

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2502551号

(45)発行日 平成8年(1996)5月29日

(24)登録日 平成8年(1996)3月13日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 3/08			C 0 7 H 3/08	
// A 6 1 K 31/70	ADP		A 6 1 K 31/70	ADP

発明の数2(全6頁)

(21)出願番号	特願昭61-292667	(73)特許権者	999999999 バイエル・アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国デー51368レーフェル ターゼン(番地なし)
(22)出願日	昭和61年(1986)12月10日	(72)発明者	エーリツヒ・ラウエンブツシュ ドイツ連邦共和国デー5600ブツペルター ル1・テルステーゲンベーク 9
(65)公開番号	特開昭62-155288	(74)代理人	弁理士 小田島 平吉
(43)公開日	昭和62年(1987)7月10日	審査官	内藤 伸一
(31)優先権主張番号	P 3 5 4 3 9 9 9 . 8		
(32)優先日	1985年12月13日		
(33)優先権主張国	ドイツ (DE)		

(54)【発明の名称】 高純度アカルボース

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】水とは別に約93重量%以上のアカルボース含有量を有する精製アカルボース組成物。

【請求項2】水とは別に約95~98重量%のアカルボース含有量を有する特許請求の範囲第1項記載の精製アカルボース組成物。

【請求項3】水とは別に約98重量%のアカルボース含有量を有する特許請求の範囲第1項記載の精製アカルボース組成物。

【請求項4】カルボキシル基を有し且つデキストラン、アガロース及びセルロースに基づく弱酸性カチオン交換体、或いはポリアミドを添加したデキストラン、アガロース及びセルロースに由来する交換体を充填剤として含有するカラムに、予備精製したアカルボースをpH3.5~7の1~20重量%水溶液で適用し、カラムをもっぱら脱

2

気した蒸留水で溶出させ、精製アカルボース組成物を溶出液から常法で単離することを特徴とする水とは別に約93重量%以上のアカルボース含有量を有する精製アカルボース組成物の製造法。

【請求項5】適用する予備精製したアカルボース溶液の容量がカラムの充填容量に相当することを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の方法。

【請求項6】予備精製したアカルボース溶液の容量がカラムの充填容量の60%以下であることを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の方法。

【請求項7】予備精製したアカルボース溶液のpHが3.5~6.0であることを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の方法。

【請求項8】予備精製したアカルボース溶液のpHが4.0~5.5であることを特徴とする特許請求の範囲第4項記

10

載の方法。

【請求項 9】予備精製したアカルボース溶液を室温までの温度で適用し、そして塩と着色成分が溶出した後カラムを 25 ~ 95 に加熱することを特徴とする特許請求の範囲第 4 項記載の方法。

【請求項 1 0】予備精製したアカルボース溶液を 4 ~ 25 の範囲内の温度で適用し、そして塩と着色成分が溶出した後カラムを 40 ~ 70 に加熱することを特徴とする特許請求の範囲第 9 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、高純度のアカルボース (acarbose)、その製造法及びその薬剤の製造に対する使用方法に関する。

アカルボースは人間の小腸のサッカラーゼ酵素複合体の阻害剤であり、糖尿病の処置のための薬剤に使用される。

アカルボースは O - 4,6 - ジデソキシ - 4 - [(1S,4 R,5S,6S) - 4,5,6 - トリヒドロキシ - 3 - (ヒドロキシメチル) - 2 - シクロヘキセン - 1 - イル - アミノ] - D - グルコピラノシル - (1 4) - O - D - グルコピラノシル (1 4) - グルコピラノースである。

阻害剤はアクチノプラネス (Actionoplanes) 種の発酵によって得られ (参照、独国特許第 2,209,832 号、第 2,209,834 号、第 2,064,092 号)、発酵汁から単離しなければならない。この目的のために精製法が記述されている (参照、独国特許第 2,347,782 号及び第 2,719,912 号)。

これらの精製法において、アカルボースは、強酸カチオン交換体に結合し、塩溶液又は主に希酸で溶出せしめられる。アニオン交換体での中和後に得られるアカルボースは乾燥物質において 78 ~ 88% のアカルボース含量を有する (HPLC 法)。これらの調製物は依然糖に対する着色反応を呈する二次成分約 10 ~ 15%、灰分 1 ~ 4% 及びいくつかの着色成分の形で不純物を含有する。人間の薬剤に用いるには更に高程度の純度が必要であるが、上述の技術の知識によればこれは単に強酸カチオン交換体を弱酸カチオン交換体で代替することによって達成することができない。その理由は後者の交換体が非常に弱塩基のアカルボースを適当に結合せず、それが溶出液中に未精製で現われるからである。

今回驚くことに、上述の技術に従って予備精製したアカルボースは、非常に特に弱い酸性の親水性カチオン交換体により、狭く制限された pH 範囲内において、残存する塩、着色物質及び糖含有の塩基性二次成分から最終的に 1 段階で精製できることが発見された。これの後のアカルボースの含量は少なくとも 90 重量%に、好ましくは 95 ~ 98 重量%またはそれ以上に増加し、サルフェート化灰分は 0 ~ 0.5% に減少し、そして糖様二次成分 (sugar-like secondary component) は 10 重量%以下、好ましくは 2 ~ 5 重量%又はそれ以下に減少する。

斯くして本発明は糖様二次成分を 10 重量%以下で含有するアカルボースに関する。

糖様二次成分を 2 ~ 5 重量%含有するアカルボースは好適であり、そして本発明は特に好ましくは糖様二次成分を 2 重量%以下で含有するアカルボースに関する。

特別な種類のクロマトグラフィーを用いる本発明によるアカルボースの製造に対しては、たとえば独国特許第 2,719,912 号に記述されている方法によって得られる予備精製したアカルボースの溶液を利用する。この溶液を、1 ~ 20% の濃度で 3.5 ~ 6.5、好ましくは 4.0 ~ 5.5 の pH 下にカラムに適用する。充填剤として適当なものは、カルボキシル基を有し且つデキストラン、アガロース及びセルロースに基づく弱酸カチオン交換体、或いはポリアクリルアミドを添加したこれらの成分に由来する交換体、例えば中でも市販されている種類の CM - セファデックス (Sephadex®)、CM - セファローズ (Sepharose®)、CM - セルロース (Cellulose®)、CM - セルファイン (Cellufine®) である。注目すべきことは、カルボキシル基を含み且つポリスチレン、ポリアクリル酸又はポリメタクリル酸に基づく市販の弱酸交換体は本精製に使用することができない。

従って、本発明は更にカルボキシル基を有し且つデキストラン、アガロース及びセルロースに基づく弱酸性カチオン交換体或いはポリアミドを添加した後者に由来する交換体を充填剤として含有するカラムに、予備精製したアカルボースを pH 4 ~ 7 の 1 ~ 20 重量%水溶液で適用し、カラムをもっぱら脱気した蒸留水で溶出させ、そして適当ならばアカルボースを溶出液から常法で単離することを特徴とする、水とは別に 10 重量%より少ない糖様二次成分を含有するアカルボースの製造法に関する。

カラムに適用される予備精製したアカルボースの水溶液の容量は限定される。適用しうる最大容量はカラムの充填容量に相当し、好ましくはカラム容量の 60% 以下が適用される。この理由のために、アカルボースの製造量を精製するために用いられる濃度は低すぎない。濃度は精製に最も適したイオン交換体が収縮する傾向があるという事実により上方濃度が制限される。7 ~ 20% の濃度が好適である。

適用後、カラムをもっぱら脱気した蒸留水で溶出させる。この間最初に塩、中性糖及び着色汚染物が溶出し、続いて更にゆっくりとアカルボースが比較的広いピークで溶出する。糖様塩基二次生成物はカラムに残り、それを再生するまで除去されない。従ってアカルボースは pH 6 ~ 7 において純粋に水溶液の形で存在し、通常の方法で濃縮し且つ高純粋形で乾燥することができる。

アカルボースのカラムでの挙動は、驚くことに実際の方法に決定的な因子がカラム充填物の平衡 pH 及びクロマトグラフィー中の温度であるというようないくつかの因子に依存する。

50 カラム充填物の pH の変更はアカルボースの容量を変

え、アカルボースの溶出挙動を変える。中性のpH値において、アカルボースの塩と比べてのゆっくりさは不十分であり、分離は不適當である。約3.5~4の酸pH値において、アカルボースは非常にゆっくり下降し、水では不完全にしか溶出しない。実際に本方法を行なうには各特別な交換体に対してpHの最適化が必要である。一般に4.3~5.0のpH値が適當である。好適であるpH値は高負荷の場合約4.6及び低負荷及び最高収率の場合約4.9である。

第2の重要な因子は温度である。温度が低ければ低いほどアカルボースは強くイオン交換体に保留され、カラムの容量が大きければ大きいほどアカルボースの溶出は遅くなる。これは非対称ピークが得られ、またアカルボース画分の容量が非常に大きいことを意味する。斯くして基質を室温で又はそれ以下で適用し、そして塩と着色成分の溶出後にカラムを約25~90、好ましくは40~70に加熱することが得策である。この結果アカルボースを良好な収率で迅速に溶出せしめうる。

イオン交換体の再生には緩衝剤、例えば平衡化に必要なpH範囲及び0.1~0.5Mの濃度において酢酸ナトリウム緩衝剤が使用される。次いでカラムを、電導度が約0.1mS/cm(室温)に低下するまで純粋な脱気水で洗浄する。

分離の記述において、時間単位の時間を横軸にして、溶出液の屈曲率及び電導性(破線)をプロットする。更に温度の表示も示す。

最終生成物におけるアカルボースの含量を、特に液体クロマトグラフィー(HPLC法)で定量し、その無水物質として計算した。この方法は次のように行なった: 温度調節器付きのカラム炉を有する高速液体クロマトグラフ、ステンレス鋼製金属カラム長:25cm

内径:4mm

充填物:アミノフェーズ5µm[例えばライクロソープ(LiChrosorb)NH₂、E.メルク(Merck)社、或いはハイパーシル(Hypersil)APS、シヤンドン(Shandon)社]

- 試薬
1. アセトニトリル[例えばライクロソルブ(LiChrosolv)、E.メルク社]
 2. 磷酸二水素カリウム、分析級
 3. 磷酸水素二ナトリウム・2水和物、分析級

試験溶液 基質約200mgを正確に秤量してメスフラスコ(graduated flask)中に溶解し、水で10.0mlにした。20mg/ml

対照溶液 標準物質の1つのアンプルの内容物を、基準のために指示される容量の水に溶解する。

溶離液 アセトニトリル/磷酸塩緩衝液(71+29、容量)磷酸塩緩衝液:磷酸二水素カリウム600mg及び磷酸水素二ナトリウム350mgを溶解し、水で1000mlにする。この溶液を0.8µm型AAWPミリポア(Millipore)フィルターで濾過する。

流速 2.2ml/分

カラム濾の温度 35°C

検出 UV, 210nm

注入量 10µl, 10µl中0.2mg

記録計の 約0.25AUFS(全スケール吸光度単位)
全スケールの偏り

アカルボース含量の計算

$$G = \frac{P_p \times C \times 100,000}{P_v \times W_p \times (100 - b)}$$

G = 無水基質に基づいて計算したアカルボースの含量(%)

- 10 Pp = 試験溶液からのアカルボースのピーク面積
- Pv = 対照溶液(基準)からのアカルボースのピーク面積
- Wp = 試料の重量(mg)
- C = 対照溶液のアカルボースの濃度(mg/ml)
- b = 試料の含水量(%)

アカルボースの阻害作用をサッカラーゼ阻害分析で決定し、サッカラーゼ阻害単位(SIU)で報告する。この分析法は、L.ミューラー(Müller)、B.ユング(Junge)ら、「酵素阻害剤(Enzyme Inhibitors)、U.ブロードベック(Brodbeck)編、フエアラグ・ヘミー(Verlag Chemie)社、1980年、109頁に記述されている。

本発明は、無毒性の不活性な製薬学的に適當である賦形剤の他に、本発明による活性化合物を含有する、或いは本発明による活性化合物からなる製薬学的調製剤、及びそれらの調製剤の製造法を包含する。

また本発明は投薬単位形の製薬学調製物を含む。これは調製物が独立した部分の形態である、例えば活性化合物の含量が個々の投薬量の分数又は倍数に相当する錠剤、糖衣錠、カプセル剤、丸薬、坐薬及びアンプルの形態であることを意味する。この投薬単位は個々の投薬量を1、2、3又は4倍或いは1/2、1/3又は1/4倍で含有することができる。個々の投薬量は好ましくは1回の投与で与えられる、また普通1日の投薬量の全部、半分、3分の1又は4分の1に相当する活性化合物量を含有する。

無毒性で不活性な製薬学的に適當である賦形剤とは、固体、半固体又は液体の希釈剤、充填剤及びすべての種類の処方物助剤として理解しうる。

錠剤、糖衣錠、カプセル、丸薬、顆粒剤、坐薬、溶液、懸濁液及び乳化液、ペースト、軟こう、ゲル、クリーム、ローション、粉剤及びスプレーは好適な製薬学的調製物として言及しうる。

錠剤、糖衣錠、カプセル、丸薬及び顆粒剤は、活性化合物(単数又は複数)を通常の賦形剤例えば(a)充填剤及び増量剤、例えば澱粉、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール及びシリカ、(b)結合剤例えばカルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン及びポリビニルピロリドン、(c)付湿剤、例えばグリセリン、(d)崩解剤、例えば寒天、炭酸カルシウム及び炭酸水素ナトリウム、(e)溶解遅延剤、例えばパラフィン、(f)吸収促進剤、例えば第四級アンモニ

ウム化合物、(g) 湿潤剤、例えばセチルアルコールまたはグリセリンモノステアレート、(h) 吸着剤、例えばカオリン及びベントナイト並びに(i) 潤滑剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウムもしくはステアリン酸マグネシウム及び固体のポリエチレングリコール、或いは(a)~(i)に示した物質の混合物。

錠剤、被覆された錠剤、糖衣錠、カプセル、丸剤及び粒剤には不透明化剤を含む普通のコーティング及び殻を与えることができ、また活性化化合物のみを、或いは有利には腸管の或る部分に随時徐放性として放出するような組成物であることができ、使用し得る埋め込み組成物は重合体状物質及びロウである。

また活性化化合物またはその複数を随時上記の1種またはそれ以上の賦形剤と共にマイクロカプセル状につくることができる。

坐薬には活性化化合物に加えて、普通の水溶性または非水溶性賦形剤、例えばポリエチレングリコール、脂肪、例えばココア脂肪及び高級エステル(例えばC₁₆-脂肪酸によるC₁₄-アルコール)或いはこれらの物質の混合物を含ませることができる。

軟こう、ペースト、クリーム及びゲルは活性物の他に通常の賦形剤及びユーカリ油、及び甘味剤例えばサッカリンを含有することができる。

治療的に活性な化合物は好ましくは全混合物の約0.1~99.5重量%、好ましくは約0.5~95重量%の濃度で上記の製薬学的調製物中に存在すべきである。

上記の製薬学的調製物は普通の公知の方法に従って、例えば活性化化合物またはその複数を賦形剤またはその複数を混合することによって製造される。

本発明は、本発明による活性化化合物の及び本発明による活性化化合物を含む製薬学的調製物の、病気の予防、治療及び/又は養生に対する人間及び獣類の薬剤における使用法を含む。

活性化化合物または製薬学的調製物は局所的、経口的、非経口的、腹腔内及び/または肛門部に、好ましくは非経口的、特に静脈内に投与することができる。

一般に医薬及び獣医薬の双方において、所望の成果を得るために、活性化化合物またはその複数を随時数回に分けて約1~40、好ましくは2~8mg/kg体重/24時間の合計量で投与することが有利であることがわかった。個々の投与物は好ましくは約0.1~約4、特に0.2~2mg/kg体重の量で活性化化合物またはその複数を含有する。しかしながら、上記の投薬量からはずれの必要があり、特にそのことは処置を受ける患者の性質及び体重、病気の性質及び重さ、調製物及び薬剤の投与の特質並びに投与を行う時点または間隔に依存するであろう。かくして或る場合には活性化化合物の上記の最少投薬量より少ない量を用いて十分であり、一方他の場合には活性化化合物の上記の量を越えなければならないこともある。特定の必要な最適投薬量及び活性化化合物の投与タイプは当該分野に精通

せる者にとってはその専門知識に基づき容易に決定することができる。

実施例 1

直径2.6cm及び長さ40cmのクロマトグラフィー用カラム [ファーマシア (Pharmacia) K 26/40] にCM - セファデックスC25を充填した。このCM - セファデックスC25は0.2M酢酸ナトリウム緩衝液pH4.7で予じめ平衡化させたものであった。カラムを充填した後、電導度が0.1mS/cmに低下するまでこれを脱気した蒸留水で洗浄した。この時カラムの充填の高さは34cmであった。用いた試験物質は水の他に塩及び他の不純物も含有する予備精製したアカルボース9.2gであった。このアカルボースを蒸留水約40mlに溶解し、pHを少量の塩酸の添加によって4.7に調節し、溶液を50mlまでにした。阻害剤含量は446,550SIUで、純粋な無水アカルボース5.75gに相当した。この基質を100ml/時(18.8cm/時)の流速でカラムに適用し、26 下に蒸留水で洗い且つ溶出させた。分離の過程を第1a図に示す。主画分を一緒にし、399,300SIUを含む画分を5.87gの収量で得た。これは用いた阻害剤の89%であった。比活性は72SIU/乾燥物質mgであった。このHPLC法は乾燥物質において93%の含量を示した。

カラムを0.2M酢酸ナトリウム緩衝液pH4.7の800mlで再生し、次いで後者を脱気した蒸留水600mlで洗い出した。

実施例 2 ~ 5

第1表のすべての実施例は、カラムのジャケットの温度を溶出中変える以外実施例1に従って行なった。溶出は、適用の開始から3時間後にカラムの加熱の温度調節器のスイッチを入れ、設定温度に依存して3~12分間で目的の数値に達しせしめるようなものであった。主画分の容量における減少を第1表に示し、また70 の溶出温度での実施例5を第1b図に示す。

第1表

アカルボースのCM - セファデックスC25でのクロマトグラフィー溶出容量の温度に対する依存性

実施例	溶出温度 °C	主画分の容量 ml	収量 g	HPLCによる含量	
				%	%
1	26	1,163	5.87	89	95
2	40	840	6.25	100	92
3	50	570	6.04	91	91
4	60	460	5.92	86	92
5	70	380	6.62	99	94

実施例 6

クロマトグラフィーのカラム (ファーマシアK 26/70) に、実施例1における如く、pH4.3で平衡化させ且つ洗浄したCM - セファデックスC25を充填した。用いた試験基質は実施例1における如き予備精製したアカルボースであり、579,000SIUを水200mlに適用した。流速は117

10

20

30

40

50

ml/時 (22cm/時) であった。溶出を水で行ない; 実施例 1 におけるように最初に塩分有画分、続いてアカルボースを溶出させた。塩含有画分の終りとアカルボースの上昇の始めとの間のギャップは162mlであった。アカルボースの溶出速度を、カラムを45 まで加熱することによって増大させた。アカルボース画分の容量は1048mlであり、収量は577,000SIUであった。これは適用した量の100%であった。

実施例 7

実施例 6 におけるように、クロマトグラフィーのカラムに、pH4.9で平衡化させ且つ洗浄したCM - セファデックスC25を充填した。579,000SIUを含有する試験溶液220 mlを適用し、基質を水で溶出させた。塩含有画分とアカルボース画分の始めとの間のギャップはこの場合23mlにすぎなかった。主画分の容量は707mlであり、温度を45 まで上昇させた。収量は577,000SIUであり、適用した量の100%であった。

実施例 8

クロマトグラフィーのカラム (フーマシアK 26/40) にCM - セファデックスC16Bを充填し、0.2M酢酸ナトリウム溶液でpH4.5に平衡化させ、水洗した。次いで247,300SIUの阻害作用を有する予備精製したアカルボースの溶液40.5mlを適用した。流速は100ml/時 (18.8cm/時) であった。溶出を脱気した蒸留水で行ない、カラムをアカルボース溶出を脱気した蒸留水で行ない、カラムをアカルボース溶出の始った時に45 に上昇させた。塩の画分とアカルボースの画分間のギャップは38mlであり、主画分の容量は600mlであった。アカルボースの収量は247,000であり、用いた量の100%であった。HPLC法*

* による含量は乾燥物質において98%であった。

実施例 9

実施例 8 における如きクロマトグラフィーのカラムにカルボキシメチルセルロースCM52[®] [ホワットマン (Whatman) 製] を充填し、0.2M酢酸ナトリウム溶液でpH4.5に平衡化させ、水洗した。充填の高さは36cmであった。394,000SIUの阻害作用を有する予備精製したアカルボースの溶液62mlを適用し、実施例 8 における如く溶出させた。アカルボース画分は塩画分の直後に続いた。アカルボース画分の容量は850mlであり、収量は用いた量の82%の322,000SIUであった。HPLC法による含量は乾燥物質において90%であった。

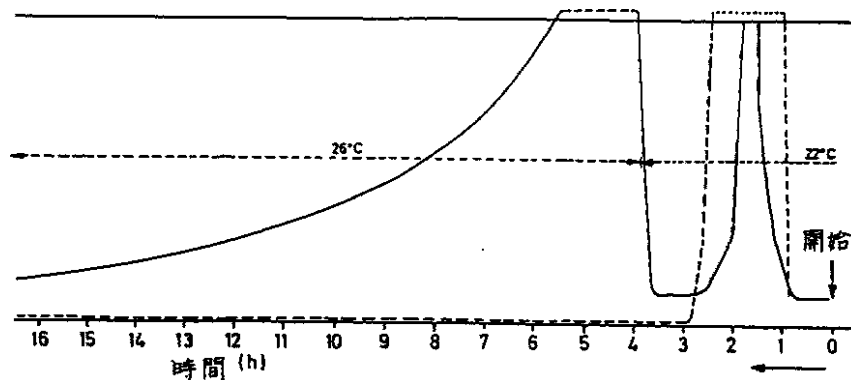
実施例 10

実施例 8 における如きクロマトグラフィーのカラムにマトレックス - セルフアイン (Matrex-Cellufine) CM[®] [アミコン (Amicon) 社] を充填し、0.2M酢酸ナトリウム溶液でpH4.5に平衡化させ、水洗した。充填の高さは37cmであった。394,000SIUの阻害作用を有する予備精製したアカルボースの溶液62mlを適用し、実施例 8 における如く溶出させた。アカルボース画分は23mlのギャップを置いて塩画分に続いた。アカルボース画分の容量は960mlであり、収量は適用した量の89%の350,000SIUであった。HPLC法による含量は乾燥物質において98%であった。

【図面の簡単な説明】

図面はアカルボースの溶出のカラムクロマトグラムであり、第1a図は溶出温度が26 の時及び第1b図は70 の時を示す。

【第 1 a 図】



【第 1 b 図】

