

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6659592号

(P6659592)

(45) 発行日 令和2年3月4日(2020.3.4)

(24) 登録日 令和2年2月10日(2020.2.10)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 F 9/09 (2006.01)

C O 7 F 9/09

V

請求項の数 4 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2016-572684 (P2016-572684)
 (86) (22) 出願日 平成27年6月9日(2015.6.9)
 (65) 公表番号 特表2017-524666 (P2017-524666A)
 (43) 公表日 平成29年8月31日(2017.8.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2015/054346
 (87) 国際公開番号 W02015/189766
 (87) 国際公開日 平成27年12月17日(2015.12.17)
 審査請求日 平成30年1月12日(2018.1.12)
 (31) 優先権主張番号 M12014A001053
 (32) 優先日 平成26年6月10日(2014.6.10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 イタリア(IT)

前置審査

(73) 特許権者 503375175
 ケミー ソシエタ ペル アチオニ
 イタリア イー20092 チニセーロ
 バルサモ ヴィア デイ ラヴォラトリ
 54
 (74) 代理人 110001243
 特許業務法人 谷・阿部特許事務所
 (72) 発明者 ロレンツォ デ フェッラ
 イタリア アイー00161 ローマ ヴ
 ィア ヴェローナ 22
 (72) 発明者 マウロ アニバルディ
 イタリア アイー00040 モンテ ポ
 ルツィオ カトーネ ヴィア モンテコン
 パトリ 17/B-4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L- α -グリセロホスホリルコリンを精製するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

L- α -グリセロホスホリルコリンを精製するための方法であって、L- α -グリセロホスホリルコリンを、DMSOから結晶化させ、DMSOは、L- α -グリセロホスホリルコリンの重量部当たり、2から100容量部の間に含まれる量で使用されることを特徴とする方法。

【請求項2】

DMSOは、L- α -グリセロホスホリルコリンの重量部当たり、5から15容量部の間に含まれる量で使用されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記結晶化は、0℃から100℃の範囲の温度で行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記結晶化は、15℃から50℃の範囲の温度で行われることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の対象は、L- α -グリセロホスホリルコリンを精製するための方法であって、L- α -グリセロホスホリルコリンを、DMSO、またはDMSOと好ましくは水、アル

10

20

コール、ハロゲン化溶媒、エーテル、エステルおよび／またはアミドから選択される少なくとも１種の他の溶媒との混合物から結晶化させる方法である。そのような方法によって、９９．５％超、好ましくは９９．７％超、さらにより好ましくは９９．９％以上の純度を有する、同じく本発明の対象を構成するＬ－α－グリセロホスホリルコリンを得ることができ、特に、それによって、β－GPC異性体での汚染が０．１％未満である、および／または環式種cGPでの汚染が０．１％未満であるGPCを得ることができる。

【０００２】

本発明のさらなる対象は、Ｌ－α－グリセロホスホリルコリンの純度を決定するための方法であって、アミノ固定相を有するHPLCカラムを通すＬ－α－グリセロホスホリルコリンの溶離と、Ｌ－α－グリセロホスホリルコリン自体、およびその任意の不純物の、蒸発光散乱検出器型の手段によるその後の検出とを含む方法により代表される。

【背景技術】

【０００３】

現在の経済的および人口統計学的傾向により、人々の全体的な高齢化が生じているが、この現象は、世界の最富裕地域において特に顕著である。

【０００４】

したがって、高齢化による個々の能力の減退が非常に重要な問題となっており、この減退の緩和を助ける方法を特定することが、ますます必要となっている。

【０００５】

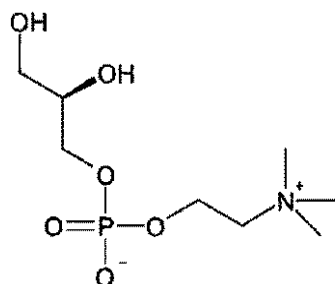
特に、知的能力の低下は、高齢化の最も好ましくない結果の１つであり、それと闘うための効果的な治療法を発見するべく、多くの研究努力がなされている。

【０００６】

この領域において、最も注目されている生成物は、構造が以下に示されるＬ－α－グリセロホスホリルコリン（GPC）である。

【０００７】

【化１】



【０００８】

GPCは、認知障害の分野において治療薬剤として十分確立された用途を有し、医療業務および多くの臨床試験における効用の幅広い立証に基づいて、その世界的な消費が定着している。GPCの調製方法は、２つの主要な種類に分けることができる：天然起源のホスファチジルコリンの脱アセチル化反応に基づく方法、および化学的中間体の市場において市販されている原材料からGPCが合成される方法。

【０００９】

第１の種類の方法は、食品産業において既に広く使用されており、その取り扱いによっていかなる特定の安全性リスクも生じないことを特徴とする、大豆レシチン等の原材料生成物を使用するという利点を有する。

【００１０】

一方、GPC合成手法に基づく手順は、使用される物質、特にキラル合成前駆体の管理における懸念をもたらす。これらは、主にR－グリシドールおよびR－クロロプロパンジオール（それぞれ以下で概説される構造IおよびII）であり、いずれの場合においても、これらは著しい毒性特性を有するアルキル化分子である。したがって、微量残留物がある場合、またはそれらの毒性特性を維持する他の種（例えば、中間体もしくは副生成

物)が存在する場合、それらの使用が、使用および取り扱いの間の危険性の問題を、さらにはこれらから得られたGPCの消費の危険性をいかにもたらし得るかは明白である。

【0011】

【化2】



I

II

10

【0012】

GPCの調製方法が何であれ、その精製および単離に関連する部分は、生成物の品質に大きな影響を有し、特にその化学的純度は、その毒性および治療プロファイルに影響し得る。そのような純度は、従来、「薄層クロマトグラフィー」(TLC)により検証される。この種の分析は、良好な多用途特性を有し、最も極性の高いものから最も極性の低いものまでの全ての成分が同時に視認され得るため、試料を全体的に評価することができる。しかしながら、この分析技術は、任意の不純物の定量的決定、および同様の構造的特徴を有する種、例えば同等の極性を有する異性体等の分離に関して、完全には満足に足るものではない。

20

【0013】

HPLCは、これらのTLCの欠点を克服するために最も頻繁に採用される分析技術であるが、GPCの場合、HPLCの使用は、固定相との相互作用を制限する分析物の高い極性特性、およびUV検出器、すなわち品質管理実験室におけるより一般的な検出器の使用を可能にする発色団が存在しないことに起因して、通常よりも容易ではなかった。公開されている方法は、感度に関して、および広がった、または非対称のピークを有するクロマトグラフィー信号の形状に関して満足に足るものではなく、これらの条件下では、分離力の低減が見られ、またある特定の種に対応する信号が、他のクロマトグラフィー信号の下に隠され、任意の存在する不純物を明らかにする能力が失われてしまうリスクがある。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3を参照されたい。

30

【0014】

この状況は、人間に対する使用が意図された活性成分の生成における不純物プロファイルの詳細な説明を提供する、製薬分野における現在のガイドラインにあまり関連づけられていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0015】

【特許文献1】米国特許第6229605号明細書

【特許文献2】国際公開第9013552号

【特許文献3】欧州特許第575717号明細書

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】J. Am. Oil Chem. Soc (2012) 89:1155-1163

【非特許文献2】Talanta (2012) 94:22-29

【非特許文献3】Journal of Chromatography A (2012

50

) 1 2 2 0 : 1 0 8 - 1 1 4

【非特許文献4】「HPLC Columns YMC Classics」YMC Europe GmbH

【非特許文献5】Anal. Chem (1997) 69 : 561A-563A

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

したがって、GPCの異なる調製物の品質を決定するための新たな分析技術の開発、ならびに、GPCの調製物中の不純物の存在がそのような分析技術により明らかにされた場合、GPCの純度の新たな基準の定義、および現在の品質基準に従うGPCの生成を可能とするための新たな精製手順が最も重要である。

10

【課題を解決するための手段】

【0018】

ここで、我々は、予想外にも、GPCのHPLC分析において、アミノHPLCクロマトグラフィーカラム型、すなわちアミノ官能基が固定相の表面に結合したカラムを好適に使用することにより、上述の問題を克服することが可能であることを見出した。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】手順1により得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

【図2】実施例2から得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

20

【図3】実施例1（比較）から得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

【図4】手順2により得られたGPCの³¹P-NMRスペクトルを示す図である。

【図5】実施例3から得られたGPCの³¹P-NMRスペクトルを示す図である。

【図6】手順1により得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

【図7】実施例3から得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

【図8】手順3により得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

【図9】実施例4から得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

【図10】実施例5（比較）から得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

30

【図11】手順4により得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

【図12】実施例6から得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

【図13】実施例7（比較）から得られたGPCのHPLC-ELSDクロマトグラムである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

ここで、我々は、予想外にも、GPCのHPLC分析において、アミノHPLCクロマトグラフィーカラム型、すなわちアミノ官能基が固定相の表面に結合したカラムを好適に使用することにより、上述の問題を克服することが可能であることを見出した。この種のいくつかのカラム、例えば、Supelcosil（商標）LC-NH₂、Hypersil Gold（商標）アミノ、Zorbax（登録商標）NH₂、YMC（商標）Polylamine II、Nucleosil（登録商標）NH₂、Luna（登録商標）NH₂が市販されている。固定相は、アミノ基、好ましくは第2級および第3級アミノ基を含有するポリマーコーティングからなるコーティングを有する保持体、例えばシリカ等の粒子からなってもよい。この種の固定相の説明は、参照により本明細書に組み込まれる、YMC Europe GmbHによる出版物である非特許文献4の22頁および23頁に報告されている。

40

【0021】

同時に、蒸発光散乱検出器（ELSD）型が使用される必要があるだろう。

【0022】

50

そのような検出器は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、非特許文献5および特許文献1において説明されている。これらは、溶離液を蒸発チャンパ内に送り、そこで溶媒を蒸発させて、光線を散乱させる微小試料粒子のミストを残すツールである。検出器応答は、存在する試料の量に依存する拡散に比例し、このシステムは、非定組成溶離法を使用しながら、GPC等の発色団を含まない種の検出を可能にする。

【0023】

固定相および検出器のこの組合せにより、様々な溶離液を使用してもよく、特に、水性緩衝系から好適になる系、例えば酢酸アンモニウム緩衝液等を、場合により、例えばメタノールおよび／またはアセトニトリル等の有機溶媒と組み合わせられてもよい。そのような溶離液系は、定組成モードで、すなわちクロマトグラフィー工程の期間全体にわたり同じ溶離液を保持することにより、または、所定のプログラムに従ってクロマトグラフィーの間、溶離液の組成が変化する勾配モードで使用され得る。分析方法の最適化は、本技術分野の教示に従って行われる。

【0024】

したがって、本発明の対象は、L- α -グリセロホスホリルコリンの純度を決定するための方法であって、アミノ固定相を有するHPLCカラムを通すL- α -グリセロホスホリルコリンの溶離と、L- α -グリセロホスホリルコリン自体、およびその任意の不純物の、蒸発光散乱検出器型の手段によるその後の検出とを含む方法である。

【0025】

溶離液相は、水溶液、極性有機溶媒、またはそれらの混合物からなってもよく、水溶液は、好ましくは3から6、さらにより好ましくは4から5の範囲のpHを有する。極性有機溶媒は、C₁~C₄アルコール、アセトニトリル、またはそれらの混合物であってもよく、C₁~C₄アルコールは、好ましくはメタノールである。

【0026】

この組合せにより、GPCに対応するクロマトグラフィーピークの広がり欠陥を克服することができると同時に、高い感度でGPC濃度の決定を行うことができる。

【0027】

同時に、大豆レシチンから出発するGPCの調製プロセスから得られる他の種の存在を、GPC調製物において検出することが可能であることが見出された。

【0028】

これらの種には、L- α -グリセロホスホエタノールアミン(GPE)、糖、および、GPC生成プロセスにおいて原材料として使用される大豆レシチンにおけるその存在、またはその前駆体の1つの存在から生じる、それらの類似体が含まれる。

【0029】

この重要な結果を得た上で、以前よりも高感度および選択的な様式で、人間に対する使用のための医薬品に最も好適な生成方法により得られたGPCの試料中の不純物プロファイル(存在する場合)を検証することに、すぐに関心が持たれた。

【0030】

この目的のために、完全合成手順において使用されるグリシドールまたはクロロプロパンジオール等の極めて有毒な原材料による潜在的な汚染を鑑み、完全合成手順は人間に対する使用のためのGPCの生成には不適切であると判断されることから、大豆レシチン脱アシル化に基づく半合成プロセスが主に考慮された。完全合成経路によるGPCの生成に関連した上記禁忌を考慮しながら、この手法で生成された中国製のGPC試料を、完全な評価のために新たな分析手順に提出した。

【0031】

半合成手順から得られる試料は、特許文献2(具体的には実施例2)および特許文献3(具体的には実施例1)において報告されている手順に従って生成された。これらの文献には、イオン交換樹脂によるGPCの精製に基づく手順が報告されており、それらは、塩化カドミウムとの付加物(GPC·CdCl₂)としてのGPCの沈殿およびシリカクロマトグラフィーを含まず、したがってこれらは、有毒のカドミウム塩および低い生産性を

10

20

30

40

50

特徴とする手順の使用を回避しながら、GPCの大量生成に実際に適用可能な方法である。

【0032】

分析結果は、全ての試料において、GPCの保持時間の前およびそれに非常に近い保持時間で溶離するピークの存在を示し、RRT（相対保持時間）は、約0.94に等しかった。著しい強度のこの信号は、グリセロール、GPE、グリセロリン酸、またはスクロース等の、調製プロセスを鑑みて合理的に予測されるような種に対応しない。

【0033】

新たに検出された種のクロマトグラフィー挙動が、これまで明らかにされていなかったようにGPCのそれと非常に類似していること、および本発明の対象である新たなHPLC法を用いてもGPCのそれとほとんど異ならなかったことを考慮した結果、我々は、それがその位置異性体に対応すると仮定した。

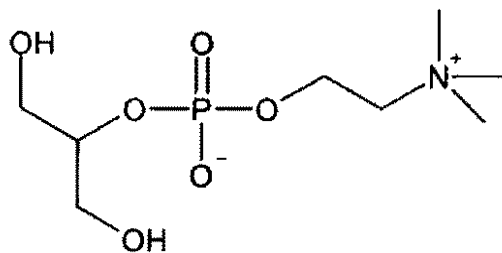
10

【0034】

GPCのベータ異性体（ β -GPC）の化学構造は以下に記載される。

【0035】

【化3】



20

【0036】

β -GPC

β -GPCは、市販されておらず、 β -GPCが新たな方法により検出可能な種であり得ることを確認するために、以下に示されるスキームに従ってその合成を行った。

【0037】

OCC(O)OP(=O)([O-])[O-]
 $\xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2]{\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COCl, DMAP}}$
CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(O)OP(=O)([O-])[O-]

G2P
 $\xrightarrow[\text{MeOH}]{\text{MeO-Na}^+}$
OCC(O)OP(=O)([O-])OCC

CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(O)OP(=O)([O-])OCC

1,3-DPPC

1,3-DPPA
 $\xrightarrow[\text{TsCl}]{\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{ TsO}^-, \text{C}_5\text{H}_5\text{N}}$
CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(O)OP(=O)([O-])OCC

このようにして得られた β -GPCを、NMRにより分析して構造を確認し、またHPLCにより分析して、その純度が高いことだけでなく、その保持時間が、異なるGPC試料の分析により明確化された未知の種の保持時間と適合することを示した。したがって、未知の信号に β -GPC構造への対応を帰属させることが可能であり、この帰属をHPLC「スパイク」実験により確認したが、HPLCにおいて約0.94のRRTを有する種の存在を示すGPC試料に対して、較正された量の β -GPCを添加し、それに対応して約0.94のRRTを有する信号が分裂することなく増加することが観察された。

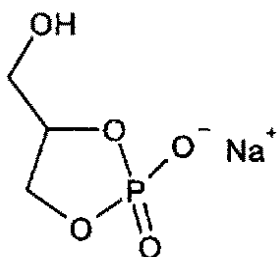
構造帰属のさらなる確認として、 ^{31}P -NMR実験を行い、これにより、約0.94のRRTを有する種の存在がより高い試料において約-0.6ppmの信号を同定することができた。上に記載されたスキームに従って合成された β -GPCの信号は、同じフィールド値に現れた。

したがって、³¹P-NMR法は、HPLC手順の可能な代替法であるが、そのより低い感度、および品質管理実験室におけるHPLC機器のより広い利用可能性に起因して、本発明の対象であるHPLC法は、約0.94のRRTを有する種(β-GPC)の決定に依然として好ましい。

また、 ^{31}P -NMR分析を用いて、特許文献3に従って得られた生成物のスペクトルにおいて、約18.4 ppmの追加的な信号を同定することも可能であった。これらの値は、以下でナトリウム塩の形態で示される環式ホスフェートcGPの値に適合する。

【 0 0 4 2 】

【化 5】



【0043】

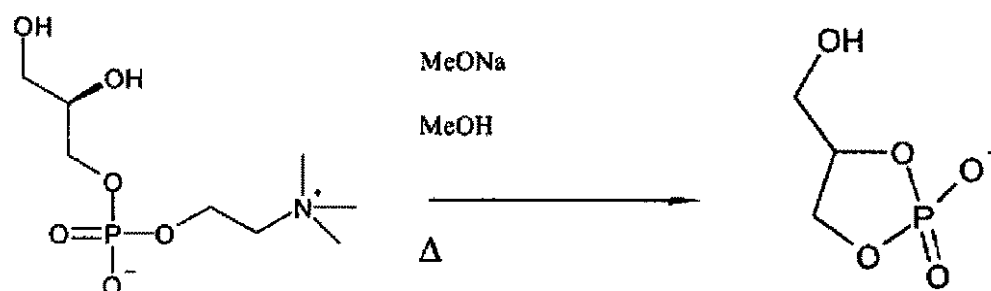
10

cGP (ナトリウム塩)

この環式ホスフェートの形成は、特許文献3の手順に従うGPCの単離の条件において想定されるものである。この仮説を裏付けるため、以下に示されるスキームに従ってcGPの基準試料を調製した。

【0044】

【化 6】



20

GPC

cGP

【0045】

この生成物の ^{31}P -NMR分析によって割当てが確認され、約18.4 ppmの同じ信号を示し、また適切なスパイク実験において信号の分割は見られなかった。

30

【0046】

本発明の一実施形態を表す新規な分析法で判明したことを鑑みて、我々は、既知のGPC精製法が明らかにされた不純物を適正に除去し得るか否かを実験的に検証した。

【0047】

既に示された理由から、塩化カドミウムとの錯化およびシリカでのクロマトグラフィーによる精製を除き、我々は、先行技術において報告されているもののうち（例えば特許文献2を参照されたい）、産業上の利用可能性の点で、エタノールからの結晶化を最善の手順として特定した。特許文献2の手順に従って得られた試料をエタノールから結晶化させたが、HPLC分析では、精製が部分的のみであり、大量のベータ異性体（0.48%）が依然として生成物中に存在することが示された。以下の表1は、異なる調製手順に従って得られたGPC試料の分析結果を要約している。

40

【0048】

【表 1】

表1

試料	調製手順	β -GPC (HPLCによる面積%)	α GP (^{31}P -NMRによる面積%)	備考
手順1	特許文献2	0.8%		
手順2	特許文献3	0.1%	0.2%	
実施例1(比較)		0.48%		手順1からの試料のエタノールからの結晶化
市販のGPC	合成	1.8%		中国製の市販のGPC。いくつかの他の不純物がHPLCによる面積%として3%の総量で存在する。

10

【0049】

ここで、GPCを精製するための新たなシステムが特定され、この発見もまた、本発明の実施形態を表す。

20

【0050】

新たな精製法は、ジメチルスルホキシド（DMSO）の使用に基づく。本発明の実現のために、この溶媒は、異なる条件および精製されるGPCに対する異なる量比で使用され得る。

【0051】

本発明の実施形態において、DMSOに加え、中間的極性の極性溶媒または非極性溶媒等の他の溶媒が存在してもよい。これらの追加的な溶媒は、これらに限定されないが、ハロゲン化溶媒、アルコール、エーテル、エステルおよびアミド等の異なるクラスの溶媒に属してもよい。

30

【0052】

本発明の実現のための使用され得る溶媒の例は、これらに限定されないが、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、n-ブタノール、塩化メチレン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、およびDMFである。

【0053】

本発明の態様によれば、DMSOは、L- α -グリセロホスホリルコリンの1重量部当たり2から100容量部、好ましくは3から70容量部の範囲の量で、より好ましくは4から30の範囲の比率で、より好ましくは5から15容量部の範囲の比率で使用される。

【0054】

本発明のさらなる態様によれば、任意の溶媒または任意の追加的な溶媒は、DMSOの容量当たり0.01から10容量の範囲の量で、好ましくは0.05から5、より好ましくは0.1から1の範囲の比率で使用される。

40

【0055】

プロセスパラメータに依存して、GPCの適切な結晶化を得ることができ、または、不純物を含有するGPC結晶の精製もまた、それらをDMSO中に懸濁させ、時間および温度の好適な組合せを使用し、次いで結晶を液相から分離することにより行うことができ、またこの場合、DMSOと組み合わせて他の溶媒が存在してもよい。

【0056】

精製は、異なる温度で行われてもよく、通常通り、精製プロセスの異なる段階で異なる

50

温度を採用し、GPCの最後の単離段階においてより低い温度を有することが好都合となり得る。

【0057】

精製の実行に好適な温度は、100℃から0℃の間、好ましくは70℃から5℃の間、より好ましくは50℃から15℃の間であってもよい。

【0058】

温度を選択する際、DMSOの凍結温度を考慮することが好ましく、それは追加的な溶媒の存在、ならびにGPCおよび存在する他の種の濃度に主に依存して変動し得る。GPCの単離のために、閉鎖型または開放型の遠心分離機または濾過システム等の当業者に知られている機器が使用され得る。結晶は、精製に使用される同じ溶媒または同じ溶媒混合物を使用した洗浄手順に直接供されてもよく、あるいは、生成物の洗浄のために、結晶化または懸濁ステップにおいて使用されるもの以外の溶媒または溶媒混合物が使用されてもよい。

10

【0059】

本発明の対象である精製プロセスにおいて使用されるGPCの量と比較して使用されるDMSOの比は、大きく変動し得、本技術分野の教示に従って好都合に選択され得る。実際には、プロセス生産性を必要以上に低減しないために、過度に多量のDMSOを使用しないことが好都合であり、一方、これらの量は、結晶化した生成物の分離操作を困難とするのを回避するために、過度に低減されるべきではない。重量部(kg)当たり2から100容量部(リットル)の範囲のDMSOおよびGPCの比率、より好ましくは、GPCの重量部当たり3から70容量部の範囲の比率、より好ましくは4から30容量部の範囲の比率、より好ましくは5から15容量部の範囲の比率が、この実施形態において好都合であると考えられ得る。

20

【0060】

本発明を実行するための特に有利な様式は、水または他の溶媒または溶媒混合物中の溶液からのGPCの結晶化である。そのような溶液にDMSOを添加することにより、GPCの沈殿が同時に生じることなく蒸留操作を実行するのに十分な期間安定である溶液が得られることが判明した。したがって、一般的に使用される他の溶媒と比較してより高いDMSOの沸点を利用して、生成物の同時の沈殿により引き起こされる障害なしに、結晶化を行うために使用される溶媒の混合物の組成を変更することが可能である。

30

【0061】

溶媒混合物の組成が達成されたら、誘発因子として機能する一定量の結晶化したGPCの添加により、GPCの結晶化を誘引することが可能である。この選択肢は、必要であるようには思われないが、その適用が望ましい場合、使用される誘発因子の品質と、精製の最後に単離されるGPC結晶の品質との間の密接な依存性は観察されていないため、必ずしも特に高い純度を有する必要のないGPC結晶の試料が、誘発因子として使用され得る。

【0062】

前述のものを含む大量の他の分子種を含有する調製物からであっても、DMSOを使用したこれらの精製手順によっていかにして高純度GPCを得ることができるかが観察されるのは、驚くべきことであった。

40

【0063】

特に、GPCベータ異性体は、高純度での単離が求められる生成物の化学-物理学的特性と非常に類似したそれらの特性を有するため、本発明の対象である精製システムのGPCベータ異性体を除去する能力は有意義であり、予想外であると思われる。

【0064】

エタノールからの結晶化とは異なり、本発明の対象である精製法によって、レシチンから得られたGPC調製物中に最も頻繁に見られる種のいくつかからGPCを精製することができることも判明した。

【0065】

50

特に、本発明の実施形態において、スクロースおよびG P C等のG P C不純物を効果的に除去することが可能であることが判明した。

【0066】

以下の表2は、これらの実験において達成された主な結果の、結晶化溶媒としてエタノールを使用して行われた比較実験に関連する結果との比較を要約している。

【0067】

【表2】

表2

実施例	結晶化溶媒	試験試料として使用されたGPC中に存在する不純物		結晶化したGPC中の不純物の残留含量(HPLCによる面積%)	備考
		不純物	含量(HPLCによる面積%)		
1 (比較)	エタノール	β -GPC	0.8%	0.48%	手順1により得られたGPC結晶化
2	DMSO	β -GPC	0.8%	0.16%	手順1により得られたGPC結晶化
3	DMSO	β -GPC	0.1%	<0.01%	手順2により得られたGPC結晶化
		cGP	0.2%*	<0.01%*	
4	DMSO	GPE	0.2%	<0.01%	手順3により得られたGPC結晶化
5 (比較)	エタノール	GPE	0.2%	0.02%	手順3により得られたGPC結晶化。低収率。
6	DMSO	スクロース	2%	<0.01%	手順4により得られたGPC結晶化
7 (比較)	エタノール	スクロース	2%	0.14%	手順4により得られたGPC結晶化。低収率。

*³¹P-NMR測定

【0068】

表2に示される結果は、G P Cの精製における本発明の実施形態の有用性を明らかにしている。これに関して、実施例6の場合のように、本発明の実現は、糖、この場合スクロースの存在下であってもG P Cを結晶化させる可能性を、およびこれらの場合であっても達成可能な高い精製効率を実証していることが注目に値する。逆に、エタノールからのG P C結晶化では、スクロースの満足に足る除去が得られなかった。

【0069】

加えて、G P C、さらにはスクロース等の糖は、結晶化溶媒としてエタノールが使用される場合結晶化の阻害剤として挙動し、その結果、これらの場合では結晶化収率が低いため、G P Cの工業生産のためのプロセスにおいてはこの手順は非現実的となる。

【0070】

本発明のさらなる実施形態は、純度が99.5%超、好ましくは99.7%超である、さらにより好ましくは99.9%以上の純度を有するG P Cにある。

【0071】

特定の特徴は、 β -G P C異性体での汚染が0.1%未満であるG P C、および環式種c G Pでの汚染が0.1%未満であるG P Cにより表される。

【0072】

本発明の目的のために、上で示された純度は、HPLC法および／または ^{31}P -NMRにより、好ましくは、それぞれ実施例8および9において説明ならびに例示されるHPLC法および／または ^{31}P -NMRにより、面積パーセントとして測定される。

【0073】

以下の実施例は、決して本発明を限定することなく、本発明の方法のいくつかを例示することを意図する。

【実施例】

【0074】

手順1

10

特許文献2の実施例2に従うGPCの調製

125gの大豆レシチンに、500mLのメタノールを添加し、完全に溶解するまで攪拌下で保持する。メタノール中30%のナトリウムメチレート20mLを添加する。室温で3時間攪拌を継続する。濾過後、残渣をメタノールで洗浄する(3×10mL)。水酢酸で濾液を中和し(約6のpH)、次いでそれを約125mLの残留量まで濃縮し、上部の油相を分離する。濃縮された下部相を、メタノール中に含浸させたAmberlyst 15樹脂(酸形態)140mLを含有するカラムで溶離する。溶離は、375mLのメタノール、続いて300mLの水で進行させる。

【0075】

このように調製された以下の3つの一連のクロマトグラフィーカラムで、水性溶離液を溶離する：水中に含浸させたOH⁻形態のIR93樹脂30mLを有する第1のカラム、水中に含浸させたOH⁻形態のIR401樹脂30mLを有する第2のカラム、水中に含浸させた酸形態のIRC50樹脂12mLを有する第3のカラム。

20

【0076】

最終的な溶離液を、15%に等しい含水量を有する残留粘稠性流体まで濃縮する。

【0077】

HPLC-EELS D分析では、0.8% (面積パーセント) に等しいβ-GPCの含量が示された。

【0078】

手順2

30

特許文献3の実施例1に従うGPCの調製

大豆レシチンの抽出により商業的に得られたホスファチジルコリンが濃縮された200gの分画を、600mLのメタノールに溶解する。得られた溶液を、メタノール中に含浸させた塩基形態のDuolite A147樹脂を含有するクロマトグラフィーカラムで溶離する。濃縮された溶液を投入した後、メタノールでGPC溶離を完了させる。溶離液を酢酸で中和し、300mLの残留量まで濃縮し、2つの相の明確な成層を得る。濃縮された下部相を分離し、メタノールで希釈し、200mLのn-ヘプタンで2回抽出する。

【0079】

800mLのn-ブタノールを濃縮された下部相に添加し、溶液を約300mLの残留量まで濃縮し、約5℃の温度まで冷却し、濾過する。GPC結晶を30mLの脱塩水に溶解し、溶液を、15%に等しい残留水含量を有する粘稠性液体まで濃縮する。

40

【0080】

HPLC-EELS D分析では、0.1% (面積パーセント) に等しいβ-GPC含量が示された。 ^{31}P -NMR分析では、0.2% (面積パーセント) に等しいcGP含量が示された。

【0081】

手順3

GPEで汚染されたGPCの調製

結晶のGPEを、水中のGPCの溶液に添加し、溶液を、15%に等しい残留水含量を有する粘稠性液体まで濃縮する。HPLC-EELS D分析では、0.2% (面積パーセン

50

トとして) に等しい G P C 含量が示された。

【0082】

手順 4

スクロースで汚染された G P C の調製

結晶のスクロースを、水中の G P C の溶液に添加し、溶液を、15% に等しい残留水含量を有する粘稠性液体まで濃縮する。H P L C - E L S D 分析では、2% (面積パーセントとして) に等しいスクロース含量が示された。

【0083】

実施例 1 (比較)

エタノールからの結晶化を使用した、手順 1 により得られた G P C の精製

粘稠性流体の形態の 2.5 g の G P C (手順 1 により得られた) を、攪拌下、約 50℃ の温度で 5 mL のエタノールに溶解する。溶液を約 10℃ の温度まで冷却し、いくつかの G P C 結晶で誘発すると、数分で沈殿物の形成が観察される。これを約 5℃ の温度まで冷却し、0℃ から 5℃ の間で 1.5 時間攪拌下で保持し、ブフナー漏斗を通して結晶を濾過し、エタノールで洗浄する。真空下で乾燥させた後、1.4 g の G P C が得られる。

【0084】

H P L C - E L S D 分析では、0.48% (面積パーセントとして) に等しい β - G P C 含量が示された。

【0085】

実施例 2

D M S O からの結晶化を使用した、手順 1 により得られた G P C の精製。

粘稠性流体の形態の 2.5 g の G P C (手順 1 により得られた) に、14 mL の D M S O を添加し、混合物を攪拌下で約 50℃ の温度まで加温し、約 25℃ の温度まで冷却し、いくつかの G P C 結晶で誘発する。これを 20℃ から 25℃ の間で 16 時間攪拌下で保持すると、この期間中、沈殿物の形成が観察され、ブフナー漏斗を通して結晶を濾過し、エタノールで洗浄する。真空下で乾燥させた後、1.9 g の G P C が得られる。

【0086】

H P L C - E L S D 分析では、0.16% (面積パーセント) に等しい β - G P C 含量が示された。

【0087】

実施例 3

D M S O からの結晶化を使用した、手順 2 により得られた G P C の精製。

粘稠性流体の形態の 11.2 g の G P C (手順 2 により得られた) に、60 mL の D M S O を添加し、混合物を攪拌下で約 50℃ の温度まで加温し、約 25℃ の温度まで冷却し、いくつかの G P C 結晶で誘発する。これを 20℃ から 25℃ の間で 16 時間攪拌下で保持すると、この期間中、沈殿物の形成が観察され、ブフナー漏斗を通して結晶を濾過し、エタノールで洗浄する。真空下で乾燥させた後、8.2 g の G P C が得られる。

【0088】

H P L C - E L S D 分析では、 β - G P C が存在しないことが示された。

【0089】

^{31}P - N M R 分析では、c G P が存在しないことが示された。

【0090】

実施例 4

D M S O からの結晶化を使用した、G P C (G P E で汚染された) の精製。

粘稠性流体の形態の 10.7 g の G P C (手順 3 により得られた) に、20 mL の D M S O を添加し、混合物を攪拌下で約 70℃ の温度まで加温し、80 mL の D M S O を添加し、約 25℃ の温度まで冷却し、いくつかの G P C 結晶で誘発する。これを 20℃ から 25℃ の間で 16 時間攪拌下で保持すると、この期間中、沈殿物の形成が観察され、ブフナー漏斗を通して結晶を濾過し、エタノールで洗浄する。真空下で乾燥させた後、8.7 g の G P C が得られる。

【0091】

HPLC-EELS D分析では、GPEが存在しないことが示された。

【0092】

実施例5（比較）

エタノールからの結晶化を使用した、GPC（GPEで汚染された）の精製

粘稠性流体の形態の11.2gのGPC（手順3により得られた）を、攪拌下、約45℃の温度で20mLのエタノールに溶解する。溶液を約5℃の温度まで冷却し、いくつかのGPC結晶で誘発する。これを0℃から5℃の間で3時間攪拌下で保持すると、この期間中、沈殿物の形成が観察され、ブフナー漏斗を通して結晶を濾過し、エタノールで洗浄する。真空下で乾燥させた後、3.4gのGPCが得られる。

10

【0093】

HPLC-EELS D分析では、0.02%（面積パーセントとして）に等しいGPE含量が示された。

【0094】

実施例6

DMSOからの結晶化を使用した、GPC（スクロースで汚染された）の精製

粘稠性流体の形態の11gのGPC（手順4により得られた）に、20mLのDMSOを添加し、混合物を攪拌下で約70℃の温度まで加温し、80mLのDMSOを添加し、約25℃の温度まで冷却すると、この期間中、沈殿物の形成が観察される。これを20℃から25℃の間で16時間攪拌下で保持し、ブフナー漏斗を通して結晶を濾過し、エタノールで洗浄する。真空下で乾燥させた後、7.8gのGPCが得られる。

20

【0095】

HPLC-EELS D分析では、スクロースが存在しないことが示された。

【0096】

実施例7（比較）

エタノールからの結晶化を使用した、GPC（スクロースで汚染された）の精製

粘稠性流体の形態の11.0gのGPC（手順4により得られた）を、攪拌下、約45℃の温度で20mLのエタノールに溶解する。溶液を約5℃の温度まで冷却し、いくつかのGPC結晶で誘発する。これを約5℃の温度まで冷却し、0℃から5℃の間で2.5時間攪拌下で保持すると、この期間中、沈殿物の形成が観察される。ブフナー漏斗を通して結晶を濾過し、エタノールで洗浄する。真空下で乾燥させた後、1.1gのGPCが得られる。

30

【0097】

HPLC-EELS D分析では、0.14%（面積パーセントとして）に等しいスクロース含量が示された。

【0098】

実施例8

HPLC-EELS DによるGPC分析法。

操作パラメータ：

HPLCカラム：YMC（商標）Polyamine II 250×4.6mm（5μm）

40

炉内温度：35℃

流量：0.7mL／分

溶離液相：相A：85%（アセトニトリル75%、メタノール25%）

15%（50mM酢酸アンモニウム緩衝液pH4.5）

相B：65%（アセトニトリル75%、メタノール25%）

35%（50mM酢酸アンモニウム緩衝液pH4.5）

勾配プログラム：

【0099】

【表 3】

分	A相%	B相%
0	98	2
5	98	2
27	2	98
32	2	98
33	98	2
45	98	2

10

【0100】

検出器 E L S D

検出器パラメータ：窒素流量 = 1.4 mL/分；温度 = 90℃；ゲイン = 1

試料調製：メタノール中約 20 mg/mL への GPC 試料の希釈。

注入容量：20～40 μL

備考：RT 約 5 分までに観察されるベースライン変動が、ブランクにおいて存在する（試料中に存在する物質に起因するものではない）。

【0101】

以下の表において、対象となる種の溶離に対する基準値が示されている。

20

【0102】

【表 4】

化学種	RT 保持時間	RRT GPCに対する相対保持時間
GPC	約16.2分	1
β-GPC	約15.3分	約0.94
GPE	約31.5分	約1.94
スクロース	約22.0分	約1.36

30

【0103】

この方法を使用して分析された不純物の検出限界（LOD）は、GPC に対して 0.01 % 未満である。

【0104】

実施例 9

³¹P-NMR による GPC 分析法

機器 NMR Varian VXR-200 または少なくとも同等の機器

試料調製 分析される 0.8 g の GPC を、0.8 mL の D₂O に溶解し、溶液を NMR 管に入れる

温度 周囲温度

40

取得数 400 以上

以下の表において、対象となる種の化学シフトに対する基準値が示されている。

【0105】

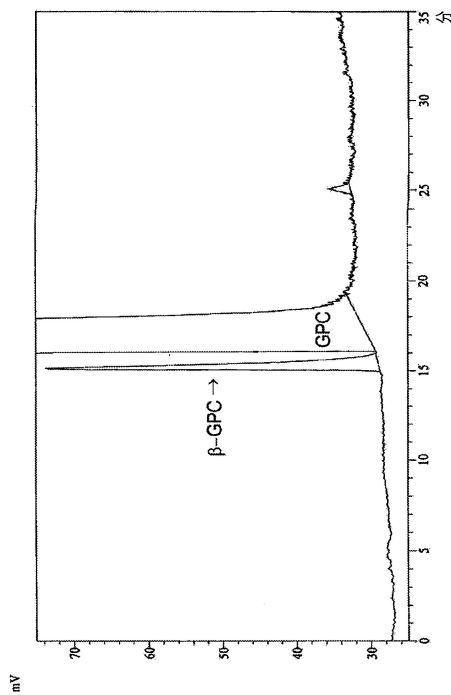
【表 5】

化学種	^{31}P -NMR化学シフト (ppm)
GPC	-0.1
β -GPC	-0.6
GPE	0.4
cGP	18.4

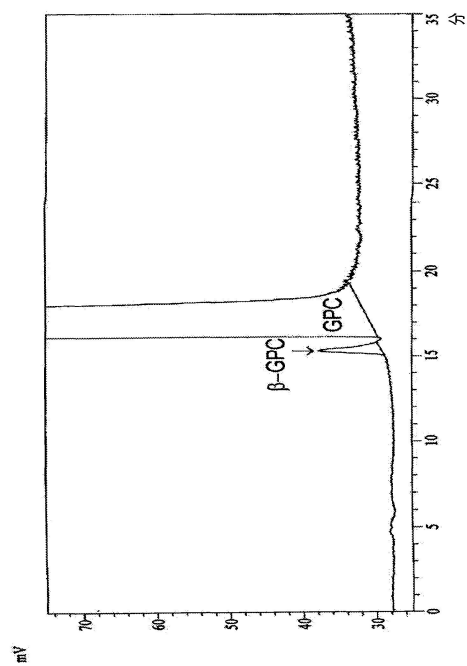
【0106】

この方法を使用して分析される不純物の検出限界 (LOD) は、GPCに対して0.0101%未満である。

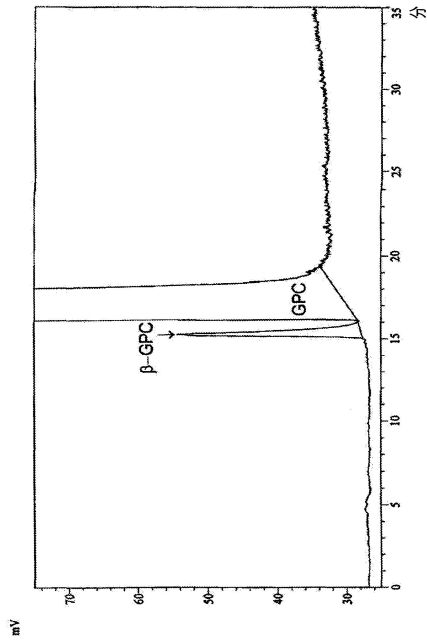
【図 1】



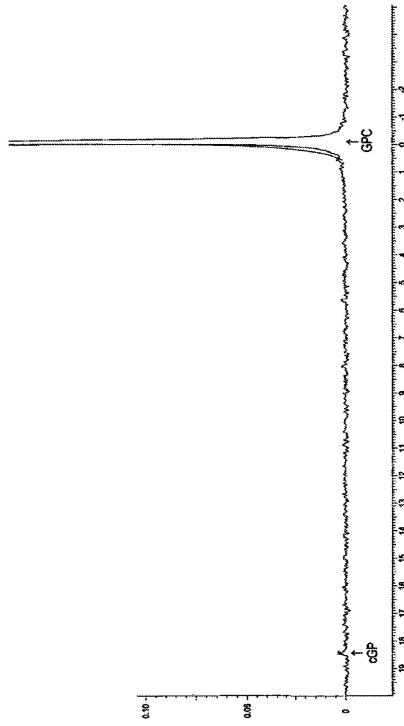
【図 2】



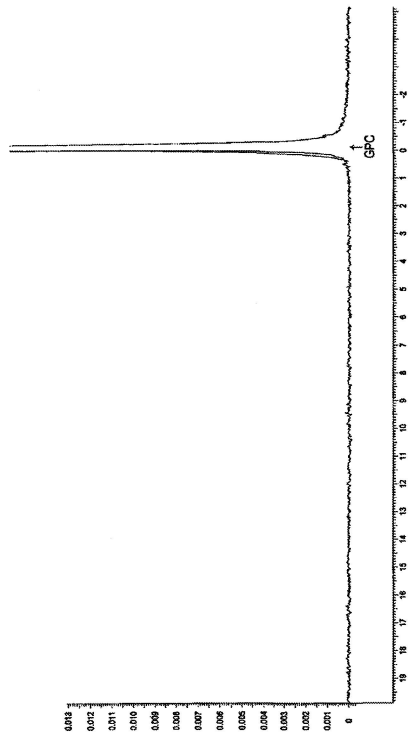
【図 3】



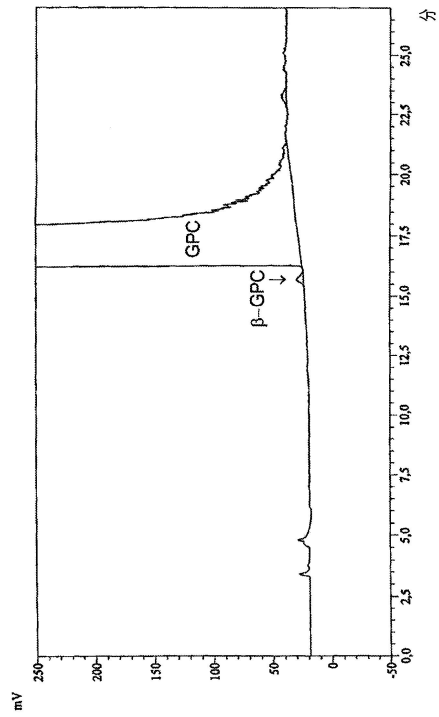
【図 4】



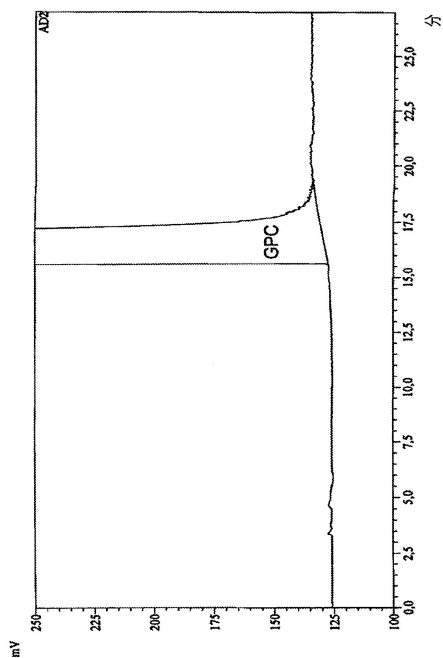
【図 5】



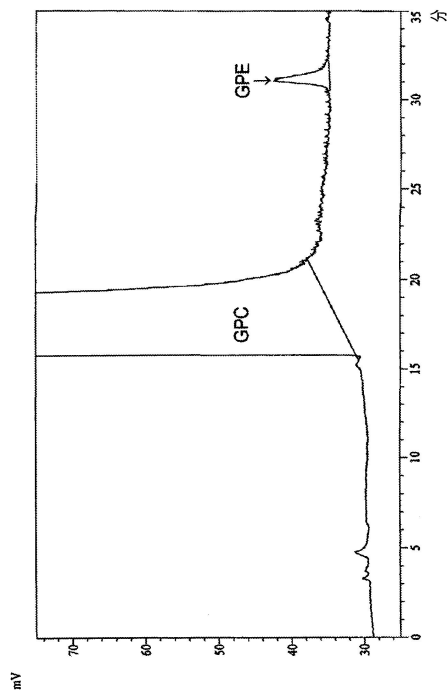
【図 6】



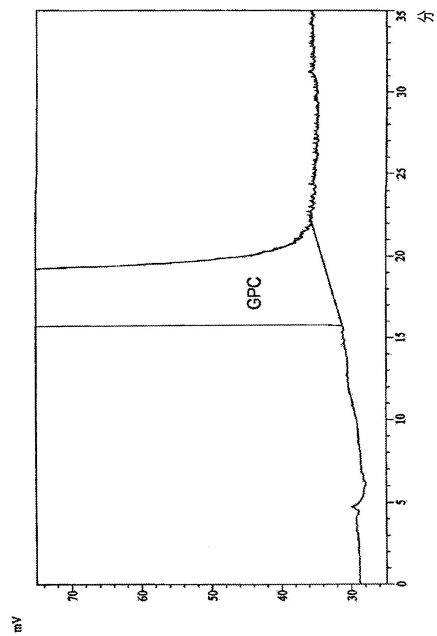
【図 7】



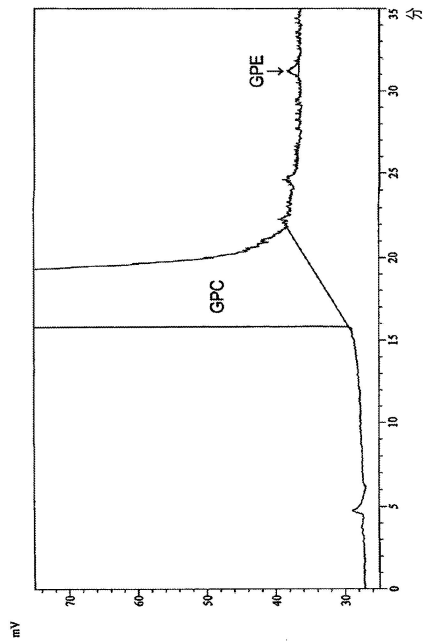
【図 8】



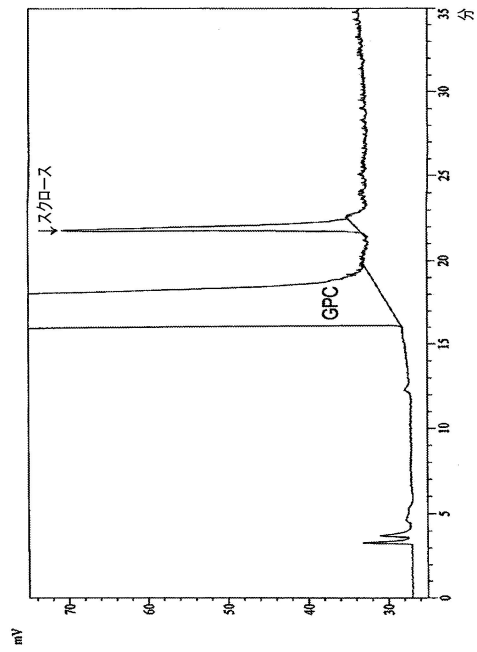
【図 9】



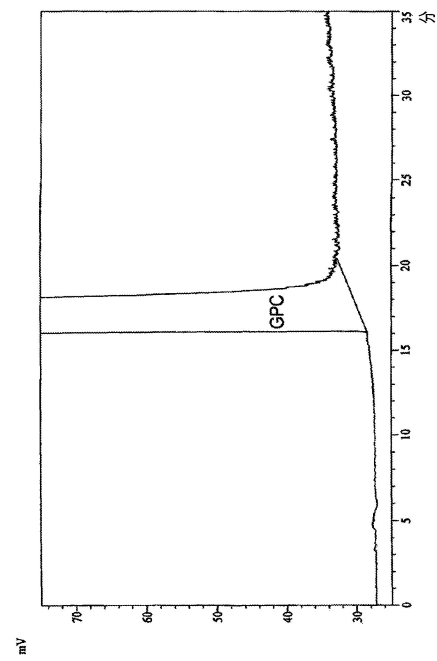
【図 10】



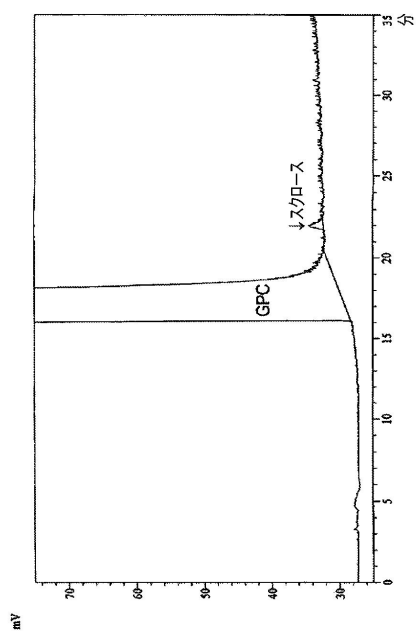
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



フロントページの続き

(72)発明者 マウリツィオ ゼノーニ
イタリア アイー03013 フェレンティーノ ヴィア クローチェ タニ フモーネ 127
/A

(72)発明者 ファブリツィオ コッキ
イタリア 00135 ローマ ヴィア デグリ オルティ デッラ ファルネシナ 120

審査官 安藤 倫世

(56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0244583 (US, A1)
中国特許出願公開第102093410 (CN, A)
特開昭61-158990 (JP, A)
KANGYI ZHANG, PURIFICATION OF L-ALPHA GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE BY COLUMN CHROMATOGRAPHY, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., 2011年12月, VOL:1220,, PAGE(S):108 - 114, URL, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.003>
社団法人日本化学会編, 第4版実験化学講座1 基本操作I, 丸善株式会社発行, 1996年 4月 5日, 第184-189頁
浅原 照三, 溶剤ハンドブック, 株式会社 講談社, 1985年, p.47-51
芦澤一英, 塩・結晶形の最適化と結晶化技術, Pharm Tech Japan, 2002年, Vol.18, No.10, p.81-96

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07F 9/00
CAplus/REGISTRY (STN)