

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4378173号  
(P4378173)

(45) 発行日 平成21年12月2日(2009.12.2)

(24) 登録日 平成21年9月18日(2009.9.18)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 7/06	(2006.01)	C07K 7/06	Z N A
C07K 7/23	(2006.01)	C07K 7/23	
C07K 1/30	(2006.01)	C07K 1/30	

請求項の数 9 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2003-556430 (P2003-556430)  
 (86) (22) 出願日 平成14年12月23日 (2002.12.23)  
 (65) 公表番号 特表2005-515217 (P2005-515217A)  
 (43) 公表日 平成17年5月26日 (2005.5.26)  
 (86) 國際出願番号 PCT/IB2002/005581  
 (87) 國際公開番号 WO2003/055900  
 (87) 國際公開日 平成15年7月10日 (2003.7.10)  
 審査請求日 平成17年4月1日 (2005.4.1)  
 (31) 優先権主張番号 0104462-7  
 (32) 優先日 平成13年12月29日 (2001.12.29)  
 (33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)

(73) 特許権者 504251241  
 ポリペプチド ラボラトリーズ アーエス  
 デンマーク国 デーケー3400 ヒレラ  
 ズ ヘレドスフェイエン 2  
 (74) 代理人 100065651  
 弁理士 小沢 慶之輔  
 (74) 代理人 100066588  
 弁理士 小塚 勉  
 (72) 発明者 ラスムツセン, ヨン ハー  
 デンマーク国 デーケー2800 リング  
 ビー ブッディングフェイ 69  
 (72) 発明者 ラスムツセン, パレ ハー  
 デンマーク国 デーケー2880 バグス  
 フエルト アルダーシュファイレフエイ 1  
 21ビー 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ペプチド精製

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

残存有機溶媒からの、他の点では純粹なノナペプチドまたはデカペプチドの精製方法であって、以下の諸工程、即ち、

水、およびメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノールから選ばれる少なくとも1種のアルコールを含む溶出溶媒混液に、該ノナペプチドまたは該デカペプチドを溶解させ、

該ノナペプチドまたは該デカペプチドを該溶媒混液に溶かした溶液を、酢酸メチル、酢酸エチル、プロピオン酸メチル、プロピオン酸エチル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル、酢酸t-ブチル、ギ酸エチル、ギ酸プロピル、ギ酸イソプロピルから選ばれる1種または数種の極性化合物およびヘキサン、ヘプタン、オクタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサンから選ばれる1種または数種の非極性化合物からなる、激しく攪拌した沈殿溶媒混液に加え、

該沈殿したノナペプチドまたはデカペプチドを単離し、

該単離したノナペプチドまたはデカペプチドを、該極性化合物の1種または混液あるいは同様な極性の溶媒または溶媒混液を用いて洗浄し、

該洗浄したノナペプチドまたはデカペプチドを乾燥させること、  
 を含み、該水および少なくとも1種のアルコールを含む溶出溶媒混液の水分が8% (v/v) 未満であり、該溶出溶媒混液と該沈殿溶媒混液との容量比が1:10またはそれ以上であることを条件とする方法。

10

20

**【請求項 2】**

請求項 1 の方法であって、該水および少なくとも 1 種のアルコールを含む溶媒混液の水分が 5 % ( v / v ) 未満である方法。

**【請求項 3】**

請求項 1 の方法であって、該ノナペプチドまたは該デカペプチドが LHRH 拮抗剤である方法。

**【請求項 4】**

請求項 3 の方法であって、該ノナペプチドまたは該デカペプチドが、 Ac - D - 2 Nal - D - 4 ClPhe - D - 3 Pal - Ser - MetYr - D - Asn - Leu - Lys ( iPr ) - Pro - D - Ala - NH<sub>2</sub> ( I ) である方法。 10

**【請求項 5】**

請求項 4 の方法であって、 Ac - D - 2 Nal - D - 4 ClPhe - D - 3 Pal - Ser - MetYr - D - Asn - Leu - Lys ( iPr ) - Pro - D - Ala - NH<sub>2</sub> ( I ) がモノ酢酸塩の形で得られる方法。

**【請求項 6】**

請求項 1 の方法であって、該溶出溶媒混液と該沈殿溶媒混液との容量比が少なくとも 15 である方法。

**【請求項 7】**

請求項 1 の方法であって、該溶出溶媒混液の該アルコールがエタノールである方法。

**【請求項 8】**

請求項 1 の方法であって、該沈殿溶媒混液の該極性成分が酢酸エチルである方法。 20

**【請求項 9】**

請求項 1 の方法であって、該沈殿溶媒混液の該非極性成分がヘプタンである方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、ペプチド、特に中間体サイズのペプチド、より詳細には LHRH 拮抗剤などのノナペプチドおよびデカペプチドの精製に関する。

**【背景技術】****【0002】**

中間体サイズの天然および合成ペプチドの多くは無定形物質である。これらの多くは、 LHRH ( 黄体化ホルモン放出ホルモン ) 拮抗剤である多数のノナペプチドおよびデカペプチドなど、薬理学的に興味深い性質を有している。無定形でのみ知られているこの種の特定の一物質は、式 ( I )

Ac - D - 2 Nal - D - 4 ClPhe - D - 3 Pal - Ser - MetYr - D - Asn - Leu - Lys ( iPr ) - Pro - D - Ala - NH<sub>2</sub> ( I )

の合成デカペプチドであり、有効な LHRH 拮抗剤であって、望ましい薬理学的性質を有している。

**【0003】**

医薬製剤に使用するには、 LHRH 拮抗剤 ( I ) および同様な構造のノナペプチドおよびデカペプチドは、実用上の純品であることが必要である。多段階合成の最後の工程で得られる粗製物は、クロマトグラフィーその他による方法で精製される。クロマトグラフィーからの残存溶媒を除去するため、通常、こうして精製された生成物は、水性媒質に溶かして凍結乾燥する必要がある。これは、取り扱いが容易でない嵩高い生成物をもたらす、費用のかかる工程である。 40

**【0004】**

従って、残存有機溶媒から、他の点では純粋なペプチドを精製するには、凍結乾燥以外の手段による方法を用いることが望ましい。

**【0005】**

WO 0018423 A 号明細書は経口投与のための医薬組成物の製造のために、シクロ

デキストリン及びLHRHペプチド同族体、その薬学的に許容できる塩を含む組み合わせを使用することを開示している。アバレリックス( A b a r e l i x )は好ましいLHRH同族体である。LHRHペプチドのD1拮抗剤の酢酸塩は一般に、薬学的に許容しうるものとして開示されている。WO0018423号明細書に開示されている化合物は医薬品の製造において有用である。

**【0006】**

WO0055190A号明細書はホルモンに依存する腫瘍及びホルモンに影響される疾病に対する医薬の製造のためのLHRH拮抗剤デカペプチドを開示しており、これはHPLC製剤によって精製され凍結乾燥される。

**【0007】**

国際出願EP0955308A号明細書は、液体クロマトグラフィーにより同時單一段階での精製でLHRHデカペプチド拮抗剤の塩酸塩をそのジ酢酸塩に変換する方法を開示している。

**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0008】**

本発明の目的は、残存有機溶媒から他の点では純粋な前記種類のペプチドを精製する方法であって、凍結乾燥をしないで済む方法を提供することにある。

**【0009】**

さらに、本発明の目的は、残存有機溶媒を実質的に含まず、低温沈殿物(Cryoprecipitate)の形をとらないような、他の点では純粋なペプチドを提供することにある。

**【0010】**

さらに、本発明の諸目的は、以下の、課題を解決するための手段、発明を実施するための最良の形態、および添付の特許請求の範囲から明らかとなろう。

**【課題を解決するための手段】****【0011】**

本発明では、残存有機溶媒から、他の点では純粋なペプチド、特にノナペプチドまたはデカペプチド、より詳細にはLHRH拮抗剤であるノナペプチドまたはデカペプチドを精製する方法が提供されている。この方法は、以下の諸工程、即ち、

水、およびメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノールから選ばれる少なくとも1種のアルコールを含む溶出溶媒混液に、該他の点で純粋なペプチドを溶解させ、

上記の他の点では純粋なペプチドを該溶媒混液に溶かした溶液を、実質的に、酢酸メチル、酢酸エチル、プロピオン酸メチル、プロピオン酸エチル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル、酢酸t-ブチル、ギ酸エチル、ギ酸プロピル、ギ酸イソプロピルから選ばれる1種または数種の極性化合物およびヘキサン、ヘプタン、オクタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサンから選ばれる1種または数種の非極性化合物、および必要に応じて5%までの酢酸またはプロピオン酸からなる、激しく攪拌した沈殿溶媒混液に加え、

沈殿したペプチドを単離し、

単離したペプチドを、該極性化合物の1種または混液あるいは同様な極性の溶媒または溶媒混液を用いて洗浄し、

この洗浄したペプチドを乾燥させること、

を含み、水および少なくとも1種のアルコールを含む該溶媒混液の水分が8%(v/v)未満であり、この溶出溶媒混液と上記沈殿溶媒混液との容量比が1:10またはそれ以上であることを条件とするものである。

**【0012】**

「他の点では純粋なペプチド」とは、除去する必要があるまたはその含量をかなり減じる必要がある揮発性不純物を別にすれば、医薬品に使用するのに十分純粋であるペプチドのことである。該他の点では純粋なペプチドは、通常クロマトグラフィーにより精製を行

10

20

30

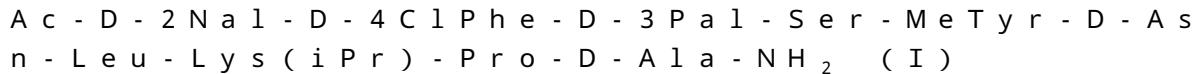
40

50

った物質である。

【0013】

該他の点では純粋なペプチドは、



であることが好ましい。

【0014】

本発明の第1の好ましい態様では、前記溶出溶媒混液の水分は、5% (v/v) 未満である。

【0015】

10

本発明の第2の好ましい態様では、この溶出溶媒混液と前記沈殿溶媒混液の容量比は、少なくとも15、特に、少なくとも20である。

【0016】

本発明の第3の好ましい態様では、前記溶出溶媒混液のアルコールはエタノールである。

【0017】

本発明の第4の好ましい態様では、前記沈殿溶媒混液の極性成分は酢酸エチルである。

【0018】

本発明の第5の好ましい態様では、前記沈殿溶媒混液の非極性成分はヘプタンである。

【0019】

20

以下に、好ましい実施態様を説明することによって、本発明をさらに詳述するが、これによって本発明が制限されると理解されるべきではない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

〔実施例1〕

合成生成物の精製に用いた調製的HPLCからの、エタノール・水・酢酸40:59:1 (v/v/v) に純品(1) (全量100g) を含む画分をプールし、減圧濃縮して油を得、これをエタノールから2度、共蒸発させた。得られた固体を440mlのエタノールに溶かし、この透明な溶液を20分間かけて8.8Lの酢酸エチル/ヘプタン1:1 (v/v) に加えた。攪拌を1時間続けた後、ろ過した。得られた無定形生成物を3Lの酢酸エチルで洗浄したところ、これによりヘプタンは殆ど全て除去されたことが分かった。この洗浄した生成物は、真空乾燥機中、40°C、0.3バールで48時間乾燥させた。この乾燥生成物の元素分析から、(I)のモノ酢酸塩の得られたことが示された。これに対し、低温沈殿(Cryoprecipitation)では、対応するジ酢酸塩が得られる。次の表は、本発明により製造した(I)のモノ酢酸塩の分析パラメータを、対応する凍結乾燥品(ジ酢酸塩)と比較したものである。

30

【表1】

表：パーセンテージは全て重量%

	凍結乾燥生成物	沈殿生成物
水	3.4%	3.0%
エタノール	<0.024%	<0.024%
酢酸エチル	<0.024%	<0.024%
ヘプタン	<0.024%	<0.024%
酢酸(酢酸塩として)	7.5%	3.9%
HPLC純度	99.8%	99.8%
ペプチド含量	88.8%	94.9%
ろ液中のロス	—	0.3%

40

50

## 【0021】

## 〔実施例2〕

沈殿溶媒または溶媒混液の組成を変更、その他の点では実施例1と同様の方法。純粋な酢酸エチル中で沈殿を行うと、ペプチドの約3重量%乃至約5重量%のロスが生じる。純粋なヘプタン中で沈殿させると、ろ過が困難な粘着性の生成物が生じる。酢酸エチルとヘキサンの1:1(v/v)混液では、ろ過および乾燥させやすい生成物が得られ、ペプチドのロスは、実験を繰り返し行つても、常に0.5重量%未満であった。

## 【0022】

## 〔実施例3〕

油状生成物を溶出溶媒(無水エタノール)に溶かした溶液の水分を変更、その他の点では実施例1と同様の方法。水分を10%(v/v)にすると、ろ過が困難な粘着性の沈殿生成物が生じる。水分を15%(v/v)にすると、油状の沈殿生成物が生じる。満足な結果を得るためにには、水分は8%(v/v)を超えてはならないが、好ましくは5%(v/v)未満に維持すべきである。水分を5%(v/v)未満とするには、クロマトグラフィーからの油状生成物をエタノールと少なくとも2度共蒸発させればよい。

10

## 【0023】

## 〔実施例4〕

沈殿温度を変更、その他の点では実施例1と同様の方法。沈殿温度は重要でないことが分かった。0から20まで変化させても、生成物の収率および形態に目立った差は認められなかつた。

20

## 【0024】

## 〔実施例5〕

溶出溶媒中の(I)の濃度を変更、その他の点では実施例1と同様の方法。溶出溶媒のエタノールと共に蒸発させたクロマトグラフィーからの油状生成物の濃度は、できるだけ高くすべきであることが分かった。重量で330gの濃度さえも用いることができた。

## 【0025】

## 〔実施例6〕

溶出溶媒と沈殿溶媒との容積比その他を変更、他の点では実施例1と同様の方法。最適な容積比は、約1:20であることが分かった。1:15乃至1:30の比で満足のいく結果が得られることを明らかにすることことができた。1:10の比にすると、粘着性生成物が生じた。沈殿速度は極めて速い。懸濁液は、溶かした物質を最後に加えてから30分後にはろ過することができる。酢酸エチルを用いて洗浄しても生成物のロスは生じず、効率よくヘプタンを除去することができた。

30

---

フロントページの続き

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特開平11-310595(JP,A)  
特開平05-271227(JP,A)  
国際公開第01/030804(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 7/00  
C07K 1/00  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed