

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6867409号
(P6867409)

(45) 発行日 令和3年4月28日(2021.4.28)

(24) 登録日 令和3年4月12日(2021.4.12)

(51) Int. Cl.		F I
CO7H 23/00	(2006.01)	CO7H 23/00
CO7H 1/06	(2006.01)	CO7H 1/06
BO1J 41/05	(2017.01)	BO1J 41/05
BO1J 47/02	(2017.01)	BO1J 47/02
BO1J 49/07	(2017.01)	BO1J 49/07

請求項の数 15 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-558675 (P2018-558675)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月30日(2017.3.30)
 (65) 公表番号 特表2019-521962 (P2019-521962A)
 (43) 公表日 令和1年8月8日(2019.8.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/057506
 (87) 国際公開番号 W02018/007035
 (87) 国際公開日 平成30年1月11日(2018.1.11)
 審査請求日 令和2年3月24日(2020.3.24)
 (31) 優先権主張番号 16178560.5
 (32) 優先日 平成28年7月8日(2016.7.8)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者 520029561
 ヘルステック バイオ アクティブズ、エ
 ス、エル、ユー
 スペイン王国 08029 バルセロナ、
 5、ダイアゴナル、549
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 サリャレス ロセル、フアン
 スペイン国 08173 バルセロナ、サ
 ンクガデルバリェス、ホアン ブス
 カリャ、10、インターキム、ソシエダッ
 ド アノニマ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メチルコバラミンの精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

シアン化鉄アニオンとの混合物からのメチルコバラミンの精製方法であって、メチルコバラミン及びシアン化鉄アニオンを含む溶液を強塩基性アニオン交換樹脂と接触させることを含むことを特徴とする上記方法。

【請求項2】

強塩基性アニオン交換樹脂がトリアルキルアンモニウム官能基を有し、塩化物アニオンを交換することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

樹脂が、架橋ポリスチレン-ジビニルベンゼン樹脂及び架橋アクリル-ジビニルベンゼン樹脂から選択されることを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

樹脂が、マクロ網状構造を有する架橋アクリル-ジビニルベンゼン樹脂であることを特徴とする、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

メチルコバラミン及びシアン化鉄アニオンを含む溶液を強塩基性アニオン交換樹脂と接触させるプロセスが、溶液を有効量の樹脂に2～6時間の時間にわたって通過させることによって実施されることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

樹脂：メチルコバラミンの重量比が0.1：1～2：1であることを特徴とする、請求

項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

樹脂：メチルコバラミンの重量比が 0.5 : 1 であることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

溶液中で使用される溶媒が水、及び、水と水混和性有機共溶媒との混合物から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

溶媒が、水と水混和性有機共溶媒との混合物であることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

溶媒が、水とアセトンとの混合物であることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

水：有機共溶媒の体積比が、1.8 : 1 ~ 1 : 1.5 であることを特徴とする、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】

樹脂で処理した後に回収した溶液からメチルコバラミンを結晶化させることを特徴とする、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

精製プロセスに供される溶液が、シアン化鉄不純物を含むメチルコバラミンを溶媒で処理し、30 ~ 60 の温度に加熱し、不溶性不純物を除去するために濾過することにより調製される、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 14】

精製されるメチルコバラミンが、シアン化物スカベンジャーとしての鉄(II)塩及び場合により鉄(III)塩の存在下でのシアノコバラミンの還元的メチル化によって得られることを特徴とする、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

得られたメチルコバラミンが 130 ppm 未満の鉄含有量を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本願は 2016 年 7 月 8 日に出願された欧州特許出願 E P 1 6 1 7 8 5 6 0 . 5 の利益を主張する。

本発明は、ビタミン B₁₂ の補酵素形態の 1 つであるメチルコバラミンの精製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

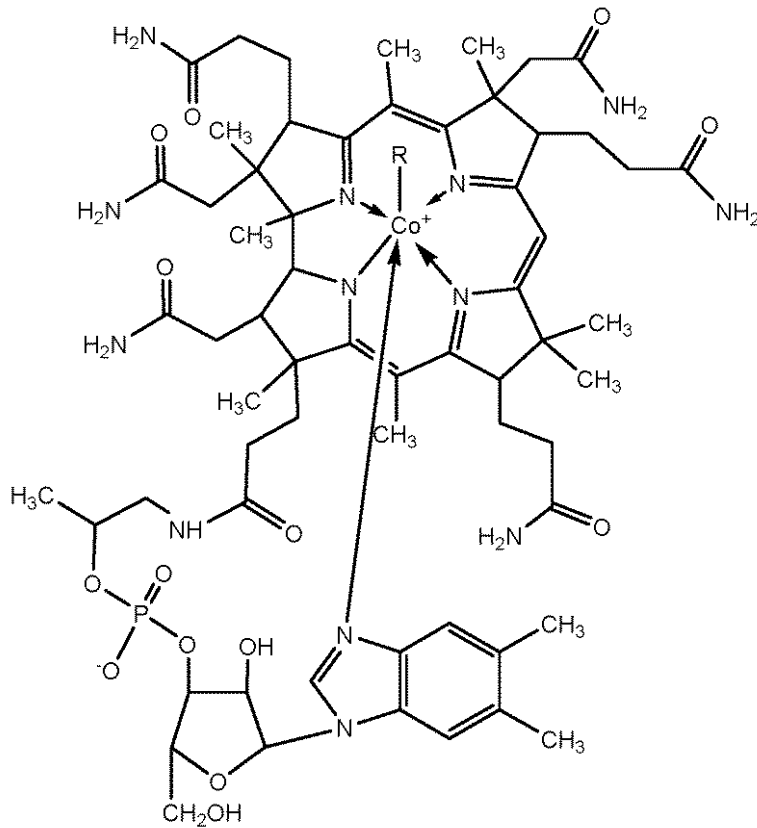
コバラミンは、密接に関連し相互変換可能なコバルト配位化合物のグループであり、通常は集合的にビタミン B₁₂ と呼ばれる。

40

【0003】

コバラミンは、中心のコバルト原子を含む平面テトラピロール環(コリン環)を共有するコリノイドのファミリーに属し、(I)、(II)又は(III)の酸化状態をとることができる。さらに、コバラミンは、以下の構造で表されるように、上側(ベータ)及び下側(アルファ)軸方向の配位子を有する：

【化1】



10

20

【0004】

下部配位子（アルファ）は、アミド結合を介してコリン環に連結されたヌクレオチドのジメチルベンズイミダゾール基である。天然に存在するコバラミンにおいて、ベータリガンド（R）はシアノコバラミン、ヒドロキシコバラミン、メチルコバラミン、及び5'-デオキシアデノシルコバラミンをそれぞれ生じるシアノ、ヒドロキシ、メチル又は5'-

30

【0005】

コバラミンの中でも、メチルコバラミン及び5'-デオキシアデノシルコバラミンは、生物における代謝反応にとって、すなわち酵素メチオニンシンターゼ及びメチルマロニル-CoAターゼによって触媒される反応において補酵素として機能する活性型であり、例えば赤血球形成、神経機能及びDNA合成に関連する。その結果、ビタミンB₁₂欠乏症は、巨赤芽球貧血、疲労、衰弱、便秘、食欲不振、体重減少、及び神経障害などのいくつかの病状に関連する。そのような欠乏状態では、コバラミンの投与が指示される。

【0006】

特に、メチルコバラミンは、ビタミンB₁₂欠乏に関連するいくつかの障害を治療するための、例えば、末梢神経障害又は巨赤芽球貧血を治療するための療法において、うまく使用される。

40

【0007】

従って、工業的に効率的で、高純度の製品を提供するのに適しており、規制保健機関の要件を満たすコバラミン、特にメチルコバラミンを製造するための工業的方法が必要である。

【0008】

メチルコバラミンは、シアノコバラミンを還元剤及びメチル化剤で処理することを含む還元的メチル化プロセスによって、シアノコバラミンから一般に得られる。しかしながら

50

、このような方法では、還元反応中にシアノコバラミンから放出されるシアン化物アニオンが、メチル化剤と競合するコバラミン (I) 又はビタミン B₁₂ として知られる還元型のコバラミンに再び結合する傾向があり、プロセスの全反応収率を低下させてしまう。

【 0 0 0 9 】

この欠点に向い合うべく、この反応が、シアン化物スカベンジャーとして作用することができる試薬の存在下で、すなわち反応媒体中に存在するシアン化物アニオンと錯体形成し、したがってメチル化プロセスとの干渉を避けることによって、有利に行うことができることが、当業界で提案されてきた。このプロセスに適したシアン化物スカベンジャーの中には、いくつかの金属塩、特に鉄 (I I) 塩が開示されている。

【 0 0 1 0 】

このように、日本特許 J P 4 5 0 3 8 0 5 9 B 1 には、シアノコバラミンを、還元剤として水素化ホウ素ナトリウムで処理し、シアン化物スカベンジャーとして硫酸第一鉄七水和物を添加し、メチル化剤としてヨウ化メチルを使用することによるメチルコバラミンの製造が開示されている。得られた反応生成物を、一連のフェノール抽出により及びカラムクロマトグラフィーにより精製する。

【 0 0 1 1 】

同様に、米国特許第 3 7 9 8 2 1 1 号には、シアノコバラミン、特に銅 (I I) 塩及び鉄 (I I) 塩の還元的アルキル化反応のためのシアン化物錯化剤としていくつかの金属塩が提案されている。このように、シアン化物錯化剤として硫酸第一鉄を使用し、メチル化剤としてメチルトルエン - p - スルホネートを使用するシアン化コバラミンからのメチルコバラミンの製造が開示されている。得られた生成物はカラムクロマトグラフィーで精製する。

【 0 0 1 2 】

I s h i y a m a らの論文、New preparation method of methylcobalamin (メチルコバラミンの新規調製法)、Meiji Seika Keneku Nenpo (明治製菓研究年報)、1996、35:51-54) にも、シアノコバラミンからのメチルコバラミンの製造が開示されており、酸素濃度を 0.1 ppm 未満に維持する厳密な無酸素条件で、還元剤及びメチル化剤としてそれぞれ水素化ホウ素ナトリウム及びヨウ化メチルを使用し、シアン化物スカベンジャーとして鉄 (I I) 及び鉄 (I I I) 塩の混合物、すなわち硫酸アンモニウム鉄 (I I) (モル塩) 及び塩化鉄 (I I I) を用いて反応を行う。このようにして得られたメチルコバラミンは、一連の結晶化によって、又はジビニルベンゼン - スチレンコポリマーを用いたカラムクロマトグラフィーによって精製される。

【 0 0 1 3 】

欧州特許出願 E P 1 2 3 6 7 3 7 A 1 は、メチル化剤としてハロゲン化トリメチルスルホキソニウム塩又はハロゲン化トリメチルスルホニウム塩を使用し、シアン化物捕捉剤として硫酸鉄 (I I) 七水和物及び/又は塩化コバルト (I I) 六水和物を使用するシアノコバラミンの還元的メチル化によるメチルコバラミンの製造を開示する。

【 0 0 1 4 】

上記ストラテジーの 1 つの不都合な点は、還元的メチル化プロセスの性能を改善するのに有効な鉄塩が、最終医薬物質中に、そしてその結果として最終医薬品中に鉄残基を導く可能性があることである。

【 0 0 1 5 】

特に、鉄塩と反応媒体中に存在するシアン化物アニオンとの錯体化によって形成されたシアン化鉄アニオンの除去は困難であることが判明しており、金属残留物に対する規制当局の推奨範囲内の鉄含有量を有するメチルコバラミンを得ることを困難にしている。例えば、欧州医薬品庁 (European Medicines Agency) は、医薬物質における金属触媒又は金属試薬の使用に起因する金属の最大許容濃度限界を推奨している (E M E A / C H M P / S W P / 4 4 4 6 / 2 0 0 0) 。

【 0 0 1 6 】

10

20

30

40

50

従来、メチルコバラミンを製造するための当該技術分野で開示されている方法は、工業的使用にはあまり適していないと一般に見なされる、液体クロマトグラフィー分離を通常含む煩雑な精製工程を必要とする。さらに、現状の技術水準の文献は、鉄含有量を許容可能なレベルまで低減するという問題に特に直面すらしていないのである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

したがって、メチルコバラミンとの混合物からシアン化鉄アニオンを簡単かつ効果的に除去する、工業的用途に適した、改良された精製方法が当業界において必要であり、従って規制当局により許容し得るレベルの鉄を有するメチルコバラミンの費用効果的な製造を可能にする。

10

【0018】

本発明の目的は、メチルコバラミンの精製方法である。

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明の目的は、メチルコバラミン及びシアン化鉄アニオンを含む溶液を強塩基性アニオン交換樹脂と接触させることを含むことを特徴とする、シアン化鉄アニオンとの混合物からのメチルコバラミンの精製方法である。

【0020】

本発明者らは、驚くべきことに、容易に工業的に実施することができ、鉄含有量を低減したメチルコバラミンを提供することができる単純なプロセスを用いてメチルコバラミン溶液中に存在する痕跡量のシアン化鉄アニオンを効率的に除去することを可能にする、強塩基性アニオン交換樹脂での処理に基づくメチルコバラミンの新しい精製方法を開発した。

20

【発明を実施するための形態】

【0021】

この方法は、シアノコバラミンの還元的メチル化により得られるメチルコバラミンからシアン化鉄不純物を除去するために有利に使用することができ、シアン化物スカベンジャーとして鉄(II)塩を使用して鉄含有量を低減したメチルコバラミンを提供するものである。

30

【0022】

本明細書で使用される場合、文脈上他に明示されていない限り、「a」、「an」又は「the」に続く単数形は、複数形も含むことが意図される。本明細書で使用される近似的な用語は、記載された値の一定の変動、すなわち $\pm 10\%$ 、好ましくは $\pm 5\%$ が許容されることを示す。

【0023】

強塩基性アニオン交換樹脂

当該技術分野において周知のアニオン交換樹脂は、それらと接触する溶液中で他のアニオンと交換されることができるアニオンを含有する不溶性ポリマーマトリックスである。

【0024】

40

強塩基性アニオン交換樹脂は、本発明において使用されるもののよう、交換されるアニオンが、樹脂のポリマーマトリックスに結合した第四級アンモニウム基、典型的にはトリメチルアンモニウムのようなトリアルキルアンモニウム基又はジアルキル2-ヒドロキシエチルアンモニウム基、の対イオンである、特定のタイプのアニオン交換樹脂である。好ましくは、樹脂はトリアルキルアンモニウム官能基、より好ましくはトリメチルアンモニウム基を有する。

【0025】

交換される対イオンは、一般に塩化物又は水酸化物アニオンである。好ましくは、対イオンは塩化物アニオンである。

【0026】

50

樹脂のポリマーマトリックスは、すなわち、架橋剤としてスチレン及びジビニルベンゼンから調製された、架橋ポリスチレン - ジビニルベンゼンポリマーであってもよく；又は、例えば、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリレート、エチレングリコールジビニルエーテル又はジエチレングリコールジビニルエーテルと架橋した、アクリル酸、メタクリル酸、又はアクリル酸若しくはメタクリル酸のエステル、例えばメチル、エチル又はプロピルエステルから調製された、架橋アクリルポリマーであってもよい。

【0027】

本発明の一実施形態では、樹脂は、架橋ポリスチレン - ジビニルベンゼン樹脂及び架橋アクリル - ジビニルベンゼン樹脂から選択される。好ましい態様において、樹脂は架橋アクリル - ジビニルベンゼン樹脂である。

10

【0028】

樹脂は一般にビーズの形態で入手可能である。その多孔度によれば、樹脂は微孔性（ゲルタイプ）又はマクロ多孔性（マクロ網状）であり得る。好ましくは、樹脂はマクロ網状構造を有する。

【0029】

好ましい実施形態では、強塩基性アニオン交換樹脂は、トリアルキルアンモニウム官能基及び相互交換塩化物アニオンを有する樹脂である。より好ましくは、樹脂はマクロ網状構造を有する架橋アクリル - ジビニルベンゼン樹脂である。

【0030】

本発明の方法で使用するのに適した多くの強塩基性アニオン交換樹脂が市販されており、例えば、とりわけ、Amberlite（登録商標）IRA458RF Cl、Amberlite（登録商標）IRA900 Cl、Amberlite（登録商標）IRA958 Cl、Diaion（登録商標）SA10A（Cl）、Diaion（登録商標）HPA25（Cl）、Dowex（登録商標）Marathon A、Dowex（登録商標）Marathon MSA、Lewatit（登録商標）MonoPlus MP500、Lewatit（登録商標）MonoPlus MP800、又はPurolite社の強塩基性アニオン交換樹脂、例えばPurolite（登録商標）A200又はPurolite（登録商標）A500シリーズ、等がある。

20

【0031】

市販の樹脂Amberlite（登録商標）IRA958 Clが特に好ましい。これは、架橋アクリルポリマーマトリックス中に第四級アンモニウム官能基を有し、塩化物アニオンを交換する、マクロ網状の強塩基性アニオン交換樹脂である。

30

【0032】

精製方法

本発明による精製方法は、シアン化物スカベンジャーとして鉄（II）塩が使用されるシアノコバラミンの還元的メチル化によって得られるメチルコバラミンからシアン化鉄不純物を除去するために有利に使用することができる。

【0033】

この精製方法は、不溶性のシアン化鉄塩を濾別することによりこの方法で形成されたシアン化鉄の大部分を除去した後でさえ、メチルコバラミンの不純物として依然として残っている残留量、すなわち痕跡量のシアン化鉄アニオンを除去するのに特に有用である。

40

【0034】

これに限定されるものではないが、樹脂による処理により本発明の方法で除去されるメチルコバラミンに含まれる残留シアン化鉄不純物の量は、一般に6000 ppm未満の鉄、好ましくは5000 ppm未満の鉄、より好ましくは4000 ppm未満の鉄、さらにより好ましくは1600 ppm未満の鉄に相当する。

【0035】

メチルコバラミン及びシアン化鉄アニオンを含む溶液を強塩基性アニオン交換樹脂と接触させるプロセスは、好ましくは、溶液を有効量の樹脂に通すことによって行われる。

【0036】

50

典型的には、カラムに適切な量の樹脂を充填し、メチルコバラミン及びシアン化鉄アニオンを含む溶液を、ダウンフロー又はアップフローのいずれかでカラムに通過させ、続いて得られた溶液を回収する。好ましい実施形態では、溶液はアップフローで通過させる。

【0037】

溶液は、一定時間、一般に2～6時間、より好ましくは3～4時間で樹脂を通過させる。

【0038】

強塩基性アニオン交換樹脂は、樹脂：メチルコバラミンの重量比が一般に0.1：1～2：1、より好ましくは0.3：1～1：1で使用される。

10

【0039】

特に好ましい実施形態では、樹脂：メチルコバラミンの重量比は約0.5：1である。

【0040】

好ましくは、樹脂に溶液を通過させた後、ある量の溶媒のみを引き続き樹脂に通して、樹脂中に残留し得るメチルコバラミンを回収する。

【0041】

強塩基性アニオン交換樹脂で処理することにより、溶液中に存在するシアン化鉄アニオンは樹脂によって保持されるが、樹脂の対イオン、典型的には塩化物アニオンが放出される。

【0042】

20

本発明の意味において、シアン化鉄アニオンは、シアン化物とのアニオン性鉄(II)錯体又は鉄(III)錯体を意味する。典型的には、シアン化鉄アニオンには、ヘキサシアノ鉄(II)アニオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)としても知られているフェロシアン化物アニオン、及びヘキサシアノ鉄(III)アニオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$)としても知られているフェリシアン化物アニオンがある。メチルコバラミンの不純物として存在するシアン化鉄アニオンは、異なるシアン化鉄錯体の混合物であってもよい。

【0043】

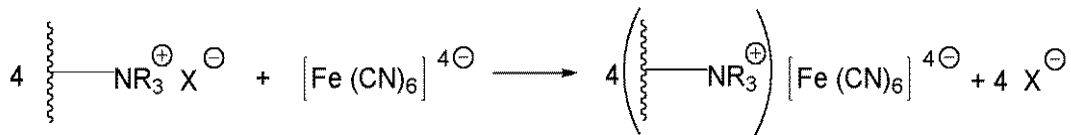
特定の理論に縛られることを望むわけではないが、メチルコバラミンがシアン化物スカベンジャーとして $\text{Fe}(\text{II})$ を使用するシアノコバラミンの還元的メチル化プロセスの結果である場合、フェロシアン化物アニオンはその中に含まれるシアン化鉄不純物の主要部分であると考えられる。

30

【0044】

アニオン交換樹脂とフェロシアン化物アニオンとの間で起こるアニオン交換は、以下のように表すことができる：

【化2】



【0045】

40

驚くべきことに、それ自体がシアン化鉄アニオンと相互作用し得る溶液中のメチルコバラミンのような大きな配位化合物の存在にもかかわらず、樹脂対イオンとシアン化鉄アニオンとの間のアニオン交換が効果的に行われ、鉄含有量の低減したメチルコバラミン溶液が得られることが見出された。

【0046】

実施例3に示すように、シアン化物スカベンジャーとして鉄塩を用いるシアノコバラミンの還元的メチル化により得られたメチルコバラミンは、本発明の方法を用いてシアン化鉄不純物から効果的に分離することができ、130ppm未満、すなわち71ppm又は30ppm未満の鉄を含むメチルコバラミンが得られるが、強塩基性アニオン交換樹脂を使用せずに同じプロセスを実施した場合、メチルコバラミン中の鉄のレベルは494又は

50

1594 ppmよりはるかに高かった。

【0047】

使用時には、より多くのシアン化鉄アニオンがアニオン交換樹脂の中に残るので、アニオン交換樹脂はアニオン交換の能力を徐々に失う。使用された樹脂は、樹脂対イオンの塩の水溶液、好ましくは塩化物塩の水溶液、より好ましくは塩化ナトリウムの水溶液で再生することができる。

【0048】

メチルコバラミン及びシアン化鉄アニオンが溶解されている精製プロセスを実施するために使用される溶媒は、水又は水と水混和性有機共溶媒との混合物とすることができる。適切な有機共溶媒としては、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール又はtert-ブタノール等のアルコール；アセトン又は2-ブタノン等のケトン；1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン、ジグリム等のエーテル類；及びそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0049】

好ましい態様において、溶媒は、水と水混和性有機共溶媒、好ましくは水と、アルコール、ケトン及びそれらの混合物から選択される水混和性共溶媒との混合物である。より好ましくは、溶媒は水と水混和性ケトンの混合物であり、さらにより好ましくは水とアセトンの混合物である。

【0050】

水：有機溶媒の体積比は、一般に1.8：1～1：1.5の間、好ましくは1.5：1～1：1.2の間、より好ましくは1.1：1～1：1.1の間に含まれる。

20

【0051】

特に好ましい実施形態では、溶媒は、約1：1の体積比の水とアセトンとの混合物である。

【0052】

アニオン交換樹脂と接触するメチルコバラミン及びシアン化鉄不純物を含む溶液は、一般に30～150 g/L、好ましくは40～100 g/L、より好ましくは50～75 g/Lの濃度のメチルコバラミンを含む。

【0053】

アニオン交換樹脂での処理を行った後、一般に溶液にケトン溶媒を添加し、好ましくは溶液にアセトンを添加して、溶液からメチルコバラミンを結晶化又は沈殿させることによりメチルコバラミンを単離することができる。

30

【0054】

本発明の好ましい実施態様では、精製方法に供される溶液は、シアン化鉄不純物を含む粗メチルコバラミンを溶媒で処理し、30～60、好ましくは40～50、より好ましくは約45の温度に、一般に15～60分の時間にわたって加熱することによって調製される。本発明の方法によって、このようにして得られた懸濁液を一般的には濾過して不溶性不純物、例えば不溶性のシアン化鉄塩を除去し、次いで、残留シアン化鉄アニオンを依然として含む過溶液を強塩基性アニオン交換樹脂と接触させる。

【0055】

したがって、本発明の特に好ましい実施形態において、メチルコバラミンの精製は、以下のステップを含む：

40

シアン化鉄不純物を含むメチルコバラミンを溶媒で処理し、30～60の温度に加熱し、ろ過して不溶性のシアン化鉄塩を除去する；

メチルコバラミン及びシアン化鉄アニオンを含む、先の工程で得られた溶液を強塩基性アニオン交換樹脂と接触させる；そして

溶液から結晶化又は沈殿させることによりメチルコバラミンを単離する。

これらのステップのそれぞれについての好ましい条件は先に開示した通りである。

【0056】

本発明の方法を実施した後に得られるメチルコバラミンは、鉄含有量が減少しており、

50

すなわち鉄の量が130ppm未満、好ましくは90ppm未満、さらにより好ましくは80ppm未満、さらにより好ましくは70ppm未満の鉄である。

【0057】

鉄の量の測定は、例えば、誘導結合プラズマ発光分析(ICP/OES)によって行うことができる。

【0058】

従って、強塩基性アニオン交換樹脂の使用を含む本発明の方法は、メチルコバラミンからの残留シアン化鉄アニオンの効率的な除去を可能にすることは明らかである。

【0059】

次に、本発明の別の態様は、メチルコバラミンからシアン化鉄アニオンを除去するための強塩基性アニオン交換樹脂の使用である。

【0060】

メチルコバラミン

本発明の方法により精製されやすいシアン化鉄不純物を含有するメチルコバラミンは、典型的には、シアン化物スカベンジャーとして鉄(II)塩及び任意に鉄(III)塩の存在下で行われるシアノコバラミンの還元的メチル化反応の結果物である。

【0061】

シアノコバラミンの還元的メチル化は、典型的にはシアノコバラミンを還元剤及びメチル化剤で処理することによって実施される。

【0062】

出発物質であるシアノコバラミン(CAS番号68-19-9)は、いくつかの供給元から市販されている。

【0063】

還元剤は、シアノコバラミンのコバルトをCo(III)からCo(I)に還元することができる任意の試薬であり得る。適切な還元剤は、例えば水素化ホウ素アルカリ金属塩である。好ましい還元剤は、水素化ホウ素ナトリウムである。

【0064】

還元剤の量は、特に限定されないが、シアノコバラミンに対して一般に5~30当量、好ましくは10~20当量である。

【0065】

例えば、臭化トリメチルスルホニウム、塩化トリメチルスルホニウム、メチル硫酸トリメチルスルホニウム、塩化トリメチルスルホキシニウム、ヨウ化トリメチルスルホキシニウム、臭化トリメチルスルホキシニウム、炭酸ジメチル、硫酸ジメチル、塩化テトラメチルアンモニウム又はヨウ化メチルなどの任意の適切なメチル化剤を使用することができる。好ましくは、メチル化剤は、臭化トリメチルスルホニウム、塩化トリメチルスルホニウム、塩化トリメチルスルホキシニウム、ヨウ化トリメチルスルホキシニウム、臭化トリメチルスルホキシニウム及び炭酸ジメチルからなる群から選択される。

【0066】

使用されるメチル化剤の量は、シアノコバラミンに対して一般に1~10当量、好ましくは2~5当量である。

【0067】

還元的メチル化反応は、場合により水混和性有機共溶媒と組み合わせて、水性媒体中で行われる。適切な共溶媒は、例えば、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール又はtert-ブタノール等のアルコール；アセトン又は2-ブタノン等のケトン；1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン又はジグリム等のエーテル；ジメチルホルムアミド又はジメチルアセトアミド等のアミド；及びそれらの混合物である。共溶媒として、好ましくはアルコール又はケトンが使用される。

【0068】

反応は、好ましくはわずかに塩基性のpH、例えば7.5~8.5で、5~60の範囲の温度、好ましくは20~40の範囲の温度で行われる。

10

20

30

40

50

【0069】

シアン化物スカベンジャーとして、鉄(II)塩、例えば硫酸鉄(II)、塩化鉄(II)又は硫酸アンモニウム鉄(II)(モール塩)を反応に添加する。還元反応で放出されたシアン化物イオンは、鉄(II)カチオンによって錯化されて、アニオン性シアン化鉄(II)錯体、例えばフェロシアン化物錯体 $[Fe(CN)_6]^{4-}$ を形成し、こうしてそれらがメチル化プロセスと干渉するのを防いでくれる。

【0070】

鉄(II)塩は、シアノコバラミンに対して一般に0.5~1.5当量の量で使用され、好ましくはシアノコバラミンに対して約1当量の鉄(II)塩が使用される。

【0071】

好ましくは、鉄(III)塩も添加され、典型的にはフェロシアン化物アニオンと不溶性の塩を形成し、濾過によるそれらの簡単な除去を可能にする。

【0072】

反応は、一般に、シアノコバラミン、鉄(II)塩、及び場合により鉄(III)塩を溶解し、還元剤及びメチル化剤を順次又は同時に加えることによって行われる。

【0073】

シアノコバラミン及びメチルコバラミン溶液は光酸化に感受性であることが知られているので、還元的メチル化プロセスは、好ましくは不活性雰囲気下で、例えば窒素のような不活性ガスの流れの下で、光の不在下で、赤色光下で行われる。

【0074】

還元的メチル化反応の後、メチルコバラミンは一般に、反応媒体を冷却し、典型的にはさらなる有機溶媒をも添加し、粗メチルコバラミンを濾過することによって、反応混合物から沈殿する。

【0075】

このようにして得られた粗メチルコバラミンは、シアン化鉄アニオンを含む塩を含有し、次いで本発明の方法を用いて精製することができるので、上記のように適切な溶媒で処理することにより溶液にする。

【0076】

以下の実施例は、説明のために提供され、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0077】

実施例1：本発明による精製方法

a) シアノコバラミンの還元的メチル化

メチルエチルケトン10L及び脱イオン水260L中の、シアノコバラミン20Kg、硫酸鉄(II)七水和物0.68Kg及び塩化鉄(III)の30%水溶液1.77Kgの攪拌混合物に、30~40℃で、不活性雰囲気及び赤色光中で、水素化ホウ素ナトリウム8Kg及び40Lの脱イオン水中の水酸化ナトリウム水溶液0.16Kg、及びメチルエチルケトン14Lの溶液を、3時間にわたって同時に添加した。同じ温度で30分間攪拌した後、脱イオン水40L中の臭化トリメチルスルホキシニウム7.5kgの溶液を1時間かけて添加した。同じ温度で3時間攪拌した後、混合物を10℃に冷却し、15Lのメチルエチルケトンを加え、混合物を同じ温度で12時間攪拌した。沈殿した生成物を濾過し、100Lのメチルエチルケトン及び100Lのアセトンで洗浄した。

【0078】

b) メチルコバラミンの精製

プロセスa)により得られた粗メチルコバラミンを300Lの50%アセトン水溶液で処理し、45℃で30分間加温し、濾過した。次いで、この溶液を逆流系でAmbertite(登録商標)IRA958C1樹脂10kgに4時間かけて通した。その後、カラムを100Lの50%アセトン水溶液で逆洗した。回収した溶液を希塩酸でpH6.5に調整した。次いでアセトン950Lを滴加し、12時間攪拌した。結晶化した生成物を濾

10

20

30

40

50

過し、乾燥して18.0Kg(収率83.5%、HPLC=87.9%)を得た。

【0079】

メチルコバラミン中の鉄不純物の含有量は、誘導結合プラズマ/発光分光分析(ICP/OES)によって測定して、30ppm未満であった。(バッチA)

【0080】

メチルコバラミンの第2のバッチ(バッチB)及び第3のバッチ(バッチC)を、上記で開示したのと同じプロセスa)及びb)に従って調製した。メチルコバラミンはそれぞれ84.4%及び87.9%の収率で得られ、鉄含有量はそれぞれ71ppm及び30ppm未満であった。

【0081】

実施例2：比較例

メチルエチルケトン10L及び脱イオン水260L中の、シアノコバラミン20Kg、硫酸鉄(II)七水和物0.68Kg及び塩化鉄(III)の30%水溶液1.77Kgの攪拌混合物に、30~40℃で、不活性雰囲気及び赤色光中で、水素化ホウ素ナトリウム8Kg及び40Lの脱イオン水中の水酸化ナトリウム水溶液0.16Kg、及びメチルエチルケトン14Lの溶液を、3時間にわたって同時に添加した。同じ温度で30分間攪拌した後、脱イオン水40L中の臭化トリメチルスルホキソニウム7.5kgの溶液を1時間かけて添加した。同じ温度で3時間攪拌した後、混合物を10℃に冷却し、15Lのメチルエチルケトンを加え、混合物を同じ温度で12時間攪拌した。沈殿した生成物を濾過し、100Lのメチルエチルケトン及び100Lのアセトンで洗浄した。固体を260Lの50%アセトン水溶液で処理し、45℃で30分間加温し、濾過した。溶液を20℃に冷却し、希塩酸でpHを6.5に調整した。950Lのアセトンを滴加し、12時間攪拌した。結晶化した生成物を濾過し、乾燥して17.8kg(収率84.3%、HPLC=98.9%)を得た。

【0082】

メチルコバラミン中の鉄不純物の含有量は、誘導結合プラズマ/発光分光分析(ICP/OES)によって測定して、494ppmであった。(バッチ1)

【0083】

メチルコバラミンの第2のバッチ(バッチ2)を上記で開示したのと同じ方法に従って調製した。メチルコバラミンが86.7%の収率で得られ、鉄含有量が1594ppmであった。

【0084】

例3：鉄含有量の比較

以下の表は、鉄(II)の存在下で還元的メチル化の後に得られたメチルコバラミンを精製するための本発明の方法を用いて得られたメチルコバラミンの鉄含量(実施例1、バッチA、B及びC)と、類似の方法で調製したが、本発明の精製方法を使用しないメチルコバラミンの鉄含量(比較例、バッチ1及び2)の比較を示す：

【0085】

【表1】

例	収率 (%)	Fe (ppm)
実施例1 (バッチA)	83.5	<30
実施例1 (バッチB)	84.4	71
実施例1 (バッチC)	87.9	<30
比較例 (バッチ1)	84.3	494
比較例 (バッチ2)	86.7	1594

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
B 0 1 J	47/14	(2017.01)	B 0 1 J 47/14
B 0 1 J	49/57	(2017.01)	B 0 1 J 49/57
A 6 1 K	31/714	(2006.01)	A 6 1 K 31/714
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/02
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 P 3/02 1 0 4

(72)発明者 マルキリヤス オロンドリツ、フランシスコ
 スペイン国 0 8 1 7 3 バルセロナ、サン クガ デル バリエス、ホアン ブスカリヤ、1 0
 、インターキム、ソシエダッド アノニマ

審査官 高森 ひとみ

(56)参考文献 英国特許出願公開第0 1 3 0 6 9 5 8 (G B , A)
 国際公開第0 2 / 0 9 8 8 9 6 (W O , A 1)
 国際公開第2 0 0 1 / 0 4 2 2 7 1 (W O , A 1)
 特公昭4 9 - 0 1 7 2 8 0 (J P , B 1)
 特開昭5 0 - 0 4 1 9 0 0 (J P , A)
 特公昭4 5 - 0 3 8 0 5 9 (J P , B 1)
 特公昭5 1 - 0 0 0 1 2 0 (J P , B 1)
 特開昭6 2 - 0 5 6 4 9 1 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 7 H
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)