



<p>(51) 国際特許分類6 C07H 15/252</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/11650</p> <p>(43) 国際公開日 1999年3月11日(11.03.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03767</p> <p>(22) 国際出願日 1998年8月25日(25.08.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/245980 1997年8月28日(28.08.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) メルシヤン株式会社(MERCIAN CORPORATION)[JP/JP] 〒104-8305 東京都中央区京橋一丁目5番8号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 城道 修(JOHDO, Osamu)[JP/JP] 〒252-0804 神奈川県藤沢市湘南台4-27-11 ヴィラハイツ湘南203 Kanagawa, (JP) 井口このみ(IGUCHI, Konomi)[JP/JP] 〒253-0073 神奈川県茅ヶ崎市巾着島1143 エスペランサ湘南101 Kanagawa, (JP) 吉岡武男(YOSHIOKA, Takeo)[JP/JP] 〒252-1124 神奈川県綾瀬市吉岡1782-10 Kanagawa, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 小田島平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.) 〒107-0052 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: METHOD OF PURIFYING DAUNOMYCIN</p> <p>(54)発明の名称 ダウノマイシンの精製方法</p> <p>(57) Abstract A method which comprises adsorbing daunomycin from crude daunomycin onto a hydrophobic porous synthetic resin support, eluting the daunomycin with a buffered aqueous solution containing a water-miscible organic solvent, and recovering the purified daunomycin. Thus, daunomycin (daunorubicin) is efficiently purified.</p>		

(57)要約

本明細書は、粗精製ダウノマイシンからダウノマイシンを吸着させた疎水性多孔質合成樹脂担体を水混和性有機溶媒を含有する緩衝化された水性溶液でダウノマイシンを溶出し、精製されたダウノマイシンを回収する方法に関する。効率よくダウノマイシン（ダウノルビシン）が精製される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スーダン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン				

明細書

ダウノマイシンの精製方法

技術分野

- 本発明は、アントラサイクリン抗生物質ダウノマイシンの高純度製品
- 5 を得るための精製方法に関する。

背景技術

- ダウノマイシン（ダウノルビシンとも称されている）は、放線菌の培養液から得られることが知られており、実験腫瘍に対して広域抗癌スペクトルを有するアントラサイクリン抗生物質である（米国特許第3,6
- 10 16,242号明細書参照）。そして、現に、癌化学療法剤として臨床的にも広く利用されている。

- ダウノマイシン（以下、「DM」と略記する場合あり）を初めとする類似のアントラサイクリン抗生物質は、前記培養液から粗精製したものを、カチオン交換樹脂（例、Amberlite（商標）IRC50）にかけ、
- 15 塩化ナトリウム含有水または水と塩化ナトリウムを含有するメタノールで溶離することにより、さらに精製されている（特公昭49-44347号、特開昭50-15880号）。また、重合体状イオン交換樹脂（例、Amberlite（商標）ER180）もしくはCMセファロース樹脂（例、Sephacrose（商標）CHB）に前記抗生物質を吸着させた後、酸
- 20 性の水と極性溶媒の混合物を用いて溶離する工程を含む方法も公表されている（特開昭59-118797号ならびにそれに由来する特公平4-39476号、分割出願の特開平7-252291号：これらに対応する米国特許第4,861,870号）。さらに、後者の公報には、上記重合体状イオン交換樹脂で処理する前の予備精製工程において吸着性多

孔質合成樹脂担体（例、Amberlite（商標）XAD2）に粗精製アントラサイクリン抗生物質を吸着させた後、水／メタノール（5：1）（v／v）混合物を用いて前記抗生物質を溶離することも記載されている。

5 以上の従来技術の吸着、溶離手段によれば、一定の高純度DMを得ることもできるようであるが、高純度製品を得ようとすればする程、目的とするDMの回収率が低下し、逆に回収率を高めようとすればする程、製品の純度を高めることができない。特に、培養液からDMを回収しようとする場合、その後の結晶化を初めとする精製工程により除去することが困難な不純物（たとえば、後述するHPLC分析でDMより保持時間
10 間の大きいもの）が精製DMに随伴してくる傾向がある。

したがって本発明の目的は、出発粗精製DMから高純度DMを高い回収率で、しかも簡便な方法で得ることのできる精製方法を提供することにある。

発明の開示

15 本発明者らは、高純度製品を得るためのイオン交換樹脂（例、Amberlite（商標）ER180）を用いる処理に先立って、予備精製の工程で使用されている吸着性（もしくは疎水性）合成樹脂担体を用い、特定の溶離（または溶出）条件を選ぶことにより、高回収率でかつ高純度のDMを得ることを見い出した。たとえば、上記特開昭59-118797
20 号公報に記載されているように、高純度製品を得るためにイオン交換樹脂の使用が必須である予備精製工程で使用されていたにすぎない疎水性合成樹脂担体の使用だけで、上記課題が解決できることは全く驚くべきことであろう。

したがって本発明によれば、粗精製ダウノマイシンからダウノマイシ

ンを吸着させた疎水性多孔質合成樹脂担体を、水混和性有機溶媒を含有する pH 2.5～6 に緩衝化された水性溶液でダウノマイシンを溶出し、溶出液から精製されたダウノマイシンを回収することを特徴とするダウノマイシンの精製方法が提供される。

5 図面の簡単な説明

図 1 A～C は、例 1～8 における DM の回収率、回収液量および相対純度を示すグラフである。

図中の横座標を基準に、control (pH 2.5)、pH 2.5、pH 3.0、pH 3.5、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0 および pH 6.0 が、
10 それぞれ例 1～8 の結果に対応する。

図 2 は、出発物質である低純度 DM 粉末 (相対純度 80.3%) の HPLC 分析の結果を示すチャートである。

図 3 は、例 5 (本発明) によって得られた DM (相対純度 88% 以上) の溶液の HPLC 分析結果を示すチャートである。

15 図 4 A～C は、例 9～17 における DM の回収率、回収液量および相対純度を示すグラフである。

図 5 A～C は、例 18 および 19 における DM の回収率、回収液量および相対純度を示すグラフである。

20 図 6 は、例 9～19 で使用したより高純度の原料 DM (相対純度 95.5%) の HPLC 分析チャートである。

図 7 は、例 9～19 における相対純度 98% 以上の画分を集めたものの HPLC 分析チャートである。

発明を実施するための最良の形態

本発明にいう粗精製ダウノマイシン (DM) は、それを含有する培養

液から、それ自体既知の分離もしくは精製方法に従って菌体その他の固
形物が除去され、DMがある程度濃縮されているものであれば、DMの
含有率はいかなるものであってもよい。このような分離もしくは精製方
法には上記従来技術として紹介した方法をも包含され、それらの方法を
5 介して得られる比較的純度の低いDM含有物をも包含される。また、も
し該当する場合には、半合成工程を経て得られる一定の不純物を随伴す
るDM含有処理物をも、本発明にいう粗精製DMに包含される。

しかしながら、本発明方法がより効率的に適用できるのは、DMの相
対純度が約80%以上、好ましくは80~96%である。本明細書で使
10 用する場合の「相対純度」とは、試料を後述するHPLC分析した結果
得られる各成分の溶出挙動を示す総ピーク面積に対するDM由来のピー
ク面積の割合を意味する。

粗精製DMを吸着させるのに使用する疎水性多孔質合成樹脂担体とし
ては、本発明の目的に沿う機能を有するものであればいかなる種類のも
15 ののであってもよいが、具体的にはスチレンとジビニルベンゼンから特殊
な方法で重合して得られる多孔質（もしくは多孔性）ポリマーを挙げる
ことができる。このような多孔質ポリマーは、製造方法に従って、比表
面積、細孔容積を異にするが、後述する本発明の具体例に沿って使用す
ることにより、所定の効果を得ることができるものであれば、それらの
20 物性により限定されない。

しかしながら、一般的に、比表面積が400~800 m²/gの範囲
にあり、細孔容積が0.650~1.5 ml/gにあるものが好適に使用
できる。このような多孔質ポリマーは、市販されているものから選ぶ
こともでき、限定されるものでないが、三菱化学株式会社製のダイヤイ

オン（商標）HP20（以下、HP20と略記する）または同HP20
SS（以下、HP20SSと略記する）を都合よく使用することができる。

上記のような、粗精製ダウノマイシンを吸着させた疎水性多孔質合成
5 樹脂担体からのDMの溶出は、本発明によれば、水混和性有機溶媒を含有するpH2.5～6に緩衝化された水性溶液が使用される。水混和性有機溶媒は本発明の目的に沿う限り特に限定されるものでないが、経済性と溶出効率の両者を兼ね備えたものとしては、メタノール、エタノール、イソプロパノールおよびアセトンを挙げることができる。これらの
10 うち、特に好適なものは、メタノールおよびアセトンである。このような溶媒を使用するとき、これらの溶媒と水溶液は、使用する溶媒によって最適混合比が変動するので限定できないが、一般的に、溶媒対水溶液は、それぞれ容量基準で、80対20～20対80の割合で使用できる。たとえば、メタノールを使用する場合には、メタノール/水溶液は、6
15 0～80/20～40、特に、約70/約30の割合で使用でき、アセトンを使用する場合には、アセトン/水溶液は、20～40/80～60、特に約30/約70の割合で使用できる。

これらの有機溶媒を含有する水性溶液は、特に、pH2.5～6に緩衝化されていることが必要である。pHが2.5より低いと、一般的に
20 得られる製品におけるDMの相対純度が低くなる傾向があり、一方、pHが6を超えるとDMの回収率が低くなる傾向がある。緩衝化に使用される緩衝剤は、製品に悪影響を及ぼさないものであれば、いかなる緩衝剤であってもよい。限定されるものでないが、かような緩衝剤としては、重フタル酸カリウム-HCl、グリコール酸-HCl、クエン酸ナ

トリウム-HCl、クエン酸カリウム-HCl、クエン酸カリウム-ク
エン酸、コハク酸-Na₂B₄O₇、酢酸ナトリウム-HCl、酢酸ナト
リウム-酢酸、クエン酸-Na₂HPO₄、酒石酸-酸石酸ナトリウム、
乳酸-乳酸ナトリウム、アコニチン酸-NaOH、コハク酸-NaOH
5 等を挙げることができる。これらのうち、特に、クエン酸ナトリウム-
HClが好ましい。

また、緩衝剤の濃度は、使用する緩衝剤の使用によって、0.05M
-1Mのものが使用できるが、好ましい例であるクエン酸ナトリウム-
HClの系では、約0.1Mクエン酸ナトリウムを使用するのが好適で
10 ある。

上記樹脂担体からそれに吸着しているDMを溶出する操作温度は、D
Mまたは樹脂担体に変性などの悪影響を及ぼさない温度であれば、どの
ような温度であってもよいが、室温(10~30℃)、付近が都合よい。
さらに、かような樹脂担体は、通常、カラムに充填した態様で操作する
15 のがよいが、これに限定されない。

粗精製DMを吸着させた疎水性多孔質合成樹脂担体の調製は、上記溶
出に悪影響を及ぼさない方法に従ったものであれば、どのような方法で
DMが前記樹脂担体に吸着されたものであってもよい。しかしながら、
具体的な調製は、pH約1~5の酸性水溶液(以下、酸性水ともいう)
20 に粗精製DMを溶解させた溶液と前記担体との接触によりその担体にD
Mを吸着させ、次いで前記酸性水でDM吸着樹脂担体を洗浄することによ
るのが好ましい。酸性水は粗精製DMを溶解するのに使用するものと、
DM吸着樹脂担体を洗浄するものとは、同一または異っていてもよい。
酸性水のpH調節は、単に塩酸によって行ってもよいが、上述したよう

な緩衝剤を使用して行ってもよい。好ましくは、0.1 Mクエン酸水溶液を使用することができる。また、酸性水のpHは、約2.5付近に調節することが、特に好ましい。このような酸性水による洗浄は、洗浄液中に不純物の存在が認められなくなるまで続ける。洗浄液中の不純物の

5 存否は、たとえば分光光度計を使用して確認すればよい。

以上の本発明方法によって精製されたDMは、必要により、同一または異なる構成からなる上記方法で繰り返し処理してもよい。

また、上記の方法により精製されたDM含有画分からのDMの回収は、有機溶媒を留去した後の溶液から、クロロホルムなどを使用するそれ自

10 体既知の抽出方法により回収してもよい。しかしながら、好ましくは、相対純度が一定値以上の画分を集め、その溶液を水酸化ナトリウムなどでpH約8.5に調節し、溶液量の約半量のクロロホルムを加えてDMを抽出し、有機溶媒相を減圧下に濃縮乾固した後、これに少量のクロロホルム/メタノール(20:1)を加えて溶解し、次いでこの溶液を過

15 剰量のヘキサン中に加えてDMを析出せしめ、析出したDMを濾取するのが、より高品位のDMを回収できるので好ましい。

以下、具体例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの例は、本発明ならびに本発明の作用および効果の理解をより容易にする目的で提供するものである。

20 例1(比較例)低純度DMの精製

低純度DM粉末500mg(DM含量305mg、相対純度80.3%)を酸性水(pH2.5、HCl)200mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム(50mL)にかけた。同酸性水50mLで洗浄した後、メタノール-酸性水(PH2.5)(70:30)で溶出させ、

DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ86、88、89および90%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図1A～C中にcontrol (pH 2.5) として示した。

5 HPLC分析条件：

カラム：ULTRASPHERE ODS、250×4.6 mm i.d. (BECKMAN)

移動相：水-アセトニトリル(62：38)、リン酸でpH 2.2±0.2に調整

流速：1.5 mL/min

10 検出：495 nm

例2 (本発明) 低純度DMの精製

低純度DM粉末500 mg (DM含量305 mg、相対純度80.3%) を酸性水 (pH 2.5、HCl) 200 mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム (50 mL) にかけて。同酸性水50 mL及び0.1 Mクエン酸緩衝液 (pH 2.5) 100 mLで洗浄した後、メタノール-0.1 Mクエン酸緩衝液 (pH 2.5) (70：30) で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ86、88、89および90%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図1A～C中にpH 2.5として示した。

20 例3 (本発明) 低純度DMの精製

低純度DM粉末500 mg (DM含量305 mg、相対純度80.3%) を酸性水 (pH 2.5、HCl) 200 mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム (50 mL) にかけて。同酸性水50 mL及び0.1 Mクエン酸緩衝液 (pH 3.0) 100 mLで洗浄した後、メタノール

ル-0.1Mクエン酸緩衝液 (PH3.0) (70:30) で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ86、88、89および90%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図1A~C中にpH3.0として示した。

5 例4 (本発明) 低純度DMの精製

低純度DM粉末500mg (DM含量305mg、相対純度80.3%) を酸性水 (pH2.5、HCl) 200mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム (50mL) にかけて。同酸性水50mL及び0.1Mクエン酸緩衝液 (pH3.5) 100mLで洗浄した後、メタノール-0.1Mクエン酸緩衝液 (PH3.5) (70:30) で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ86、88、89および90%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図1A~C中にpH3.5として示した。

例5 (本発明) 低純度DMの精製

15 低純度DM粉末500mg (DM含量305mg、相対純度80.3%) を酸性水 (pH2.5、HCl) 200mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム (50mL) にかけて。同酸性水50mL及び0.1Mクエン酸緩衝液 (pH4.0) 100mLで洗浄した後、メタノール-0.1Mクエン酸緩衝液 (PH4.0) (70:30) で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ86、88、89および90%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図1A~C中にpH4.0として示した。原料に
20 用いた低純度DM及び相対純度88%以上のDM分画を集めたもののHPLC分析チャートを、それぞれ図2及び図3に示す。

例6（本発明）低純度DMの精製

低純度DM粉末500mg（DM含量305mg、相対純度80.3%）を酸性水（pH2.5、HCl）200mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム（50mL）にかけた。同酸性水50mL及び0.1Mクエン酸緩衝液（pH4.5）100mLで洗浄した後、メタノール-0.1Mクエン酸緩衝液（PH4.5）（70：30）で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ86、88、89および90%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図1A～C中にpH4.5として示した。

10 例7（本発明）低純度DMの精製

低純度DM粉末500mg（DM含量305mg、相対純度80.3%）を酸性水（pH2.5、HCl）200mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム（50mL）にかけた。同酸性水50mL及び0.1Mクエン酸緩衝液（pH5.0）100mLで洗浄した後、メタノール-0.1Mクエン酸緩衝液（PH5.0）（70：30）で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ86、88、89および90%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図1A～C中にpH5.0として示した。

例8（本発明）低純度DMの精製

20 低純度DM粉末500mg（DM含量305mg、相対純度80.3%）を酸性水（pH2.5、HCl）200mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム（50mL）にかけた。同酸性水50mL及び0.1Mクエン酸緩衝液（pH6.0）100mLで洗浄した後、メタノール-0.1Mクエン酸緩衝液（PH6.0）（70：30）で溶出させ、

DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ86、88、89および90%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図1A~C中にpH6.0として示した。

例9（比較例）より高純度の原料DMの精製

5 より高純度の原料DM粉末500mg（DM含量463mg、相対純度95.8%）を酸性水（pH2.5、HCl）10mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム（50mL）にかけた。同酸性水50mL及び水100mLで洗浄した後、メタノール-水（70：30）で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ96、
10 97および98%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図4A~C中にcontrol（H20）として示した。

例10（比較例）より高純度の原料DMの精製

より高純度の原料DM粉末500mg（DM含量463mg、相対純度95.8%）を酸性水（pH2.5、HCl）10mLに溶解して、
15 この溶液をHP20のカラム（50mL）にかけた。同酸性水50mLで洗浄した後、メタノール-酸性水（PH2.5）（70：30）で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ96、97および98%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図4A~C中にcontrol（pH2.5）として示し
20 た。

例11（本発明）より高純度の原料DMの精製

より高純度の原料DM粉末500mg（DM含量463mg、相対純度95.8%）を酸性水（pH2.5、HCl）10mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム（50mL）にかけた。同酸性水50mL及

び0.1Mクエン酸緩衝液(pH2.5)100mLで洗浄した後、メタノール-0.1Mクエン酸緩衝液(PH2.5)(70:30)で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ96、97および98%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収
5 液量、相対純度を図4A~C中にpH2.5として示した。

例12(本発明)より高純度の原料DMの精製

より高純度の原料DM粉末500mg(DM含量463mg、相対純度95.8%)を酸性水(pH2.5、HCl)10mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム(50mL)にかけた。同酸性水50mL及
10 び0.1Mクエン酸緩衝液(pH3.0)100mLで洗浄した後、メタノール-0.1Mクエン酸緩衝液(PH3.0)(70:30)で溶出させた。相対純度98%以上のDM分画を集め、HPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ96、97および98%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図4A~C中にpH3.
15 0として示した。

例13(本発明)より高純度の原料DMの精製

より高純度の原料DM粉末500mg(DM含量463mg、相対純度95.8%)を酸性水(pH2.5、HCl)10mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム(50mL)にかけた。同酸性水50mL及
20 び0.1Mクエン酸緩衝液(pH3.5)100mLで洗浄した後、メタノール-0.1Mクエン酸緩衝液(PH3.5)(70:30)で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。この実験は2回行った。相対純度が、それぞれ96、97および98%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図4A~C中にpH3.5

として示した。

例 1 4 (本発明) より高純度の原料DMの精製

より高純度の原料DM粉末500mg (DM含量463mg、相対純度95.8%)を酸性水(pH2.5、HCl)10mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム(50mL)にかけた。同酸性水50mL及び0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.0)100mLで洗浄した後、メタノール-0.1Mクエン酸緩衝液(PH4.0)(70:30)で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。この実験は2回行った。相対純度が、それぞれ96、97および98%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図4A~C中にpH4.0として示した。

例 1 5 (本発明) より高純度の原料DMの精製

より高純度の原料DM粉末500mg (DM含量463mg、相対純度95.8%)を酸性水(pH2.5、HCl)10mLに溶解して、この溶液をHP20のカラム(50mL)にかけた。同酸性水50mL及び0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.5)100mLで洗浄した後、メタノール-0.1Mクエン酸緩衝液(PH4.5)(70:30)で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。この実験は2回行った。相対純度が、それぞれ96、97および98%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図4A~C中にpH4.5として示した。

例 1 6 (本発明) より高純度の原料DMの精製

より高純度の原料DM粉末500mg (DM含量463mg、相対純度95.8%)を酸性水(pH2.5、HCl)10mLに溶解して、こ

の溶液をHP 20のカラム（50 mL）にかけた。同酸性水50 mL及び0.1 Mクエン酸緩衝液（pH 5.0）100 mLで洗浄した後、メタノール-0.1 Mクエン酸緩衝液（PH 5.0）（70：30）で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。この実験は2回行った。相
5 対純度が、それぞれ96、97および98%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図4 A～C中にpH 5.0として示した。

例17（本発明）より高純度の原料DMの精製

より高純度の原料DM粉末500 mg（DM含量463 mg、相対純
10 度95.8%）を酸性水（pH 2.5、HCl）10 mLに溶解して、この溶液をHP 20のカラム（50 mL）にかけた。同酸性水50 mL及び0.1 Mクエン酸緩衝液（pH 6.0）100 mLで洗浄した後、メタノール-0.1 Mクエン酸緩衝液（PH 6.0）（70：30）で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ96、
15 97および98%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図4 A～C中にpH 6.0として示した。

例18（本発明）より高純度の原料DMの精製

より高純度の原料DM粉末500 mg（DM含量463 mg、相対純
20 度95.8%）を酸性水（pH 2.5、HCl）10 mLに溶解して、この溶液をHP 20 SSのカラム（50 mL）にかけた。同酸性水50 mL及び0.1 Mクエン酸緩衝液（pH 4.0）100 mLで洗浄した後、メタノール-0.1 Mクエン酸緩衝液（PH 4.0）（70：30）で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ96、97、98および99%以上のDM分画を集めたときの、DMの

回収率、回収液量、相対純度を図5 A～C中に黒棒（70%メタノール）として示した。

例19（本発明）より高純度の原料DMの精製

より高純度の原料DM粉末500mg（DM含量463mg、相対純度95.8%）を酸性水（pH2.5、HCl）10mLに溶解して、この溶液をHP20SSのカラム（50mL）にかけた。同酸性水50mL及び0.1Mクエン酸緩衝液（pH4.0）100mLで洗浄した後、アセトン-0.1Mクエン酸緩衝液（PH4.0）（30：70）で溶出させ、DM溶出分画のHPLC分析を行った。相対純度が、それぞれ96、97、98および99%以上のDM分画を集めたときの、DMの回収率、回収液量、相対純度を図5 A～C中に白抜き棒（30%アセトン）として示した。

原料に用いたより高純度の原料DM及び相対純度98%以上のDM分画を集めたもののHPLC分析チャートを、それぞれ図6及び図7に示す。

例20（本発明）精製DMの回収

例18において、相対純度が98%以上のDM分画を集めた溶液からDMを回収した。集めた溶液のpHを4N水酸化ナトリウムで8.5とし、溶液量の約半量のクロロホルムを加えてDMを抽出した。DMを含有する有機溶媒相を減圧下に濃縮乾固した後、これに少量のクロロホルム/メタノール（20：1）を加えて溶かし、過剰量のヘキサン中に添加した。析出したDMを濾取し、減圧下に40℃で一夜乾燥した。このとき、得られたDM粉末の収量は242mgであった。

以上の例より、図1 A～Cによれば、本発明方法はコントロール(con

tro1) (比較例) に比べて、相対純度の高い製品を高回収率で得ることが
できることがわかる。具体的には、比較例では相対純度が89%以上
の画分(黒丸および黒菱形)は得られず、しかも88%以上の画分(黒
四角)の回収率は10%以下と低いにもかかわらず、本発明方法、たと
5 えばpH2.5では88%以上の画分の回収率は65%を超え、しかも
相対純度が89%以上の画分の回収率も10%を超える。また、本発明
に従う、pH5.98では、相対純度が90%以上の画分(黒菱形)で
さえも回収率が15%を超えている。これらの傾向は、水混和性有機溶
媒として、アセトンを使用する場合も同様に認められる(図5A~C参
10 照)。

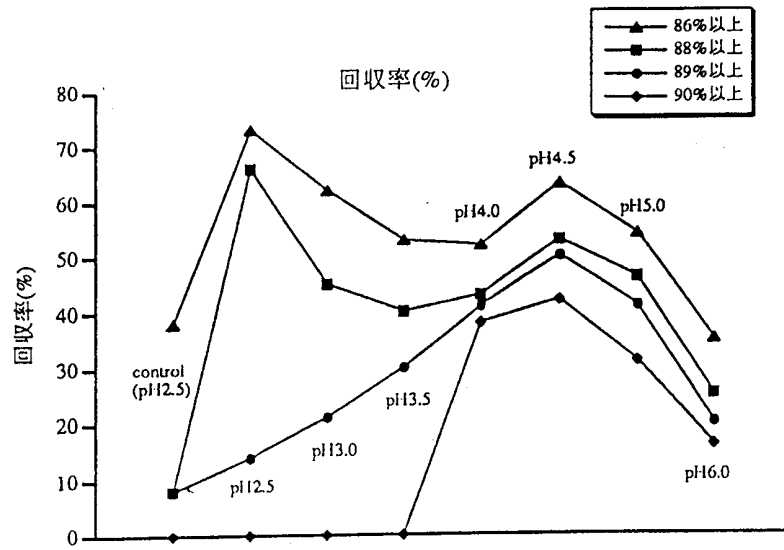
15

20

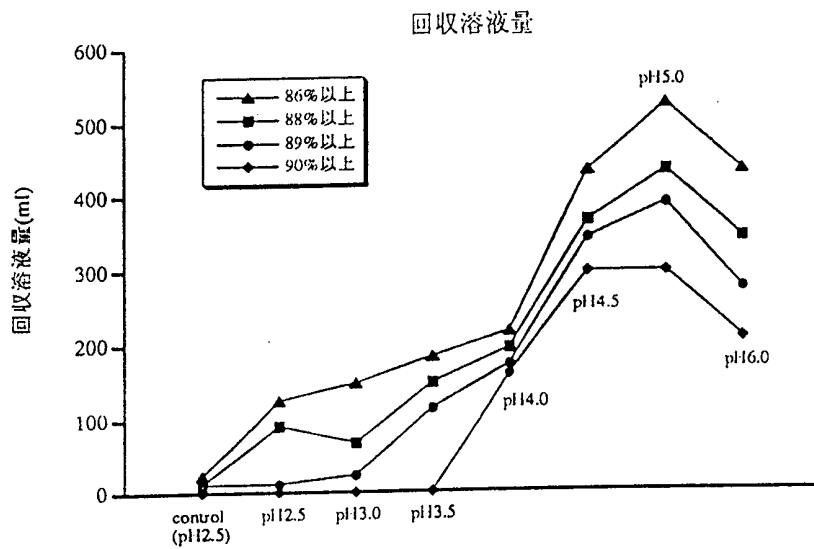
請求の範囲

1. 粗精製ダウノマイシンからダウノマイシンを吸着させた疎水性多孔質合成樹脂担体を、水混和性有機溶媒を含有する pH 2.5～6 に緩衝化された水性溶液でダウノマイシンを溶出し、溶出液から精製された
5 ダウノマイシンを回収することを特徴とするダウノマイシンの精製方法。
2. 粗精製ダウノマイシンを吸着させた疎水性多孔質合成樹脂担体が、
pH 約 1～5 の酸性水溶液に粗精製ダウノマイシンを溶解させた溶液と
疎水性多孔質合成樹脂担体との接触により前記担体にダウノマイシンを
吸着させ、次いで前記酸性水溶液でダウノマイシンを吸着した前記担体
10 を洗浄することにより調製される請求項 1 記載の精製方法。
3. ダウノマイシンを吸着した前記担体を洗浄するのに用いられる前
記酸性水溶液が、緩衝化されている請求項 2 記載の精製方法。
4. 前記有機溶媒を含有する緩衝化された水性溶液が、クエン酸緩衝
液により緩衝化されており、そして前記有機溶媒がメタノール、エタノ
15 ールおよびアセトンからなる群より選ばれる少なくとも 1 種の溶媒である
請求項 1～3 のいずれかに記載の精製方法。
5. 前記有機溶媒を含有する緩衝化された水性溶液が、有機溶媒対水
溶液の容量比が 80 対 20～20 対 80 を有する請求項 4 記載の精製方
法。
- 20 6. 粗精製ダウノマイシンが相対純度 80～96% を有する請求項 1
～5 のいずれかに記載の精製方法。

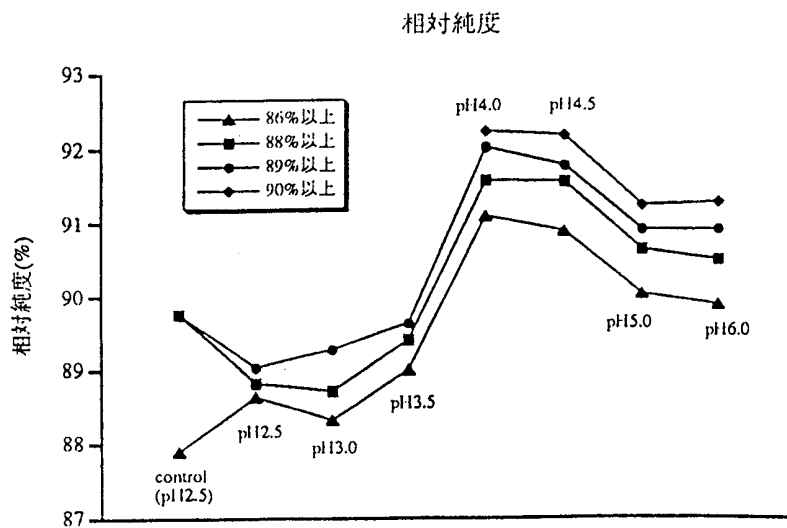
[図 1 A]



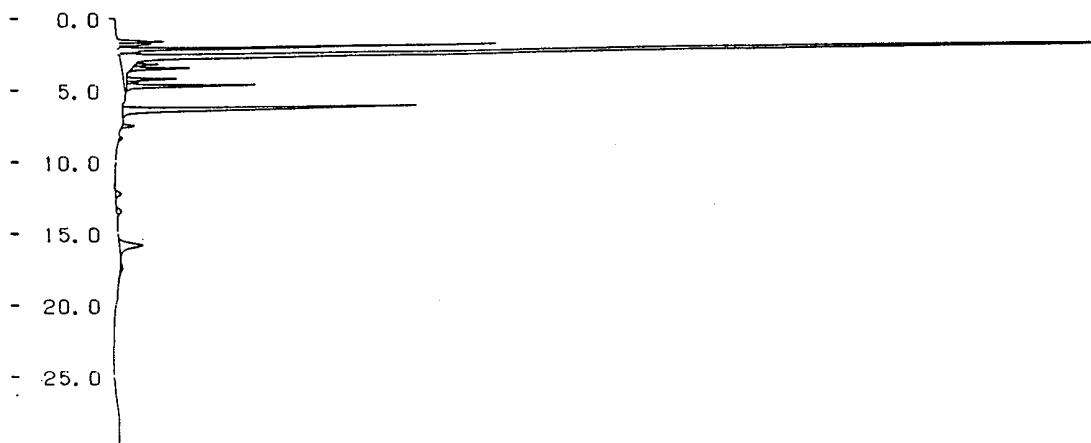
[図 1 B]



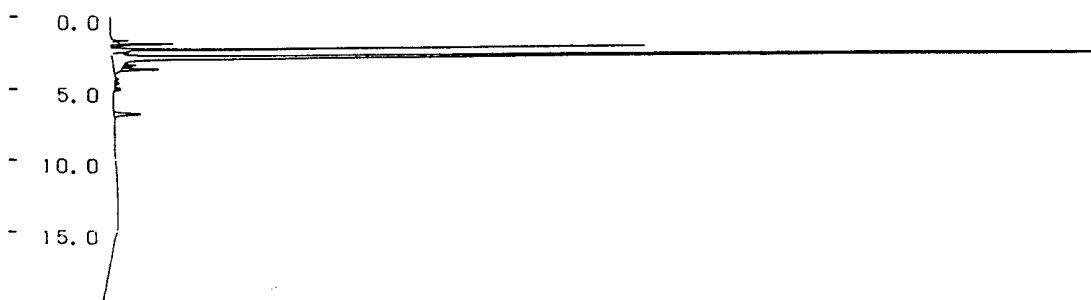
[図 1 C]



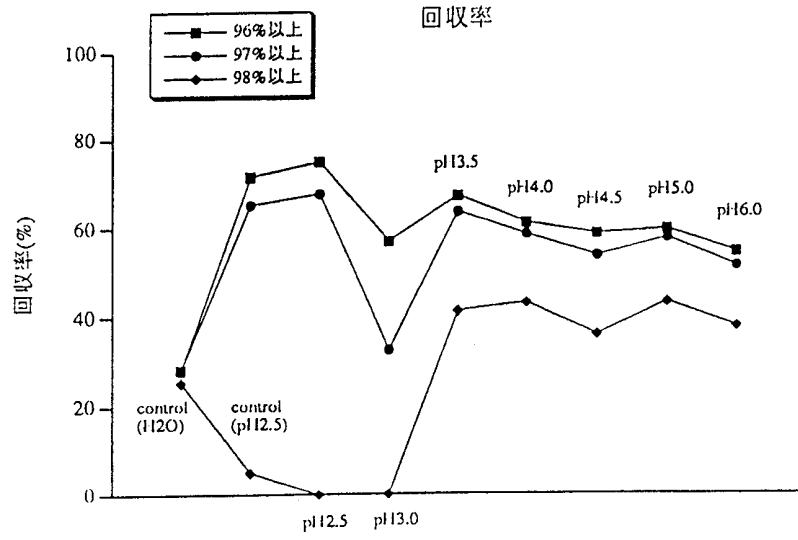
[2]



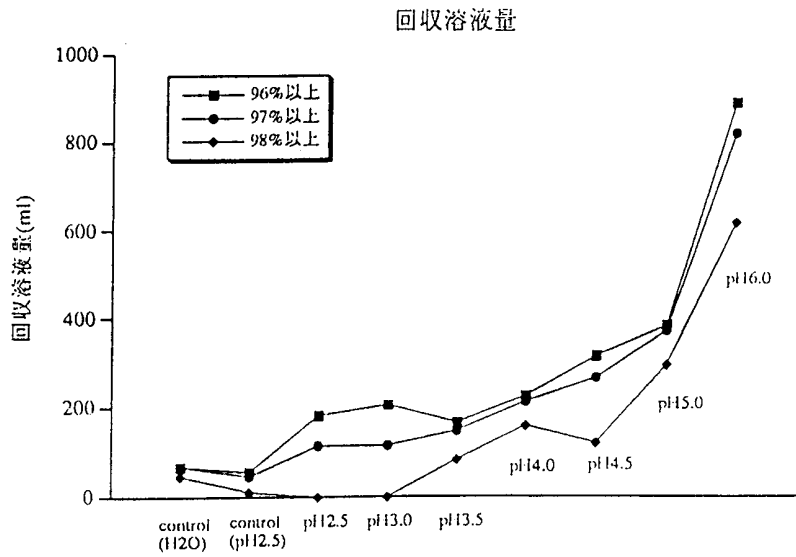
[3]



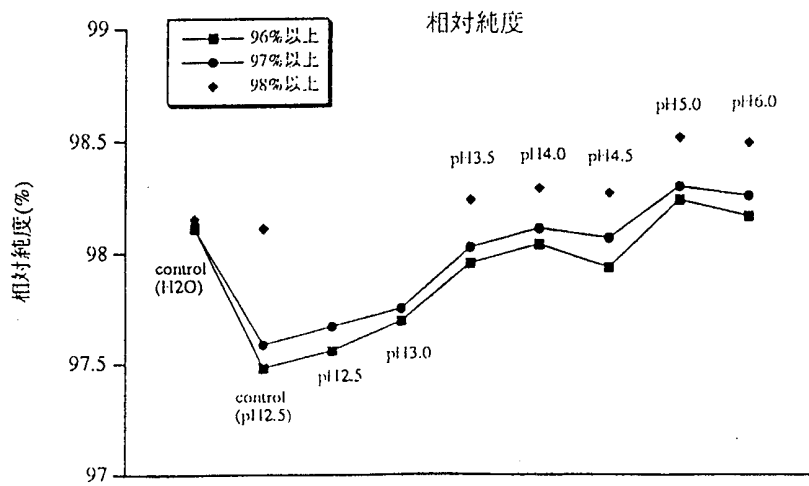
[図 4 A]



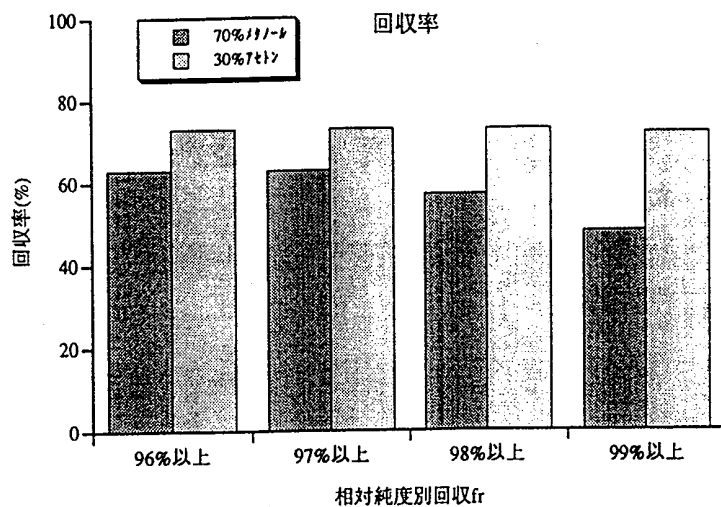
[図 4 B]



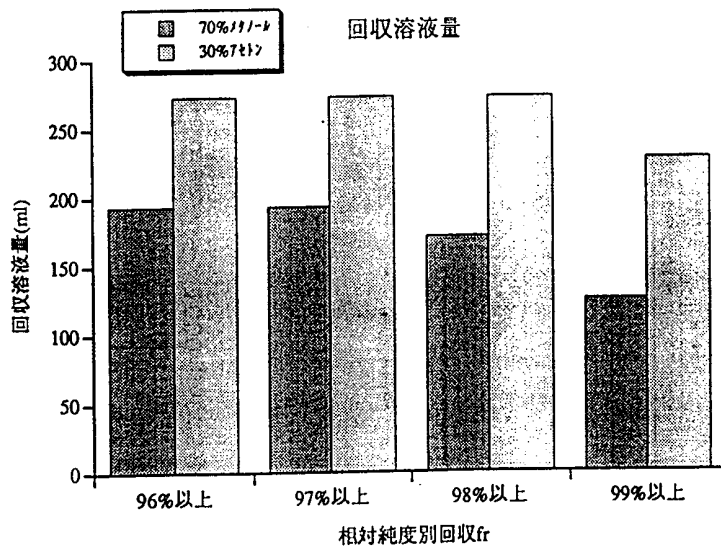
[図 4 C]



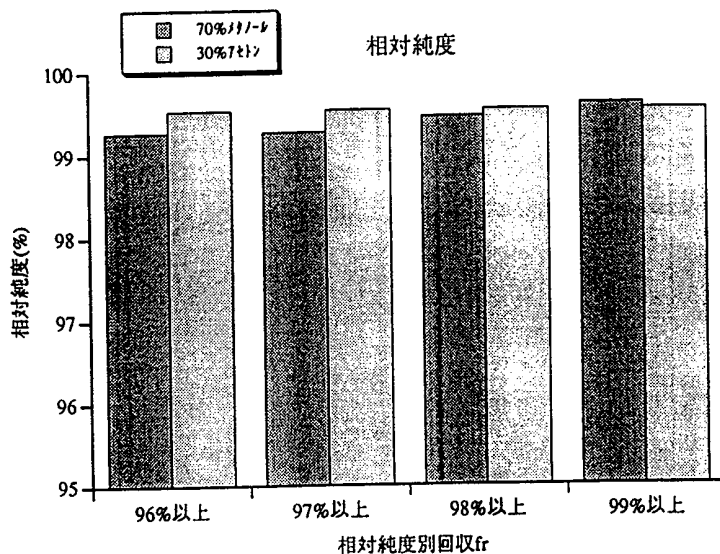
[図 5 A]



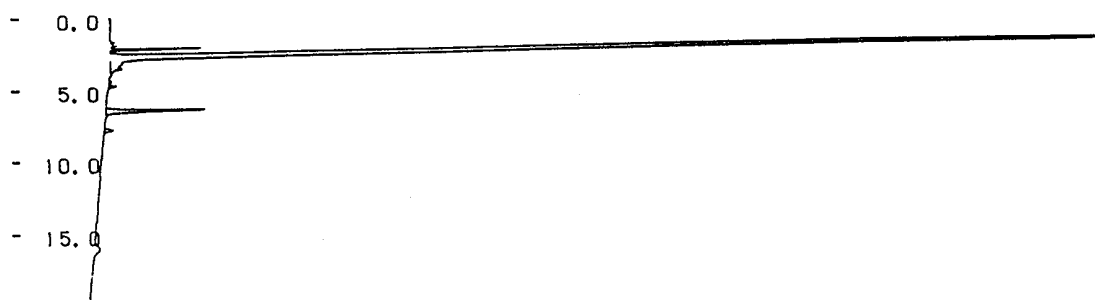
[図 5 B]



[図 5 C]



[6]



[7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03767

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ C07H15/252		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ C07H15/252		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), WPI (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 7-252291, A (Pharmacia et Upjohn S.p.A.), 3 October, 1995 (03. 10. 95) & BE, 898506, A & DE, 3345445, A & GB, 2133005, A & FR, 2538394, A & NL, 8304327, A & SE, 8307134, A & AU, 8322455, A & DK, 8305940, A & FI, 8304650, A & PT, 77883, A & HU, 35270, T & ES, 8504758, A & CA, 1204738, A & AT, 8304400, A & IT, 1155446, A & US, 4861870, A & KR, 9200102, B1	1-6
Y	JP, 58-223062, A (Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.), 24 December, 1983 (24. 12. 83) (Family: none)	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* "A" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 November, 1998 (10. 11. 98)	Date of mailing of the international search report 24 November, 1998 (24. 11. 98)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03767

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NICHOLLS G., et al., "Solid-phase extraction and optimized separation of doxorubicin, epirubicin and their metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 10, Nos. 10-12 (1992) p.949-957	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁶ C 07H 15/252		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁶ C 07H 15/252		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAplus (STN), WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 7-252291, A (ファルマシア・エ・アップ・ジ・ョン・エッセ・ビ・ー・アー) 3. 10月1995(03. 10. 95) & BE, 898506, A & DE, 3345445, A & GB, 2133005, A & FR, 2538394, A & NL, 8304327, A & SE, 8307134, A & AU, 8322455, A & DK, 8305940, A & FI, 8304650, A & PT, 77883, A & HU, 35270, T & ES, 8504758, A & CA, 1204738, A & AT, 8304400, A & IT, 1155446, A & US, 4861870, A & KR, 9200102, B1	1-6
Y	JP, 58-223062, A (東洋曹達工業株式会社) 24. 12月. 1983(24. 12. 83) (ファミリーなし)	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	10. 11. 98	国際調査報告の発送日
		24.11.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 中木 亜希 印	4C 9282
	電話番号 03-3581-1101	内線 3454

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	NICHOLLS G., et al., "Solid-phase extraction and optimized separation of doxorubicin, epirubicin and their metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 10, Nos. 10-12(1992) p. 949-957	1-6