A & EP 1270584 A1 & NO 2002004424 A	1-6											
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>													
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>		"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention												
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone												
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art												
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family												
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed													
<p>Date of the actual completion of the international search 28 April, 2003 (28.04.03)</p>	<p>Date of mailing of the international search report 20 May, 2003 (20.05.03)</p>												
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>	<p>Authorized officer</p>												
<p>Facsimile No.</p>	<p>Telephone No.</p>												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02466

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention as set forth in claim 7 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C07H15/203, A61K31/7034, A61P3/04, 3/10

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C07H15/203, A61K31/7034, A61P3/04, 3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO 02/28872 A1 (キッセイ薬品工業株式会社) 2002. 04. 11 全文、特に実施例 1, 第 10 頁第 11 ~ 13 行参照 & AU 2001090257 A	1 - 6
X	WO 01/74834 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2001. 10. 11 全文、特に第 33 頁第 15 行 ~ 第 34 頁第 4 行、第 34 頁第 23 行 ~ 第 26 行、Example 8 参照 & US 2002/111315 A1 & EP 1268502 A1 & NO 2002004642 A	1 - 6


C 欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>
--	---

国際調査を完了した日 28. 04. 03

国際調査報告の発送日 20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員) 中木 亜希  4P 9282
 電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 01/68660 A1 (キッセイ薬品工業株式会社) 2001.09.20 & AU 2001041146 A & BR 2001009323 A & EP 1270584 A1 & NO 2002004424 A	1-6

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 7 に記載された発明は、治療による人体の処置方法に関するものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。