

tianagliflozin 与 L-脯氨酸的共结晶研究

刘冰妮¹, 徐华强^{1,2}, 张铃钰^{1,2}, 王建武², 徐为人¹, 汤立达¹, 赵桂龙^{1*}

1. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

2. 山东大学 化学与化工学院, 山东 济南 250100

摘要: **目的** 研究新型钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂 tianagliflozin 与 L-脯氨酸的共结晶, 制备一种稳定的可供药用的共结晶。**方法** 在乙醇中共结晶制备 tianagliflozin 与 L-脯氨酸的共结晶, 并采用核磁共振氢谱、粉末 X 衍射、热重/差热分析及红外光谱测定共结晶物的特征。初步考察了共结晶对光、温度和湿度的稳定性。**结果** 制备了 tianagliflozin 与 L-脯氨酸稳定的 1:1 共结晶, 初步稳定性考察表明该共结晶对光照、高温和低温中湿稳定, 高湿条件下发生分解。**结论** tianagliflozin 与 L-脯氨酸的共结晶在稳定性和制备重现性方面较好, 为其成药性研究提供了参考。

关键词: tianagliflozin; L-脯氨酸; 共结晶; 成药性

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)06-0838-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.06.006

Cocrystallization of tianagliflozin and L-proline

LIU Bing-ni¹, XU Hua-qiang^{1,2}, ZHANG Ling-yu^{1,2}, WANG Jian-wu², XU Wei-ren¹, TANG Li-da¹, ZHAO Gui-long¹

1. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: Objective To investigate the cocrystallization of tianagliflozin, a new inhibitor on sodium-dependent glucose co-transporter 2, and L-proline and to prepare a stable modality of medicinal cocrystallization. **Methods** The cocrystallization of tianagliflozin and L-proline was prepared from ethanol cocrystallization, and characterized by ¹H-NMR, PXRD, TG/DTA, and IR methods. Preliminary stability tests of cocrystallization to light, temperature, and moisture were performed. **Results** The cocrystallization of tianagliflozin and L-proline in a molecular ratio of 1:1 was prepared. The stability test demonstrated that the cocrystallization was stable to light, high temperature, and low to medium moisture, but unstable to high moisture, which could decompose the cocrystallization to its individual components. **Conclusion** The cocrystallization of tianagliflozin and L-proline is stable and reproducible, which provide reference for its druggability.

Key words: tianagliflozin; L-proline; cocrystallization; druggability

钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (sodium-dependent glucose cotransporter 2, SGLT2) 是近年出现的最具有应用前景的糖尿病治疗靶点之一。SGLT2 抑制剂能够抑制位于肾近端小管表皮上的 SGLT2 的活性, 减少被滤过到原尿中的葡萄糖在肾近端小管中会被重新吸收到血液中, 从而达到降低血糖的目的^[1-2]。研究最早的 SGLT2 抑制剂 dapagliflozin^[3] 和 canagliflozin^[4] 已经分别于 2012 年 (欧盟) 和 2013 年 (美国) 上市。本课题组在前期的工作中开展了

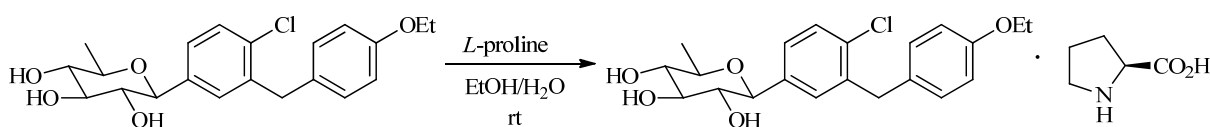
对 dapagliflozin 分子中葡萄糖片段系统的单脱氧构效关系研究, 发现 6-deoxydapagliflozin (即 tianagliflozin) 的体内外活性均显著强于母体化合物 dapagliflozin (对 hSGLT2 的 IC₅₀ 分别为 0.67、1.1 nmol/L)^[5]。为了获得 tianagliflozin 稳定可靠的成药形式, 本实验进行了 tianagliflozin 与 L-脯氨酸的共结晶研究, 最终获得了 tianagliflozin 与 L-脯氨酸 1:1 的共结晶 (图 1), 并且该共结晶具有较好的制备重现性和稳定性, 适合作为 tianagliflozin 的成药形式。

收稿日期: 2013-05-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21302141); 天津市科技计划项目(10ZCKFSH01300)

作者简介: 刘冰妮 (1978—), 女, 黑龙江人, 硕士, 副研究员。E-mail: liubn@tjipr.com

*通信作者 赵桂龙 Tel: (022)23006869 E-mail: zhao_guilong@126.com

图 1 tianagliflozin 与 *L*-脯氨酸形成的共结晶Fig. 1 Cocrystallization of tianagliflozin and *L*-proline

1 仪器和试剂

Bruker AV 400 型核磁共振仪, DMSO- d_6 为溶剂, TMS 为内标; Rigaku D/max—2500 型粉末 X 射线衍射仪; Rigaku PTC—10A TG-DTA 差热分析仪; Nicolet MAGNA—560 傅里叶变换红外光谱仪, KBr 压片法。tianagliflozin 样品为本实验室自制^[6], 质量分数 99.35%, 批号 130220; 所用有机溶剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 共结晶的制备

将 0.44 g (3.83 mmol) *L*-脯氨酸在 40 °C 水浴加热下溶于 0.25 mL 水和 2.5 mL 乙醇的混合溶剂中, 搅拌。另将 1.00 g (2.55 mmol) tianagliflozin 在 40 °C 水浴加热下溶于 10 mL 无水乙醇中, 然后加入上述搅拌的 *L*-脯氨酸溶液中, 撤走水浴, 在室温下继续搅拌, 约 1 h 后析出白色晶体, 继续搅拌 3 h。抽滤收集固体, 并用少量乙醇洗涤, 在真空中 30 °C 下干燥 5 h, 即得白色结晶性固体 0.83 g, 产率 64%。

2.2 共结晶的 $^1\text{H-NMR}$ 表征

将上述制备的共结晶测试 $^1\text{H-NMR}$ 。 $^1\text{H-NMR}$

(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.54 (bs, 2H, $\text{CO}_2\text{H} + \text{NH}$), 7.35 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, Ph-H), 7.25 (d, 1H, $J=1.6$ Hz, Ph-H), 7.17 (dd, 1H, $J=2.0, 8.4$ Hz, Ph-H), 7.08 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, Ph-H), 6.81 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, Ph-H), 4.97 (bs, 2H, 2OH), 4.83 (s, 1H, OH), 3.92~4.00 (m, 5H), 3.61 (dd, 1H, $J=5.6, 8.8$ Hz, CHCO_2H), 3.23~3.31 (m, 2H), 3.17~3.21 (m, 2H), 3.11 (t, 1H, $J=9.0$ Hz), 2.95~3.02 (m, 1H), 2.92 (t, 1H, $J=9.0$ Hz), 1.88~2.04 (m, 2H), 1.61~1.81 (m, 2H), 1.28 (t, 3H, $J=7.0$ Hz, OCH_2CH_3), 1.15 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, CHCH_3)。上述数据表明, 在共结晶中 tianagliflozin 与 *L*-脯氨酸的物质的量比例是严格的 1:1 的关系^[5-6]。

对制备共结晶过程中的 tianagliflozin 与 *L*-脯氨酸的比例进行了考察, 结果见表 1。可以看出比例在 1:2~1:0.8 变化时, 所得到的共结晶中两者的物质的量比例均为 1:1, 这也证明了共结晶不是 tianagliflozin 和 *L*-脯氨酸简单的 1:1 的混合物, 在两者的比例不是 1:1 时, 其中一种多余的原料会留在溶液中。

表 1 不同比例的 tianagliflozin 与 *L*-脯氨酸制备共结晶的结果Table 1 Cocrystallization of tianagliflozin and *L*-proline with different ratios

tianagliflozin/mmole	<i>L</i> -脯氨酸/mmole	物质的量比例	共结晶	
			收率/%	组分物质的量比例 ($^1\text{H-NMR}$ 测得)
2.55	2.04	1:0.8	51	1:1
2.55	2.30	1:0.9	54	1:1
2.55	2.55	1:1	57	1:1
2.55	3.06	1:1.2	61	1:1
2.55	3.83	1:1.5	64	1:1
2.55	5.10	1:2	64	1:1

2.3 共结晶的粉末 X 射线表征

将上述制备的共结晶测试粉末 X-射线衍射, 数据见表 2。tianagliflozin、*L*-脯氨酸以及共结晶的粉

末 X 射线衍射图谱见图 3。结果表明, 共结晶的衍射峰不是 tianagliflozin 与 *L*-脯氨酸衍射峰的简单叠加, 即共结晶的任何一个衍射峰既不出现在

tianagliflozin 的衍射峰中,也不出现在 *L*-脯氨酸的衍射峰中,这说明共结晶不是 tianagliflozin 和 *L*-脯氨酸简单的 1:1 的混合物,而是两者彼此之间具有较为有序和牢固的非键作用力。

表2 tianagliflozin 与 *L*-脯氨酸共结晶的 X 射线衍射数据

Table 2 X-ray diffraction data for cocrystallization of tianagliflozin and *L*-proline

$2\theta/(\circ)$	d/nm	I/I_0	$2\theta/(\circ)$	d/nm	I/I_0
4.74	1.863	21%	19.52	0.454	33%
7.32	1.207	59%	20.62	0.430	31%
9.74	0.907	18%	21.58	0.411	52%
12.18	0.726	10%	23.02	0.386	25%
14.28	0.620	18%	23.50	0.378	27%
16.46	0.538	100%	26.30	0.339	24%
17.60	0.504	20%	27.40	0.325	23%
18.70	0.474	34%	27.90	0.320	31%

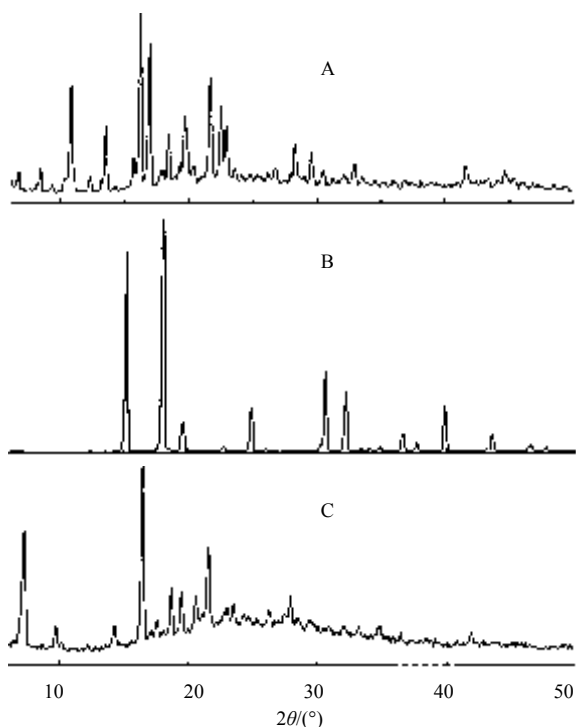


图3 tianagliflozin (A)、*L*-脯氨酸 (B) 和共结晶 (C) 的粉末 X 射线衍射图谱

Fig. 3 X-ray diffraction spectra of tianagliflozin (A), *L*-proline (B), and cocrystallization (C)

2.4 共结晶的热重/差热分析表征

将上述制备的共结晶测试热重/差热分析 (TG/DTA)。升温速率 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 扫描温度范围为

$0\sim 300\text{ }^{\circ}\text{C}$, 参比物 Al_2O_3 。结果见图 4。结果表明共结晶在 $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ 有尖锐熔融吸热峰, 其熔点 ($170\text{ }^{\circ}\text{C}$) 与 tianagliflozin ($147\text{ }^{\circ}\text{C}$) 及 *L*-脯氨酸 ($232\text{ }^{\circ}\text{C}$) 的熔点均不一样, 且共结晶熔点温度显著高于 tianagliflozin 的熔点温度, 更加说明了共结晶不是 tianagliflozin 和 *L*-脯氨酸简单的 1:1 混合物, 而是两者彼此之间具有较为有序和牢固的非键作用力。

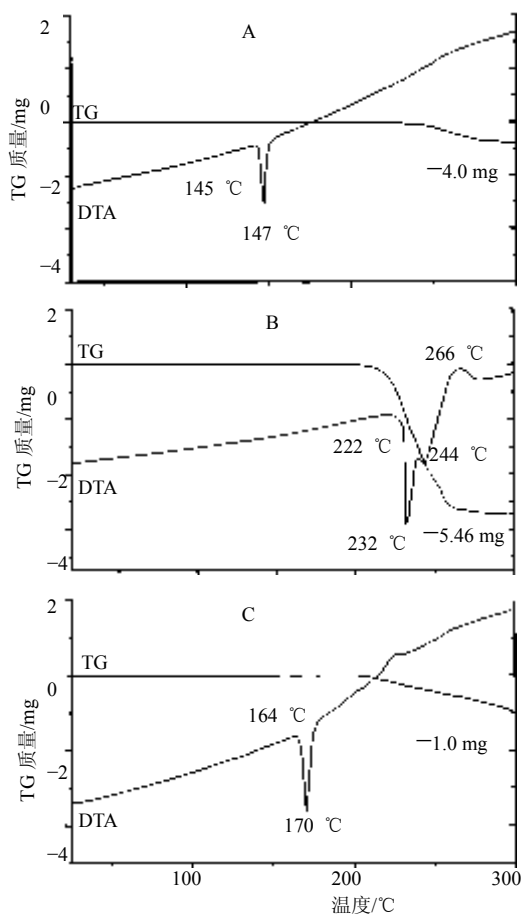


图4 tianagliflozin (A)、*L*-脯氨酸 (B) 和共结晶 (C) 的热重/差热图谱

Fig. 4 TG/DTA spectra of tianagliflozin (A), *L*-proline (B), and cocrystallization (C)

2.5 共结晶的红外光谱表征

将上述制备的共结晶测试红外光谱。IR (KBr) cm^{-1} : 3 378 (bs, $\text{NH}+\text{OH}$), 3 031 (w), 2 472~2 747 (bs, CO_2H), 1 626 (s, $\text{C}=\text{O}$), 1 510 (s), 1 478 (s), 1 439 (s), 1 404 (s), 1 370 (s, Me), 1 300 (s), 1 240 (s), 1 177 (s), 1 116 (s), 1 088 (s), 1 064 (s), 1 045 (s), 1 007 (s)。分析共结晶的 IR 吸收谱带可以发现它们并不能完全包含 tianagliflozin 的 IR 吸收谱带^[6], 也证明了共结晶不

是 tianagliflozin 和 *L*-脯氨酸简单的 1 : 1 的混合物, 而是两者彼此之间具有较有序和牢固的非键作用力。

2.6 共结晶的稳定性研究

以粉末 X 射线衍射作为测试手段, 考察共结晶的初步稳定性。为期 10 d 的对光、热和湿的初步稳定性试验结果见表 3。结果表明共结晶对光是稳定的, 晶型在试验前后并无变化; 共结晶对热(45 ℃)也是稳定的, 在 10 d 连续加热的条件下其晶型在试验前后并无变化; 共结晶对通常储存条件下的低湿和中湿(15 ℃, 10%~30%相对湿度)是稳定的, 但是对高湿(30 ℃, 100%相对湿度)是不稳定的, 粉末 X 射线衍射结果表明上述高湿试验结束后共结晶的特征晶型丧失, 基本转变为原料 tianagliflozin 的晶型, 说明高湿试验后共结晶分解为其两种单一组分的简单混合物。

表 3 共结晶的晶型对光、热和湿度的稳定性实验
Table 3 Stability of crystalline form of cocrystallization to light, temperature, and moisture

光照/hx	温度/℃	相对湿度/%	t/d	结果
4 500	20	25	10	稳定
0	45	10	10	稳定
1 000	15	10~30	10	稳定
1 000	30	100	10	不稳定

需要指出的是, 共结晶对高湿不稳定可能与 *L*-脯氨酸具有很大的水溶性有关, 即共结晶在高湿条件下与水蒸气接触后, 导致 *L*-脯氨酸产生类似在溶液中溶解的行为, 这种溶解行为破坏了共结晶中原本牢固有序的分子间排列组合, 从而导致 tianagliflozin 从共结晶体系中“崩解”出来, 最终导致共结晶分解为其各自的两组分。

3 讨论

本实验制备得到了 tianagliflozin 与 *L*-脯氨酸共

结晶, 经过 ¹H-NMR、粉末 X 衍射、红外光谱及差热分析表征, 结果表明此共结晶不是各自粉末状晶型物质的简单混合物, 而是产生了有序和牢固的非键作用力形成的共结晶。对于共结晶的稳定性实验研究表明共结晶对于高湿条件不稳定, 对光热和低中湿环境稳定。tianagliflozin 与 *L*-脯氨酸共结晶具有稳定性和制备重现性的优点, 可作为 tianagliflozin 的原料药形式进行开发研究。

参考文献

- [1] Washburn W N. Development of the renal glucose reabsorption inhibitors: a new mechanism for the pharmacotherapy of diabetes mellitus type 2 [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(7): 1785-1794.
- [2] Hardman T C, Dubrey S W. Development and potential role of type-2 sodium-glucose transporter inhibitors for management of type 2 diabetes [J]. *Diabetes Ther*, 2011, 2(3): 133-145.
- [3] Meng M, Ellsworth B A, Nirschl A A, *et al*. Discovery of dapagliflozin: a potent, selective renal sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(5): 1145-1149.
- [4] Nomura S, Sakamaki S, Hongu M, *et al*. Discovery of canagliflozin, a novel C-glucoside with thiophene ring, as sodium-dependent glucose cotransporter 2 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(17), 6355-6360.
- [5] Zhang L, Wang Y, Xu H, *et al*. Discovery of 6-deoxydapagliflozin as a highly potent sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Med Chem*, 2013[Epub ahead of print].
- [6] Shi Y H, Xu H Q, Liu B N, *et al*. A facile synthesis of 6-deoxydapagliflozin [J]. *Monatsh Chem*, 2013, 144(12): 1903-1910.