

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4177665号  
(P4177665)

(45) 発行日 平成20年11月5日(2008.11.5)

(24) 登録日 平成20年8月29日(2008.8.29)

(51) Int.Cl.

F 1

**C07D 305/14** (2006.01)  
 A 61 K 31/337 (2006.01)  
 A 61 P 35/00 (2006.01)

C 07 D 305/14  
 A 61 K 31/337  
 A 61 P 35/00

請求項の数 14 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2002-546532 (P2002-546532)  
 (86) (22) 出願日 平成13年11月9日 (2001.11.9)  
 (65) 公表番号 特表2004-514715 (P2004-514715A)  
 (43) 公表日 平成16年5月20日 (2004.5.20)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2001/012982  
 (87) 國際公開番号 WO2002/044162  
 (87) 國際公開日 平成14年6月6日 (2002.6.6)  
 審査請求日 平成16年11月9日 (2004.11.9)  
 (31) 優先権主張番号 09/724,504  
 (32) 優先日 平成12年11月28日 (2000.11.28)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 591092198  
 インデナ エッセ ピ ア  
 イタリア国 ミラノ ヴィアレ オルトレ  
 ス 12  
 (74) 代理人 100123788  
 弁理士 宮崎 昭夫  
 (74) 代理人 100088328  
 弁理士 金田 暢之  
 (74) 代理人 100106297  
 弁理士 伊藤 克博  
 (74) 代理人 100106138  
 弁理士 石橋 政幸  
 (72) 発明者 ガベッタ、ブルーノ  
 イタリア国 イ-20139 ミラノ ヴ  
 ィアレ オルトレス 12

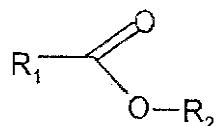
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】パクリタクセルとセファロマンニンのクロマトグラフ分離法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

パクリタクセル及びセファロマンニンを含む出発物質を入手し；該出発物質を次式：  
 【化 1】



[式中、R<sub>1</sub>は水素又はメチルであり、R<sub>2</sub>は4-7の炭素原子を含むアルキル又はアリールアルキル基である。]

を有する溶媒中に溶解させて混合物となし；該混合物をカラムクロマトグラフにかけてパクリタクセル溶離部分、セファロマンニンの溶離部分及び残留物を得；次いでパクリタクセル及びセファロマンニン部分を別々に乾燥して各個別の結晶形のパクリタクセルとセファロマンニンを得ることを特徴とする、パクリタクセルとセファロマンニンの分離方法。

## 【請求項 2】

前記出発物質が、セファロマンニンとパクリタクセルを任意比率で含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

前記出発物質が、新鮮な又は乾燥したイチイの樹

10

20

の根、葉、枝、種又はそれらの混合物の抽出物である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記出発物質が、イチイの樹の物質の細胞培養物から得られる抽出物である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記出発物質が、固体状、シロップ状、又は半固体のゴム質物質の形状である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

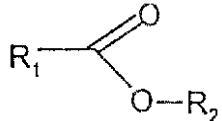
前記溶媒の構造が、水素又はメチルとしての  $R_1$ 、及び  $n$  - ブチル、イソブチル、第 2 級ブチル又は第 3 級ブチルとしての  $R_2$  を含む、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 7】

パクリタクセル及びセファロマンニンを含む出発物質入手し；該出発物質を次式：

【化 2】



[式中、 $R_1$  は水素又はメチルであり、 $R_2$  は 4 - 7 の炭素原子を含むアルキル又はアリールアルキル基である。]

20

を有する溶媒中に溶解させて混合物となし；該混合物を、溶離剤として上掲の式の单一溶媒を使用して直接相シリカゲルカラムを利用するカラムクロマトグラフにかけてパクリタクセルの溶離部分、セファロマンニンの溶離部分と残留物を得；次いでパクリタクセル部分とセファロマンニン部分を別々に乾燥させてそれぞれ別々の結晶形のパクリタクセルとセファロマンニンを得ることを特徴とする、パクリタクセルとセファロマンニンの分離方法。

【請求項 8】

前記溶媒の式が、水素又はメチルとしての  $R_1$ ；  $n$  - ブチル、イソブチル、第 2 級ブチル又は第 3 級ブチルとしての  $R_2$  を含む、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

30

シリカゲルが、出発物質の約 50 - 100 重量部の量で使用される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

前記出発原料がセファロマンニンとパクリタクセルを任意の比で含む、請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

前記出発物質が、新鮮な又は乾燥したイチイの樹の根、葉、枝、種又はそれらの混合物の抽出物である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 12】

前記出発物質が、イチイの樹の物質の細胞培養物から得られる抽出物である、請求項 7 記載の方法。

40

【請求項 13】

前記出発物質が、固体、シロップ、又は半固体のゴム質物質の形状である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 14】

前記溶媒の式が、水素又はメチルとしての  $R_1$  及び  $n$  - ブチル、イソブチル、第 2 級ブチル又は第 3 級ブチルとしての  $R_2$  を含む、請求項 7 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

50

この発明は、イチイ属の植物又はそれらの細胞培養物の抽出物から出発して、パクリタクセルをその類似物のセファロマンニンから分離するのに向けられている。特に、パクリタクセルは直接相シリカゲルカラム上でのクロマトグラフィによりセファロマンニンと分離される。

[ 0 0 0 2 ]

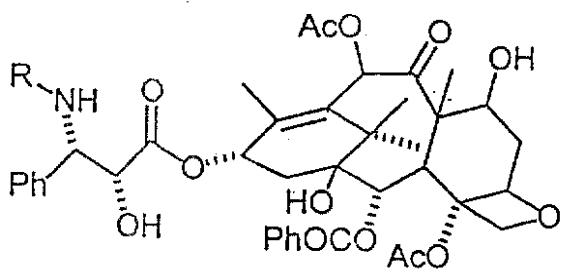
(背景技術)

以前には「タクソール」と呼ばれていたパクリタクセルは、非常に有望な抗がん剤である。このものは1971年Waniらによってイチイ属の *Taxus brevifolia* の樹皮から単離され (J. Am. Chem. Soc., 93, 2325, 1971)、その構造は化学的な方法及びX-線結晶分析を用いて明らかにされた。

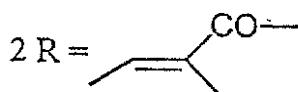
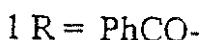
10

〔 0 0 0 3 〕

【化 3】



20



[ 0 0 0 4 ]

パクリタクセルは、FDA（米国食品医薬品局）によって乳がん及び卵巣がんの治療用に認可されており、現在は肺及び結腸のがん治療用に臨床試験中である（例えば、W. P. McGuire及びE. K. Rowinsky, Paclitaxel in Cancer Treatment, M. Dekker, New York 1995, 1-337ページを参照）。

30

[ 0 0 0 5 ]

パクリタクセルの第1の天然資源は太平洋イチイの樹 (*Taxus brevifolia*) の樹皮である。パクリタクセルはまた、ヨーロッパイチイ種 (*Taxus baccata*)、アジアイチイ種 (*Taxus wallichiana* 及び *Taxus chinensis*)、及び観賞目的 (例えば、*Taxus media*) で栽培するイチイ種を含む他のイチイ種の地上に出た部分や根の中に存在することがわかった。

[ 0 0 0 6 ]

天然資源からパクリタクセルの単離方法は、ひとつには植物物質中の濃度が比較的低いためであるが、またふたつめには同属の1つのセファロマンニンが存在するため、複雑かつ不経済なものになる。植物物質中のパクリタクセルとセファロマンニンの含有量及び比率は、植物の種類や問題にしている植物の部分によって異なる。一般に、パクリタクセルとセファロマンニンの含有量はそれぞれ0.001-0.08%及び0.001-0.22%の範囲であることがわかった(K.W.Witterup et al., J.Nat. Prod., 53, 1249, 1990; R.G.Kelsey et al., J.Nat. Prod., 55, 912, 1992; N.C.Wheeler et al., J.Nat. Prod., 55, 432, 1992)。特に、再生可能な植物物質であるTaxus media種は、パクリタクセルの製造に最も普通に用いられる原料であり、他の種と比較して平均で最も高い濃度のセファロマンニンを含む。

40

50

## 【0007】

高価な植物材料の慣用法による抽出を不必要にするため最近非常に多くてはやされているイチイの細胞培養物をベースとするパクリタクセル生産方法さえ、パクリタクセルの他にある関連量のセファロマンニンを産する。

## 【0008】

パクリタクセルとセファロマンニンの構造の違いは、化合物の側鎖部にあるのみであり、これが類似化学性質の原因である。それ故この2つの化合物はよく似たクロマトグラフ的性質を有し、これら同族化合物の完全分離は困難である。主として逆相クロマトグラフ又は高価な結合相カラムの使用に基づく多数のクロマトグラフ的方法が提案されているが (J. H. Cardellina, J. Liq. Chromatogr., 14, 659, 1991; S. L. Richheimer et al. Anal. Chem. 64, 2323, 1992; E. R. M. Wickremesinhe et al., J. Liq. Chromatogr., 16, 3263, 1993; K. M. Witherup et al., J. Liq. Chromatogr., 12, 2117, 1989)、これらは大規模商業運転に容易には適応できない。この理由のため、パクリタクセルとセファロマンニンを分離できる方法の可能性が、実際に大きな重要なトピックとして残っている。

10

## 【0009】

過去には、この2つの化合物の酸化剤に対する反応性が異なることに基づいてパクリタクセルとセファロマンニンを分離する方法が提案された。セファロマンニンのチグリン酸残さ中に存在するオレフイン二重結合が、四酸化オスミウムとの反応 (D. G. I. Kingston et al., J. Nat. Prod., 55, 259, 1992) 又はオゾンとの反応 (J. T. Beckvermit et al., J. Org. Chem., 61, 9308, 1996) によって酸化されるが、一方、パクリタクセルは酸化反応中何らの化学変化も受けないことがわかった。別のアプローチではパクリタクセルとセファロマンニンの混合物の臭素による処理が検討された (J. M. Rimoldi et al., J. Nat. Prod., 59, 167, 1996)。すなわち温度及び時間反応条件のコントロール下に行った臭素による処理はジプロモセファロマンニンを生成させるが、パクリタクセルはこの化学薬品によって影響されない。

20

しかしながら、これらの方法には四酸化オスミウムなどの有毒薬品を使用すると云う欠点があり、いざれにせよ、セファロマンニンが消滅又は変形してその誘導体を生成し、セファロマンニンはその誘導体から難しい合成方法によってしか再生することはできない。それ故、安価、簡単、安全で効果的なパクリタクセルとセファロマンニンの分離に依然としてニーズがある。したがって、本発明の第1の目的は、パクリタクセルとセファロマンニンの混合物又はイチイ抽出物からそれらを分離する簡便な方法を提供することである。

30

## 【0010】

## (発明の開示)

本発明はセファロマンニンや他の関連化合物からパクリタクセルを分離する方法を提供する。特に、この方法はパクリタクセルとセファロマンニンを含む出発物質入手すること；該出発物質を特に規定した多数の溶媒のうちのどれか1つに溶解させて混合物を生成させること；該混合物をカラムクロマトグラフにかけてパクリタクセルの溶離部分、セファロマンニンの溶離部分及び残留物を得ること；さらにパクリタクセル部分及びセファロマンニン部分を別々に乾燥させてそれぞれ別々の結晶形のパクリタクセル及びセファロマンニンを得ることを含む。溶媒は蟻酸ブチルあるいは酢酸ブチル又は酢酸ベンジルが好ましい。

40

## 【0011】

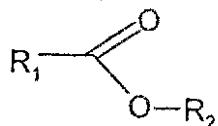
## (発明を実施するための最良の形態)

驚いたことに、溶離剤として1つの溶媒を用いる1つの直接相シリカゲルカラム上でのクロマトグラフ分離によって極めて高純度のパクリタクセルとセファロマンニンが高収率で得られることがわかった。好ましくはこの溶媒は次の一般式を有する。

50

【0012】

【化4】



【0013】

式中、R<sub>1</sub>は水素又はメチルであり、R<sub>2</sub>は好ましくは4つの炭素原子を含み、すなわちR<sub>2</sub>はn-ブチル、イソブチル、第2級-ブチル又は第3級-ブチルとすることができる。これら溶媒はカラム上でのルーチンのクロマトグラフ精製に頻繁には使用されないが、パクリタクセル-セファロマンニン分離の特別なケースには驚くべき程良好な実用的結果を与える。

10

【0014】

この発明の出発物質は、任意比率でのセファロマンニンとパクリタクセル単独物の混合物、あるいは新鮮な又は乾燥したイチイの根、葉、枝、種又はそれらの混合物の抽出物であってもよい。本発明方法はまた細胞培養物から得られた抽出物も含む。これらの出発物質は当業者には一般に公知であるので、ここでさらに説明の要はない。

【0015】

問題にしている抽出物は粗抽出物又は精製抽出物であってもよく、後者は慣用の溶媒で処理され、予備的なクロマトグラフ精製を受けている。再び、これらの技術は当業者には公知であるので、ここでさらに述べる必要はない。この出発物質は、その製造に使用する実験条件によって固体状、シロップ又は半固体のゴム質物質の形状であってもよい。この物質を、本明細書に説明した溶媒のうちの1つに溶解後カラムクロマトグラフにかけさえすればよい。

20

【0016】

本発明のクロマトグラフ精製は、その組成にもよるが、出発物質の約50-100重量部の量の簡単な直接相シリカゲルを利用する。

【0017】

本発明の溶媒によるカラムクロマトグラフは速くて、高い圧力を要せず、通常の重力条件下で実施される。

30

【0018】

表1は、シリカゲルプレートを使用する薄層クロマトグラフ分析でのセファロマンニンとパクリタクセルの挙動と、2つの化合物の満足な分離を可能にする本発明の一聯の溶媒を示している。

【0019】

【表1】

表1 -シリカゲルプレート上でのパクリタクセルとセファロマンニンのR<sub>f</sub>値

<u>溶媒</u>	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>パクリ</u>	<u>セファロ</u>	10
			<u>タクセル</u>	<u>マンニン</u>	
蟻酸 n - ブチル	H	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0.17	0.12	
蟻酸 i - ブチル	H	i-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0.20	0.15	
蟻酸 t - ブチル	H	t-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0.20	0.13	
蟻酸 n - ブチル	CH <sub>3</sub>	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0.36	0.28	
蟻酸 s - ブチル	CH <sub>3</sub>	s-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0.35	0.24	
酢酸 i - ブチル	CH <sub>3</sub>	i-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0.31	0.19	
酢酸 t - ブチル	CH <sub>3</sub>	t-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0.19	0.09	
酢酸ベンジル	CH <sub>3</sub>	PhCH <sub>2</sub>	0.28	0.16	20

【0020】

直接相シリカゲルカラム上でのクロマトグラフィによるパクリタクセルとセファロマンニンの単離に本発明記載の溶媒の使用は多くの利益を提供する。

【0021】

第1に、カラムクロマトグラフィは事実上セファロマンニン - フリーの（セファロマンニンを含まない）パクリタクセル、逆に殆どパクリタクセル - フリーのセファロマンニンを産する。第2に、直接相シリカゲルの使用は、前掲文献に記載された逆相シリカゲルの使用よりもかなりの経済的利益を提供し、そして第3に、カラムの溶離に1つの溶媒を使用することにより工業的、連続法製造に関連する運転において分留によらずに速やかなりサイクルが可能となる。パクリタクセル及びセファロマンニンと一緒に出発物質中に存在する他の構成成分のいずれもクロマトグラフ精製によって取り除かれる。

【0022】

溶離部分を乾涸するまで真空蒸発させ、残留物を適当な溶媒で結晶化させることにより望ましい結晶形のパクリタクセルとセファロマンニンが得られる。

【0023】

本発明で説明した方法は、それゆえ、収得量の収率を増加させるとともにこの抗腫瘍剤のより安価な生産方法を進展させることによりセファロマンニン - フリーのパクリタクセルを多量製造するための簡単な解決法を提供する。

【0024】

（実施例）

以下の実施例は本発明を説明するが限定するものではない。

実施例1 セファロマンニンを含む *Taxus media* 抽出物からパクリタクセルの単離

V. Senilhら (J. Nat. Prod. 47, 131, 1984) によって説明された方法にしたがって 620 kg の *Taxus media* (植物全部) から製造した 290 g の抽出

物が、HPLC 分析によって 183 g のパクリタクセルと 81 g のセファロマンニンを含むことがわかった。この抽出物を 3.5 L の t - 酢酸ブチル中に溶解し、60 kg のシリ

30

40

50

### カゲルを含む力

ラム上に装填した。合計 1 2 0 0 L の t - ブチルが溶離する。パクリタクセルと 3 % 未満のセファロマンニンを含む 4 0 0 L 部分及びセファロマンニンと 3 % 未満のパクリタクセルを含む別の 2 0 0 L 部分が、3 5 0 L の溶媒溶離 (elution) 後に得られる。この 2 つの部分を別々に真空濃縮して乾涸させ、残留物をヘキサン - アセトンで結晶化させる。このようにして得られた 1 5 4 g のパクリタクセルと 7 0 g のセファロマンニンは 9 9 % を超える H P L C 純度を有し、その物理化学的及び分光分析値は、文献 ( G . N . C h m u r n y et al . , J . Nat . Prod . 55 , 4 1 4 , 1 9 9 2 ; C . J . F a l z o n e et al . , Tetrahedron Letters , 33 , 1 1 6 9 , 1 9 9 2 ; V . S e n i l h et al . , J . Nat . Prod . 47 , 1 3 1 , 1 9 8 4 ) によって提供された情報と一致する。 10

実施例 2 パクリタクセル及びセファロマンニン両者を含む混合物からパクリタクセルとセファロマンニンの単離。

#### 【 0 0 2 5 】

7 0 g のパクリタクセルと 3 0 g のセファロマンニンを含む混合物を 1 . 5 L の t - 蟻酸ブチルに溶解し、同じ溶媒中に懸濁した 1 0 k g のシリカゲルを含むカラムにかけた。カラムを t - 蟻

酸ブチルで溶離し、各溶離部分を H P L C / T L C 分析後に一緒にした。パクリタクセルとセファロマンニンを含む部分を別々に濃縮乾涸させ、残留物を好適な比のアセトンとヘプタンで結晶化させて 9 9 % を超える H P L C 純度を有するパクリタクセルとセファロマンニンを得た。 20

---

フロントページの続き

(72)発明者 ツィーニ、 ジアンフランコ  
イタリア国 イ - 2 0 1 3 9 ミラノ ヴィアレ オルトレス 12

審査官 斎藤 恵

(56)参考文献 国際公開第00/40573 (WO, A1)  
国際公開第94/13827 (WO, A1)  
特開2000-204090 (JP, A)  
特表平11-500753 (JP, A)  
特開平8-127574 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D 305/00-305/14  
A61K 31/33-31/80  
A61P 35/00  
CAplus(STN)  
REGISTRY(STN)