



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102596987 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201080049616. 8

审查员 王子晔

(22) 申请日 2010. 09. 29

(30) 优先权数据

61/256, 344 2009. 10. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 05. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/064472 2010. 09. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/051070 EN 2011. 05. 05

(73) 专利权人 埃克斯利亚制药有限公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 托本·科克

卡斯滕·奥弗巴莱－彼得森

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

C07K 7/62 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

用于纯化粘菌素的方法和纯化的粘菌素组分

(57) 摘要

本发明涉及一种利用反相色谱法纯化粘菌素的方法, 其中, 粘菌素基质在乙酸和高乙醇浓度中上柱并且用低乙醇浓度洗脱。

1. 通过反相色谱法纯化粘菌素的方法,其特征在于,
粘菌素基质在处于乙酸中的 20%-30% 的乙醇中上柱
并且
用 10%-15% 的乙醇洗脱,并且
其中,流动相的 pH 为 7-8。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,上柱的所述乙醇浓度为 20%-24%。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,上柱的所述乙醇浓度为 24%。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,在洗脱液中的所述乙醇浓度为 12%。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述乙酸浓度为 0.1M。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,随后进一步是疏水作用色谱法的步骤。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述流动相的 pH 为 7.5。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,
上柱的所述乙醇浓度为 24%,
在洗脱液中的所述乙醇浓度为 12%,
所述乙酸浓度为 0.1M,
所述流动相的 pH 为 7.5,并且
固定相为 C8- 树脂。

用于纯化粘菌素的方法和纯化的粘菌素组分

技术领域

[0001] 本发明涉及一种纯化抗生素的方法。

背景技术

[0002] 在革兰氏阴性细菌,尤其是绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 和肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*),中提高的多药耐药性提出了一个关键性问题。有限的治疗备选方案已经迫使传染病临床医师和微生物学家重新评估粘菌素(也称作多粘菌素 E)的临床应用,粘菌素是一种与多粘菌素 B 相似但又不完全相同的多粘菌素抗生素。由于粘菌素具有更宽的治疗指数,因此其可具有优于多粘菌素 B 的明显优势。

[0003] 粘菌素于 1947 年首次从多粘芽孢杆菌变种粘菌素 (*Bacillus polymyxa* var. *colistinus*) 中被分离,并且由发酵产生的多肽的混合物组成。主要组分是多粘菌素 E₁、E₂、E₃ 和 E₁-Ile(图 1)。

[0004] 商业上,粘菌素作为硫酸粘菌素出现,其口服用于肠道去污,并且局部施用作为用于皮肤感染的粉剂,以及作为粘菌素甲磺酸钠 (*colistimethate sodium*),其被肠胃外施用以及通过吸入剂使用。已经发现,与粘菌素相比,粘菌素甲磺酸钠的毒性更小且具有更少的不良副作用,但是药效仍然较低(参见 *Critical Care* 2006,10 :R27(doi :10.1186/cc3995),作者为 Falagas 和 Kasiokou)。

[0005] 硫酸粘菌素通常被配制成软膏剂、滴耳混悬剂以及耳用溶液和眼用溶液。硫酸粘菌素也作为混悬剂或片剂被口服给予以治疗肠道感染,或用于抑制结肠菌群。

[0006] 粘菌素甲磺酸钠是可被用于治疗囊性纤维变性患者中的绿脓杆菌感染的粘菌素的半合成前药,并且其最近已被用于治疗多药耐药性不动杆菌感染。粘菌素甲磺酸钠在鲍氏不动杆菌和绿脓杆菌脑膜炎/室炎中也已经被鞘内给药和室内给药。粘菌素甲磺酸钠在水溶液中容易被水解为各种甲烷磺酸衍生物,并且难以进行分析。

[0007] 因为粘菌素是在 50 多年之前被引入临床实践的,因此它的性质从未像现代药物那样被详细记录,例如,涉及药理学、毒理学、杂质含量等的具体要求。

[0008] 由于这个原因,可商购的粘菌素产品除了含有主要组分多粘菌素 E₁ 之外,还含有很多相关的活性和非活性物质/杂质,大部分来源于发酵过程。图 2 中示出了粘菌素的典型 HPLC 色谱图。

[0009] 商品化粘菌素的主要组分,多粘菌素 E₁ (*Polymyxin E₁*),通常构成了干产品的大约 60%。粘菌素产品中一些相关的物质已经被表征(图 1),但是大多数杂质仍是未知的。由 USP (*United States Pharmacopoeia*, 美国药典)指定的硫酸粘菌素的最小效价为“不小于 500 μg/mg”,但是每种组分的具体抗菌活性在很大程度上还是未知的。

[0010] 尽管该产品已经被使用超过 50 年,但是没有粘菌素的标准化定量,而且也没有人公开关于药理学和药代动力学的详细试验。因而,用于大多数感染的粘菌素最佳剂量是未知的。同样地,每种制剂的推荐“最大”剂量也是不同的。各国具有不同的粘菌素一般制备

方法,而推荐剂量则取决于制造商。

[0011] 硫酸粘菌素和粘菌素甲磺酸钠两者均可被静脉注射给予,以及作为气溶胶给予,但是剂量是复杂的。来自一些制造商的粘菌素甲磺酸钠处方以国际单位计,而来自其他制造商的相同产品处方以粘菌素基质 (base) 的毫克数计。这种完全没有任何规则或标准化的剂量使得静脉粘菌素给药对于任何内科医师来说都是一个可怕的经历。

[0012] 与静脉注射治疗一起被描述的主要毒性是肾毒性 (对肾脏造成损害) 和神经毒性 (对神经造成损害),但是这可以反映在早期被给予了非常高的剂量,其比任何制造商目前推荐的剂量要高得多,并且对于肾脏疾病未对其进行调整。与雾化治疗一起被描述的主要毒性是支气管痉挛。

[0013] 在缺少数据支持的情况下,可以推测粘菌素的一些毒性可能归因于存在于目前商品化产品中的相关物质和杂质。而且,当使用“不纯的”粘菌素作为起始原料来合成粘菌素甲磺酸 (colistimethate) 前药时,每一种相关物质和杂质都会形成几种甲磺酸盐衍生物的基质,从而产生非常复杂的终产物—其中每一种个别物质的毒理学性质都是使未知的。

[0014] 基于上述的毒理学和药理学考虑,可以看出,使用“单组份”的各种粘菌素用于医疗目的具有很大的优势。这样的单组份粘菌素将含有非常高比例的主要组分多粘菌素 E₁ (> 90%,与目前 60%相比),所有的主要杂质都被鉴别出并且被表征。

[0015] 单组分粘菌素提供了一些优点:

[0016] 1) 阐明主要组分 (PE₁)、相关物质和杂质的毒理学贡献的可能性

[0017] 2) 经得起新的和更精确的药理学和药代动力学研究检验的产品

[0018] 3) 合成定义明确的 (well-defined) 衍生物的可能性,例如,不产生大量不明确 (ill-defined) 物质的粘菌素甲磺酸

[0019] 4) 对粘菌素和粘菌素甲磺酸二者开发更好的和更精确的分析方法的可能性,并简化调控程序

[0020] 5) 基于清楚的药理学和毒理学数据的明确用药剂量建议

[0021] 6) 粘菌素到需求量大的“现代”抗生素的升级

[0022] 由于专利文献或公共领域中均未描述用于制备单组分粘菌素的工业规模的方法,因此开发此类产品的制造方法是发明人的目的。

[0023] 其次,更长期的目的是对纯化的 PE₁ 进行体外和体内效果的重新研究以及毒理学研究,以便与多粘菌素组 (group) 的之前的研究进行比较。迫切地需要这样的随机和对照试验以便进一步阐明关于多粘菌素的效果和安全性的各种问题 (Crit Care Clin. 2008 Apr ;24(2) :377-91,作者为 Micholopoulos 和 Falagas)。

发明内容

[0024] 本发明涉及一种用于纯化粘菌素组分,并且尤其是主要组分,多粘菌素 E₁ 的方法。

[0025] 本发明涉及一种生产粘菌素主要组分的几乎纯制剂的方法,该主要组分是多粘菌素 E₁ (90-98%纯度),其被称为粘菌素单组分。

[0026] 该方法是一种使用低毒性溶剂的简单的色谱方法。该方法涉及反相 (RP) 色谱法,其使得能够将多粘菌素 E₁ 纯化达到超过 90%的纯度,随后是疏水作用色谱法 (HIC)。

[0027] 该方法的特征是:

- [0028] • 粘菌素基质在乙酸和高 (4M) 乙醇浓度中上 RP 柱
- [0029] • 用低 (1.6-2M) 乙醇浓度洗脱。
- [0030] 出人意料的是,该方法能够被用来从其它主要粘菌素组分中有效地分离多粘菌素 E₁。
- [0031] 涉及合适的 RP- 材料的鉴定工作在 10×250mm 的钢柱上以实验室规模进行。
- [0032] Merck LiChrospher 60 RP- 选择 B, 15 μm (C8) 被证明是用于以实验室规模从粘菌素基质纯化 PE₁ 的合适树脂,并且该实验室方法在 50×850mm 钢柱上从 1 克按比例放大到 50 克的水平。
- [0033] 开发了一种将粘菌素基质溶解于 24% (4M) 乙醇和 0.1M 乙酸并被分成多粘菌素 E 片段的方法。该主要组分 PE₁ 以 60% 的典型回收率和 94-98% 的相对色谱纯度被分离。
- [0034] 在欧洲药典 (European Pharmacopoeia, EP) 中,一批 / 一批次硫酸粘菌素的效价被定义为多粘菌素因子 PE₁、PE₂、PE₃、PE₁-Ile 和 PE₁-7MOA 的总和的 % 含量,在“原样 (as is)”的基础上由 HPLC 测定。这些因子的总效价应当构成不少于 77.0%。此外,EP 规定特定因子的最大限值 (NMT ; 不多于),例如 PE₁-Ile (NMT 10%)、PE₁-7MOA (NMT 10%)、PE₃ (NMT 10%) 和主要杂质 NMT 4%。
- [0035] 通过利用所描述的纯化方法,终产物具有如下的典型组成: PE₁ (94-98%)、PE₂ (0-0.1)、PE₃ (0.0)、PE₁-Ile (0.2-1.0%)、PE₁-7MOA (0.5-2.0%) 和总剩余杂质 0.5-2.0%。

附图说明

- [0036] 图 1. 硫酸粘菌素、硫酸多粘菌素 E₁ 和相关物质的主要组分的分子结构
- [0037] 图 2. 粘菌素 Ph. Eur. 化学标准物质的 HPLC 色谱图
- [0038] 图 3. 该曲线图说明了在粘菌素基质的纯化过程中作为流分 (fraction) 数的函数的相对色谱纯度;该曲线图中的 f1-E1 和 f2-E1 在应用的说明部分中统称为 f₁;eE1 等于 e₁/e₂, eeE1 等于 e₃,而 eee...是较少的未知杂质的总和
- [0039] 图 4. 该曲线图说明了在粘菌素基质的纯化过程中作为流分数的函数的各种组分的峰面积;该曲线图中的 f1-E1 和 f2-E1 在应用的说明部分中统称为 f₁;eE1 等于 e₁/e₂, eeE1 等于 e₃,而 eee...是较少的未知杂质的总和
- [0040] 图 5. 带有主要杂质的粘菌素单组分 (P E₁) 的 HPLC 色谱图

具体实施方式

- [0041] “粘菌素”意指包括抗菌肽组分的任何混合物,其中该主要组分是多粘菌素 E₁ 或其盐。
- [0042] “多粘菌素 E₁”意指包括之前指定的粘菌素 A, 以及由化学文摘 (Chemical Abstracts) 指定的化合物 7722-44-3, 以及 N2-(6- 甲基 -1- 氧代辛基) -L-2,4- 二氨基丁酰基 -L- 苏氨酰基 -L-2,4- 二氨基丁酰基 -L-2,4- 二氨基丁酰基 -L-2,4- 二氨基丁酰基 -D- 亮氨酰基 -L- 亮氨酰基 -L-2,4- 二氨基丁酰基 -L-2,4- 二氨基丁酰基 -L- 苏氨酸环 (10-4) - 肽, 以及粘菌素 IV。
- [0043] “粘菌素基质”意指包括含有 30-70% 多粘菌素 E₁ 的任何粘菌素。

- [0044] “硫酸粘菌素”意指包括粘菌素的任何硫酸盐。
- [0045] “粘菌素甲磺酸 (colistimethate)”意指包括粘菌素的任何甲烷磺化衍生物。
- [0046] “组合物”是包含多于两种不同化合物的任何混合物,例如,两种活性药物成分的混合物,或者活性药物成分与一种或多种药用赋形剂的混合物。
- [0047] 在本申请中使用的术语“组分”或“多种组分”是指组合物中的特定化合物。相应地,“较少组分”是组合物中以相对小的量存在的化合物。
- [0048] “药物组合物”是适合体内使用的任何组合物。因此,这样的组合物能够被皮肤、皮下、静脉注射、肠胃外、口服给予等。
- [0049] “分离”是其中将所需化合物与另外的化合物(分析地或制备地)拆分(resolve)的任何方法。
- [0050] “纯化”是通过其使所需化合物的浓度增加的任何分离方法。
- [0051] “色谱法”是涉及固定相和流动相的任何纯化技术。
- [0052] “固定相”是包含能够保留化合物的配体(ligand)的任何表面。
- [0053] “配体”是固定相的基团(moiety),在该基团处发生化合物的结合。
- [0054] “流动相”是能够在确定方向上通过或沿着固定相渗过(percolate)的任何流体、溶剂、液体或混合物。
- [0055] “反相色谱法”是较强极性 or 带电组分在较弱极性组分之前被洗脱的任何色谱法。
- [0056] “疏水作用色谱法”基于固定相的非极性配体与非极性化合物或化合物的非极性部分之间的相互作用的任何色谱法。
- [0057] “高乙醇浓度”意指乙醇浓度高于或等于以体积计 20%,通常为 20% -30%。
- [0058] “低乙醇浓度”意指乙醇浓度低于以体积计 20%,通常为 10-15%。
- [0059] “% v/v”意指体积百分比。
- [0060] 商品化粘菌素基质是许多密切相关的十肽-脂肪酸酰胺的混合物,包括多粘菌素 E₁、多粘菌素 E₂、多粘菌素 E₃ 和多粘菌素 E₁-异亮氨酸(图 1)。
- [0061] 从粘菌素基质中分离主要组分多粘菌素 E₁(PE₁)的愿望引起了人们对反相(RP)HPLC 方法是否适合用于其分离,并获得高相对色谱纯度(> 90%)PE₁的调查研究。
- [0062] 文献中仅提供了非常少的 RP 分离方法,并且所使用的主要有机溶剂是乙腈和甲醇。这些溶剂是有毒的,并且应该在中试规模(pilot)生产和大规模生产中避免使用。然而,采用从 0 至 60%乙醇梯度的使用硫酸粘菌素的微克水平 C18-HPLC 分离试验出人意料地显示出,对于多粘菌素 E₁ 的工业用途的纯化方法可以使用相对无毒的溶剂乙醇。
- [0063] 通过发酵和纯化生产起始材料(粘菌素基质),并且在整装物质(未分装物质, bulk substance)硫酸粘菌素的生产中,该起始材料是中间体。该起始材料含有大约 60% 的 PE₁,批次之间有一些百分比的不同。初始目标是获得相对色谱纯度> 90%的硫酸多粘菌素 E₁。出于作为目标(靶标)的目的,筛选了一系列柱材料用基于乙醇的洗脱系统。
- [0064] 多粘菌素 E₁(图 1)具有带有极性十肽部分和非极性脂肪酸部分的离子去污剂特性。该分子由连接到 6-甲基-辛烷酰化线性三肽的环七肽组成。由于该分子含有 6 个 1,4-二氨基丁酸(DAB)的部分,其中一个参与三肽成键(bond),5 个主要氨基基团与它们相应的氨(NH₄⁺)基团平衡,构成分子的强极性部分。
- [0065] RP-树脂和该分子之间的分子间相互作用预期在脂肪酸基团和肽部分的非极性区

域处发生。

[0066] 为了监测 HPLC- 流分和 HPLC- 池 (pool), 基于标准方法开发了分析型 HPLC- 方法。改进的方法显示了少量相关组分 (f_1, e_1, e_2) 在 PE_1 主峰之下, 而这在利用传统 HPLC 方法时是不可见的。

[0067] 实验

[0068] 准备型 HPLC

[0069] 10×250 柱: 为了以毫克量级筛选柱材料, 使用 10×250 钢柱。该柱用悬浮在 96% 乙醇中的各种测试树脂填充。

[0070] 50×830 柱: 为了以克量级进行制备性纯化, 如下所述使用 50×850mm 钢柱。所选择的柱材料, 将约 1kg Merck LiChrosphere 60 RP 选择 B (15 μ m) 悬浮在 96% 乙醇中并将其填充入柱中。将其上部法兰 (flange) 封上 (attach) 并以 50 巴的压力降活塞向上推, 直到除去所有过量的乙醇。通过施加 1ml 的 0.1mg/ml 碘化钾溶液来测试该柱, 并在 AUFS = 0.05 且流速为 55.5ml/min, 在 227nm 处测量吸附作用。所记录的峰是一条具有令人满意的对称的窄高斯曲线。

[0071] 该制备型 HPLC 系统由以下部分组成:

[0072] 柱: 具有由 Dan Process A/S 制造的动态轴向压缩的 10×250mm 不锈钢 Merck 柱和 50×850mm 不锈钢柱

[0073] 泵: Waters Deltra Prep 4000, 具有 0.5–150ml/min 的流速间隔, 具有 4 个不同的溶剂端口, 在低压侧有一个混合阀 (mix-valve)

[0074] 检测器: Waters 486 可调吸光度检测器 (Tunable Absorbance Detector)

[0075] 积分仪: Merck-Hitachi D-2000 色谱 - 积分仪 (Chomato-Integrator)

[0076] 流分收集器: Waters 流分收集器

[0077] 在 230nm 处检测洗脱液的吸光度, 乙酸在该处存在截止 (cut-off)。在较短波长处, 洗脱液显示太多的干扰。将毫克量级的流分收集于 25ml 试管中, 而将克量级的流动分收集于 250ml 蓝盖瓶中。

[0078] 为了在每次 HPLC- 运行后再再生 10×250mm 和 50×850mm 柱, 使用含有 24% 乙醇和 50% 在 0.1M CH_3COOH 中的 1,2- 丙二醇的混合物。偶尔会在 50×850mm 柱上观察到高反压, 然后将其重新包装或用 96% 乙醇冲洗直至压力变得正常。

[0079] 分析型 HPLC

[0080] 所使用的柱是 Novapak 4.6×150, 4 μ m, C18, 乙腈作为流动相。 CH_3CN - 溶液的浓度在 5 分钟的时间间隔内从 21% (在 10 分钟等度运行后) 增加到 30%。该柱不是恒温的, 而是在环境温度 (23±2°C) 运行。

[0081] 该分析型 HPLC- 系统由以下部分组成:

[0082] 柱: Waters Novapak 4.6×150, 4 μ C18 和等价 4.6×250 柱

[0083] 泵: 2psc. Waters 510, 带有 Waters 泵控制模块

[0084] 检测器: Waters 490 E 可编程多波长检测器

[0085] 流分收集器: Waters 717, 加上自动进样器

[0086] 该系统由 Waters 软件 Millenium 控制。

[0087] 所测试的树脂的概况:

- [0088] 1)Merck No. 9303 LiChroprep RP-18, 25-40 μm , 批次 :L 275703 614。
- [0089] 2)Merck No. 9324 LiChroprep RP-8, 25-40 μm , 批次 :L 240124 541。
- [0090] 3)Merck No. 11023 LiChrospher 60 RP- 选择 B, 15 μm , (C8), 批次 :L 139923 633。
- [0091] 4)Merck No. 150385 Hibar **Fertigsäule** RT LiChrospher, RP-18, 15 μm , Cat. 50014。
- [0092] 5)Eka Nobel Kromasil-100 Å, C8, 16 μm , 批次 :DT0026。
- [0093] 6)ToosoHaas Amberchrom CG 71 S, 35 μm , 批号 23770319。
- [0094] 7)ToosoHaas No. 22227 Toyopearl MD-P 醚, 35 μm , 弱疏水性
- [0095] 8)ToosoHaas No. 22225 Toyopearl MD-P 丁基, 35 μm , 强疏水性
- [0096] 用于 10×250 柱试验的化学药品:
- [0097] 硫酸粘菌素, 批次 :A4660314, Axellia ApS, 丹麦哥本哈根
- [0098] 粘菌素基质, 批次 :A1551701, Axellia ApS, 丹麦哥本哈根
- [0099] 乙醇, 96%, “Danisco 蒸馏器”, Danisco A/S
- [0100] 甲醇, Merck LiChrosolv no. 6018
- [0101] 二甲亚砜, Merck Uvasol No. 2950
- [0102] 1,2- 丙二醇 (重蒸, reinst), Merck no. 7478
- [0103] 2- 丙醇, LiChrosolv 梯度等级, Merck No. 1040
- [0104] 乙酸, 100% G. R. Merck No. 63
- [0105] 1- 甲基吡咯烷酮 -(2) z. s. Merck No. 806072
- [0106] 三乙胺, Pierce No. 25108
- [0107] 四氢呋喃, Fluka No. 87367
- [0108] 乙酸铵 (分析纯, p. a.), Merck No. 1116
- [0109] 硫酸铵 (分析纯, p. a.), Merck No. 1217
- [0110] 硫酸 98% (分析纯, p. a.)
- [0111] 氢氧化钠颗粒, GR, Merck No. 6498
- [0112] 超纯水, 纯化实验室, R&D, FCD, Axellia ApS, 丹麦哥本哈根
- [0113] Millipore, HV 型薄膜过滤器, 0.45 μm
- [0114] 用于 50×825 柱试验的化学药品:
- [0115] 乙醇 96% 和 99%, 来自 Danisco 蒸馏器, Danisco A/S
- [0116] 乙酸, 100% G. R. Merck No. 63
- [0117] 氢氧化钠颗粒, GR, Merck No. 6498
- [0118] NaOH, 27% 生产部
- [0119] 氢氧化钾, USP XIX, Ferak Berlin No. 20907
- [0120] 10×250 柱试验:
- [0121] 由于与树脂的强结合、明显的拖尾 (tailing)、低色谱纯度或低回收率, 以下的色谱树脂被证明不适合用于分离工作: ToosoHaas Amberchrom CG 71 S; ToosoHaas Toyopearl MD-P 醚, 35 μm , ToosoHaas Toyopearl MD-P 丁基, 35 μm ; Merck LiChroprep RP-8, 25-40 μm ; Merck Hibar **Fertigsäule** RT LiChrospher, RP-18, 15 μm ; Eka Nobel

Kromasil-100 Å, C8, 16 μm

[0122] 对于使用 LiChroprep C18, 25-40 μm 的第一次 10×250 柱试验, 在 60 分钟内乙醇梯度从 0% 至 60%, pH ~ 3.5 (50mM HAc), 应用 11mg 硫酸粘菌素, 获得了约 90% 良好产率的相对色谱纯度 (RCP)。然而, 当在相同条件下通过试图在 45 分钟内施加 10-25% 乙醇梯度来减小乙醇浓度时, 没有观察到分离和明显拖尾。

[0123] 用 5mM NH₄HSO₄ 在 pH = 2.5 的相似试验使得化合物在柱上完全结合。该试验和相似的试验强烈表明, 粘菌素基质而不是硫酸粘菌素应当被用于选定条件的 PE₁ 纯化。

[0124] 如果 1,2-丙二醇 (1,2-PG) 作为乙醇的一部分的代替品被加入, 例如, 在 24% 乙醇和 20% 1,2-PG 的浓度水平下, 且乙酸水平 (pH = 3) 增加至约 1%, 这出人意料地得到了一种 RCP 约为 90% 的 PE₁ 产品, 产率为 70%。

[0125] 在这些初步试验的基础上, 得出了这样的结论, 即乙酸对树脂 (LiChroprep C18) 和洗脱液之间的化合物平衡具有积极影响, 并且应当使用溶解于稀乙酸的粘菌素基质而不是硫酸粘菌素。然而, 使用 1,2-丙二醇 / 乙醇混合物引起该柱材料的明显压降, 并且因而认为这种特定的树脂和溶剂混合物不适合按比例放大。

[0126] 显然, 不仅是脂肪酸部分和非-极性氨基酸参与了柱结合, 而且氨基-和铵基基团也参与了柱结合。

[0127] 上述实验给出了一些出人意料的结果, 例如, a) EHS- 友好的溶剂乙醇作为用于粘菌素反相 (RP) HPLC 分离的洗脱液是有用的, 和 b) 分离应当在乙酸存在下用粘菌素基质完成, 而不是使用用于进一步纯化的硫酸粘菌素。虽然树脂 LiChroprep C18 表现出有希望分离的特性, 但是没有证据表明其适合用于按比例放大。

[0128] 所列出的可商购色谱介质是的范围很大, 但是通过彻底检查和选择, 我们成功地确定了一种来自 Merck 的适合的候选物, 即 LiChrospher 60 RP- 选择 B 15 μm (C8)。

[0129] 0.1M 乙酸中从 5 至 24% 乙醇线性梯度的使用得到了几乎没有拖尾的有希望的分离。0.1M 乙酸 (pH = 3) 中从 5% 至 15% 乙醇梯度取得了很好的效果, 但仅具有 85-90% PE₁ 的 RCP 并且产率低。

[0130] 当尝试反相乙醇梯度 (即在高乙醇浓度施加而在较低乙醇浓度洗脱) 时, 出现了重大突破。所进行的具有以下参数的第一试验给出了具有 90% -95% PE₁ 和约 70% 产率的池 (pool)。

[0131] 平衡: 5% 乙醇在 0.1M 乙酸中

[0132] 施加: 将 110mg 粘菌素基质溶解于 4ml 在 0.1M 乙酸中的 30% 乙醇

[0133] 洗脱液: 15% 乙醇在 0.1M 乙酸中, 温度为 60°C

[0134] 温度: 40°C

[0135] 洗脱液流速: 2.22ml/min

[0136] 为了在固定相和更快洗脱之间达到粘菌素化合物的平衡, 选择较高的温度, 但试验显示较高的温度对结果并没有任何显著影响。柱箱和流动相二者的温度均因此而从 40° / 60° 减小到 35° / 50°, 池纯度和产率没有任何显著变化。最后, 0.1M 乙酸中 5 至 15% 乙醇梯度在 30° / 40° 运行具有较好的结果, 这证实了反相梯度实际上是相对色谱纯度、产率和拖尾情况出现较大积极变化的原因。

[0137] 应注意, 在开发工作中实施了经修改的分析型 HPLC 方法, 并且该新方法显示出了

一些相关物质, f_1 和 e_1/e_2 , 以前它们均被主 E_1 峰掩盖。

[0138] 相关物质 f_1 在 PE_1 峰前面洗脱, 而物质 e_1/e_2 作为在 PE_1 峰的尾部具有两个左右分裂最大值的双峰洗脱。这两种物质特别地难以从 PE_1 中分离, 并且在将来的制备型 HPLC 方法的优化中构成了纯化的挑战。尤其参见图 3 和图 4, 其中 PE_1 和相关物质的分离用示出了作为 HPLC 流分的函数 (function) 的组分的分布图来说明。

[0139] 在图 3 中, 将多粘菌素 E_1 的相对色谱纯度与作为流分数的函数的相关物质进行比较。最难以从 PE_1 中分离的相关物质是 e_1/e_2 , 而 E_1 - 异亮氨酸、 f_1 和 e_3 (在 e_1/e_2 之后洗脱) 较容易去除。图 4 示出了从产率角度的结果, 其中组分峰的整合作为流分数的函数作图。主要的池典型地跨越流分 7 至 12, 但是可以通过缩小流分选择来增加纯度。

[0140] 实施例 - 从粘菌素基质中纯化多粘菌素 E_1 的步骤

[0141] 实施例 1-RP-HPLC 纯化; 小量制备规模

[0142] 设备: 钢柱 $10 \times 250\text{mm}$ ($\phi=10\text{ mm}$)

[0143] Waters Delta Prep 4000 Prep. Chrom. 系统

[0144] Waters 4000 系统控制器

[0145] Waters 486 可调吸光度检测器

[0146] Waters 流分收集器

[0147] Merck Hitachi D-2000 色谱 - 积分仪

[0148] 树脂: LiChrospher 60 RP- 选择 B Merck No. 11023

[0149] 流速: 2.22ml/min. (按比例提高至 $300 \times 700\text{mm} \sim 2\text{L/min}$)

[0150] λ : 230nm

[0151] AUFS: 2 (检测器灵敏度 ~ 最低水平)

[0152] A- 缓冲液: 在超纯水中 12% 乙醇 (96%) 溶解于 $0.10\text{M CH}_3\text{COOH}$ 中

[0153] 应用溶胶: 通过加入 5 酸当量的 $\text{CH}_3\text{COOH} \sim 2.5\text{mmol} \sim 0.15\text{ml}$ 100% CH_3COOH (17M), 将粘菌素基质, $600\text{mg} \sim 0.5\text{mmol}$ 溶解于 $0.10\text{M CH}_3\text{COOH}$ 中的 15ml 24% 乙醇 (自 96%) 中; 用 2M NaOH 调节至 $\text{pH} = 7.5$; 溶液经薄膜过滤 ($0.45\text{ }\mu\text{m}$)

[0154] 1) 柱的平衡: 用 A- 缓冲液平衡

[0155] 2) 施加: 粘菌素乙酸盐溶液 (40mg/ml) 以 2.22ml/min 施加, 随后施加 1ml A- 缓冲液通过进料管

[0156] 3) 洗脱: 柱子立即用 A- 缓冲液洗脱, 并且在 1ml 流分 $\sim 2.22\text{ml}$ 中收集流出物

[0157] 4) 柱的洗涤: 施加 5ml 96% 乙醇, 随后施加 A- 缓冲液直到吸收已减小至零水平

[0158] 5) HPLC 分析: 稀释样品直到 E_1 的面积达到 $20\text{--}30 \times 10^6\text{AU}$; 高粘菌素标准典型地达到 $20 \times 10^6\text{AU}$; 通过使用粘菌素 NovaS (运行 30 分钟) 来分析样品

[0159] 实施例 2-RP-HPLC 纯化; 中试规模

[0160] 设备: 钢柱 $50 \times 830\text{mm}$ ($\phi=50\text{ mm}$), “Dan- 方法”

[0161] Waters Delta Prep 4000 Prep. Chrom. 系统

[0162] Waters 4000 系统控制器

[0163] Waters 486 可调吸光度检测器

[0164] Waters 流分收集器

[0165] Merck Hitachi D-2000 色谱 - 积分仪

- [0166] 树脂:LiChrospher 60 RP- 选择 B, Merck No :11023, 1Kg
- [0167] 流速:65ml/min. (按比例提高至 300×700mm ~ 2L/min)
- [0168] λ :230nm
- [0169] AUFS:2(检测器灵敏度~最低水平)
- [0170] A- 缓冲液:在超纯水中 12%乙醇(96%) 溶解于 0.10M CH_3COOH 中
- [0171] 应用溶胶:通过加入 5.83 酸当量的 CH_3COOH ~ 245mmol ~ 14.5ml 100% CH_3COOH (17M), 将粘菌素基质, 50g ~ 42mmol(按照原样(as is)) 溶解于 1000ml 24%乙醇(96%) 中; 用 2M NaOH 调节至 pH = 7.5; 溶液使用硅藻土作为助滤剂经薄膜过滤(0.45 μm)
- [0172] 离子强度:4-6mS/cm
- [0173] 1) 柱的平衡:用 A- 缓冲液平衡
- [0174] 2) 施加:在 14 分钟内以 65ml/min 施加粘菌素乙酸盐溶液(48mg/ml), 随后在 0.1 分钟内施加~ 43.5g A- 缓冲液
- [0175] 3) 洗脱:柱子用 A- 缓冲液洗脱直到吸收已降至渐近线 $0.010\text{V} \pm 10\text{mV}$, 并且在 18 种流分~ 585ml 持续 3 分钟收集流出物
- [0176] 4) 柱的洗涤:施加 24%乙醇和 50% 1,2 丙二醇的混合物 200ml(4 分钟, 50ml/min), 随后施加 A- 缓冲液直到吸收已减小至零水平
- [0177] 5) HPLC 分析:稀释样品直到 E_1 的面积达到 $20-30 \times 10^6 \text{AU}$ ($5 \times$); 高粘菌素标准典型地达到 $20 \times 10^6 \text{AU}$; 通过使用粘菌素 NovaS(运行 30 分钟) 来分析样品。
- [0178] 实施例 3- 总纯化和最终处理; 大规模
- [0179] 硫酸粘菌素单组分(多粘菌素 E_1) 是一种发酵产品, 这意味着它最初的样子是发酵液。多粘菌素 E_1 含有各种各样的杂质且从每升含有仅几克多粘菌素 E_1 和相关物质的发酵液中被回收和纯化。
- [0180] 发酵液的回收物包含粘菌素(多粘菌素 E_1) 的沉淀物和相关物质以及通过离心的初级分离物。二次纯化由反相色谱和沉淀构成, 就多粘菌素 E_1 而言产生更纯的产物。硫酸粘菌素单组分产物中存在的相关物质和杂质主要是共发酵物质。
- [0181] 在粘菌素的发酵过程中, 生成结构上相关组分的复杂混合物, 具有每一种多芽孢杆菌菌株的比例特征。例子是:
- [0182] - 脂肪酸链的变化, 例如生成多粘菌素 E_1 (具有 6- 甲基辛酸) 或多粘菌素 E_2 (具有 7- 甲基辛酸),
- [0183] - 分子中氨基酸的取代, 例如如果粘菌素中的 D- 亮氨酸被 D- 苯基丙氨酸取代, 则生成相关的抗生素多粘菌素 B。如果多粘菌素 E_1 中的 L- 亮氨酸被异亮氨酸取代, 则生成多粘菌素 E_1 - 异亮氨酸
- [0184] 通过制备型 HPLC 的纯化
- [0185] 制备以下缓冲液:
- [0186] 缓冲液 I:1.6-2M 乙醇和 0.1-0.15M 乙酸。该缓冲液在使用前通过 0.45 μm 滤膜过滤。
- [0187] 缓冲液 II:约 6.8M 1,2- 丙二醇、约 4M 乙醇和约 0.1M 乙酸。该缓冲液在使用前通过 0.45 μm 滤膜过滤。
- [0188] 用约 40 升缓冲液 I 来平衡体积约 48 升的 HPLC 柱(直径 30cm)。流速是 0.8-1.2l/

min(同样的流速被用于所有 HPLC 步骤)。柱子用约 8 升缓冲液 II,随后用约 50 升缓冲液 I 再生或直到 UV- 信号回到基线。

[0189] 称量 1000-1500g 的一批真空干燥的粘菌素基质,并将其悬浮于 20-30 升 4M 乙醇中。该悬浮液通过加入 0.3M 乙酸搅拌 30 分钟而被溶解。用氢氧化钠将 pH 调节至约 7.5,并且该溶液通过 0.45 μ m 薄膜过滤器进行过滤。该粘菌素乙酸盐溶液通过 HPLC 柱并且结合于树脂。HPLC 柱用约 160 升缓冲液 I 洗脱。按流分收集流出物。依照预先设定的规则来收集流分,而丢弃其余流分。对于多粘菌素 E₁ 而言,从流分中收集纯度至少为 92% 的部分。多粘菌素 E₁ 的浓缩和多余乙醇的去除通过反渗透而完成。该池被浓缩至约 50g/l 并随后用 DI- 水(约 8 体积)渗析。

[0190] 通过疏水作用色谱法(HIC)的纯化

[0191] 制备以下缓冲液:

[0192] 校准缓冲液:约 200mM (NH₄)₂SO₄;用稀释的氨水将 pH 调节至约 7

[0193] 洗脱缓冲液:约 200mM (NH₄)₂SO₄;用乙酸将 pH 调节至约 3.7

[0194] 用 250 升校准缓冲液来平衡体积约 90 升的 HIC 柱(直径 35cm),流速约 1.7l/min,随后是约 200 升洗脱缓冲液,流速约 1.0l/min。

[0195] 通过加入 (NH₄)₂SO₄ 将经过反渗透的粘菌素乙酸盐溶液中的盐含量调至约 200mM,并用稀释的氨水将 pH 调节至约 7。该粘菌素乙酸盐溶液的浓度是 15-20g/l。该溶液通过 HIC 柱,流速为 950-1050ml/min。洗脱用 10 倍床体积 (bed volume) 进行。流出物流分的收集通过 PLC 自动完成。从每个流分中取得样品并进行分析。依照预先设定规则来收集流分,产生就多粘菌素 E₁ 而言纯度为 94-98% 的批次。多粘菌素 E₁ 的浓缩和硫酸铵的去除通过超滤而完成,以达到 10-20g/l 的浓度。

[0196] 粘菌素基质单组分的沉淀

[0197] 溶液用 DI- 水稀释至 10g/l 并搅拌直至它均匀。用氢氧化钠将 pH 调节至 9.6-9.8,并且当粘菌素基质单组分沉淀时继续搅拌。沉淀物在压滤机上经过滤被回收。当过滤完成时,用约 800 升去离子水清洗滤饼,用空气置换。从压滤机中取出粘菌素单组分滤饼并储存于冰箱中。

[0198] 向硫酸粘菌素单组分的转化

[0199] 将粘菌素基质单组分悬浮并溶解于 DI- 水中,同时搅拌。用稀硫酸将 pH 调节至 5.0。该溶液通过 0.45 μ m 滤膜过滤。

[0200] 冷冻干燥、研磨和储存

[0201] 将经过滤的溶液注入不锈钢冷冻干燥托盘中,并利用 PIC 控制温度分布在 -25°C → +45°C 的范围内冷冻干燥约 70 小时。从冷冻干燥机中取出干燥的产物并研磨以获得所需的颗粒分布。

[0202] 分析型 HPLC 方法

[0203] 方法 1:用于从发酵到粘菌素基质的过程控制的 HPLC

[0204] 设备:Waters 自动 HPLC 设备,由以下组成:

[0205] 泵:型号 6000 A/510

[0206] 注射器:WISP 712 A

[0207] 检测器:型号 441

- [0208] 预过滤器:Guard Pak, Resolve C18(可以省略)
- [0209] 柱:Resolve C18, 10×8.5 微米或 Nova-Pak, 4 微米
- [0210] 柱配件:RCM 8×10
- [0211] 方法:等度
- [0212] 流动相:
- [0213] 缓冲液:十水硫酸钠 16.1g (0.05M)、浓乙酸 0.56ml (0.01M), 三乙胺 20ml (0.15M), 加水至 1000ml。用磷酸将 pH 调节至 2.5。
- [0214] 替代缓冲液:硫酸钠 0.04M、甲磺酸 0.56M、三乙胺 0.087M, pH 为 3.0。
- [0215] 在使用前,将 170g 乙腈溶解于缓冲液中制备 1000ml。
- [0216] 该溶液用氦气除气 15 分钟。
- [0217] 分析程序:
- [0218] 流速:1.5ml/min,或者 1.0ml/min。
- [0219] 温度:环境温度
- [0220] 注射体积:20 微升,或者 25 微升。
- [0221] 检测:214nm,0.1AUFS 或 1.0AUFS。
- [0222] 运行时间:30 分钟。
- [0223] 标准:硫酸粘菌素的有效标准品,溶解于水以制备成 1mg/ml。
- [0224] 标准品:粘菌素基质,在 0.1M 盐酸中 1.0mg/ml。
- [0225] 分析样品:稀释至含有 0.5-1mg/ml。稀释剂:3%磷酸,40ml,和乙腈,60ml。如果浑浊则离心。
- [0226] 方法 2:用于粘菌素基质以获得最终大批量产物的 HPLC
- [0227] 设备:Waters 自动 HPLC 设备,由以下组成:
- [0228] 泵:型号 510
- [0229] 注射器:717 附加自动取样器
- [0230] 检测器:490E
- [0231] 预滤器:Guard Pak, Nova-Pak, C18
- [0232] 柱:Nova-Pak, C18, 60 Å, 4 μm, 150×4.6mm
- [0233] 柱室:Jones 色谱型号 7955
- [0234] 试剂:
- [0235] 硫酸钠,无水,预分析
- [0236] 三乙胺, HPLC 级
- [0237] 甲磺酸, ≥ 99%
- [0238] 超纯水
- [0239] 缓冲液:硫酸钠,无水,28.4g (0.10M), 三乙胺 14.0ml (0.05M), 甲磺酸 10.0ml (0.06M), 用超纯水定容至 2000ml。
- [0240] A-洗脱液:50%缓冲液,35%超纯水,15%乙腈。用甲磺酸调节至 pH 2.0。
- [0241] B-洗脱液:50%缓冲液,20%超纯水,30%乙腈。用甲磺酸调节至 pH 2.0。
- [0242] 样品制备:
- [0243] 粘菌素乙酸盐:在 0.05M 乙酸中 1-2g/l。搅拌 30 分钟并通过 0.45 μm 薄膜过滤

器过滤。

[0244] 标准品：

[0245] 制备两种内部标准品，一种具有高活性 (2000 μ g/mg) 而另一种具有低活性 (400 μ g/mg)。

[0246] 分析程序：

[0247] 流速：0.8ml/min。

[0248] 柱温：25℃

[0249] 检测：214nm

[0250] 时间常数：1.0 秒

[0251] AUFS：1.000AU

[0252] 自动归零：开

[0253] Wisp 温度：25℃

[0254] 注射：20 μ l/次 (run)。

[0255] 梯度程序：

[0256]

梯度		时间	流速 (ml/min)	%A	%B	%C	曲线
	1	0.00	0.8	67.0	33.0	0.0	0
	2	15.00	0.8	67.0	33.0	0.0	6
	3	25.00	0.8	30.0	70.0	0.0	6
	4	30.00	0.8	30.0	70.0	0.0	6
	5	31.00	0.8	67.0	33.0	0.0	6
	6	40.00	0.8	67.0	33.0	0.0	6
40 分钟后的变化不是检测的部分，仅在一系列分析后进行							
	7	41.00	0.8	0.0	100.0	0.0	6
	8	50.00	0.8	0.0	100.0	0.0	6
	9	51.00	0.00	0.0	100.0	0.0	6

[0257] 洗脱液 A 被用作盲样，且从标准品和样品中被去除。

[0258] 方法 3：用于硫酸粘菌素单组分的 HPLC

[0259] 设备：Waters 自动 HPLC 设备，由以下组成：

[0260] 泵：型号 510

[0261] 注射器：717 附加自动取样器

[0262] 检测器：490 E

[0263] 柱：Nova-Pak, C18, 60 Å, 4 μ m, 250×4.6mm

[0264] 柱箱：Jones 色谱 Model 7955

[0265] 试剂：

[0266] 超纯水

[0267] 乙腈，HPLC 级

[0268] 甲磺酸，≥ 99%

[0269] 三乙胺，HPLC 级

[0270] 硫酸钠，无水，预分析

[0271] 缓冲液：硫酸钠，无水，28.4g(0.10M)，三乙胺 14.0ml(0.05M)，甲磺酸 10.0ml(0.06M)，超纯水定容至 2000ml。该缓冲液通过 0.45 μm 滤膜真空过滤。

[0272] A-洗脱液：50%缓冲液，35%超纯水，15%乙腈。用甲磺酸调节至 pH 2.0。

[0273] B-洗脱液：50%缓冲液，20%超纯水，30%乙腈。用甲磺酸调节至 pH 2.0。

[0274] 样品制备：

[0275] 硫酸粘菌素单组分：在超纯水中 2.8mg/ml。搅拌 15 分钟，并通过 0.45 μm 滤膜过滤。

[0276] 分析程序：

[0277] 流速：1.0ml/min。

[0278] 检测波长：214nm

[0279] 柱温：25℃

[0280] 注射体积：40 μl

[0281] 自动进样器温度：25℃

[0282] 梯度程序：

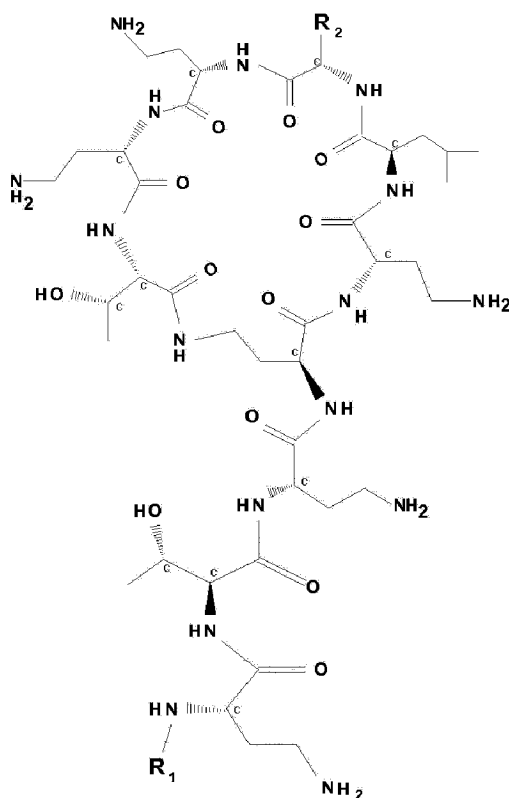
[0283]

梯度		时间	流速 (ml/min)	%A	%B	曲线
	1	0.00	1.00	67.0	33.0	0
	2	20.00	1.00	67.0	33.0	6
	3	40.00	1.00	40.0	60.0	6
	4	50.00	1.00	40.0	60.0	6
	5	51.00	1.00	0	100.0	6
	6	55.00	1.00	0	100.0	6
	7	56.00	1.00	67.0	33.0	6
	8	70.00	1.00	67.0	33.0	6
70 分钟后的变化不是检测的部分，仅在一系列分析后进行						
	9	71.00	1.00	0	100	6
	10	81.00	1.00	0	100	6
	11	82.00	0	0	100	6

[0284] 参考文献

[0285] 1) Suzuki, T., Hayashi, K., Fujikawa, K. (1963) Studies on the Chemical Structure of Colistin: III. Enzymatic Hydrolysis of Colistin A, J Biochem 54: 412-418.

[0286] 2) Elverdam, I., P. Larsen and E. Lund (1981) Isolation and characterization of three new polymyxins in polymyxin B and E by high-performance liquid chromatography. J. Chrom. (218) 653-661.



多粘菌素-E

粘菌素-A=多粘菌素-E1:R1=6-甲基-辛酰基

粘菌素-A-Ile=多粘菌素-E1-1:R1=6-甲基-辛酰基

粘菌素-B=多粘菌素-E2:R1=6-甲基-庚酰基

粘菌素-E3:R1=辛酰基

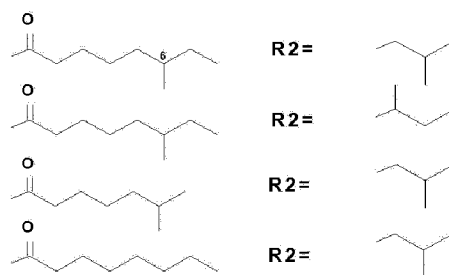


图 1

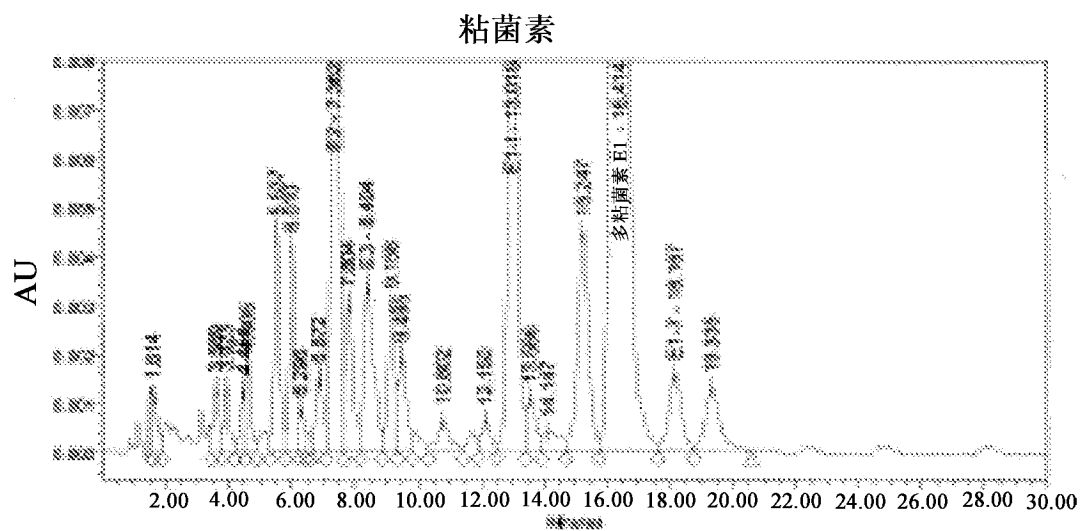


图 2

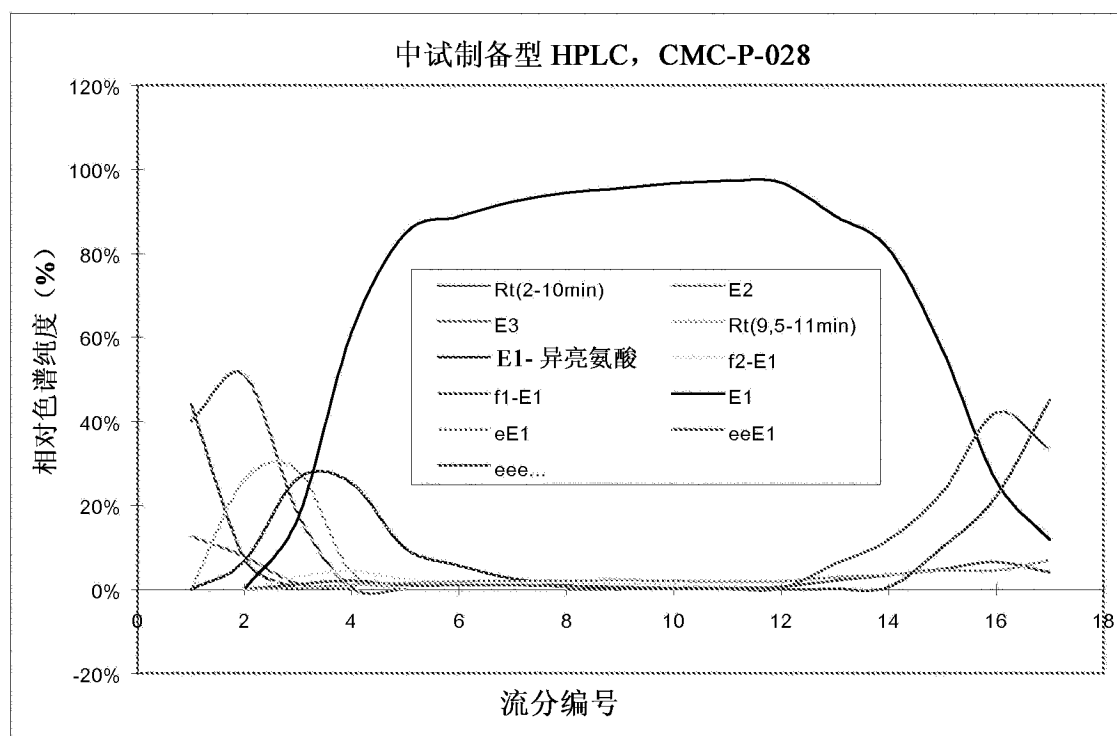


图 3

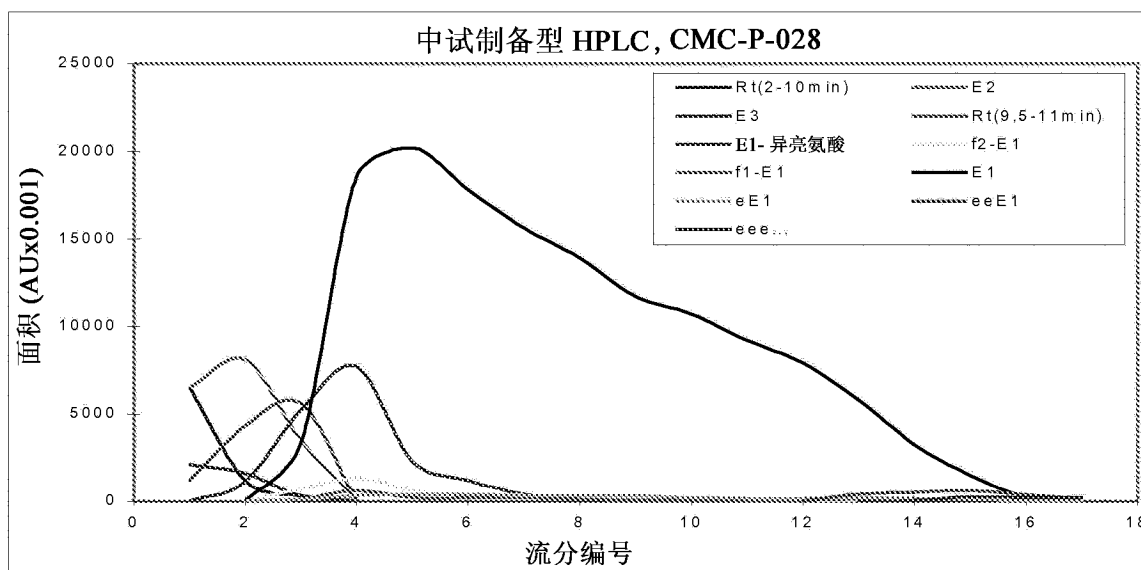


图 4

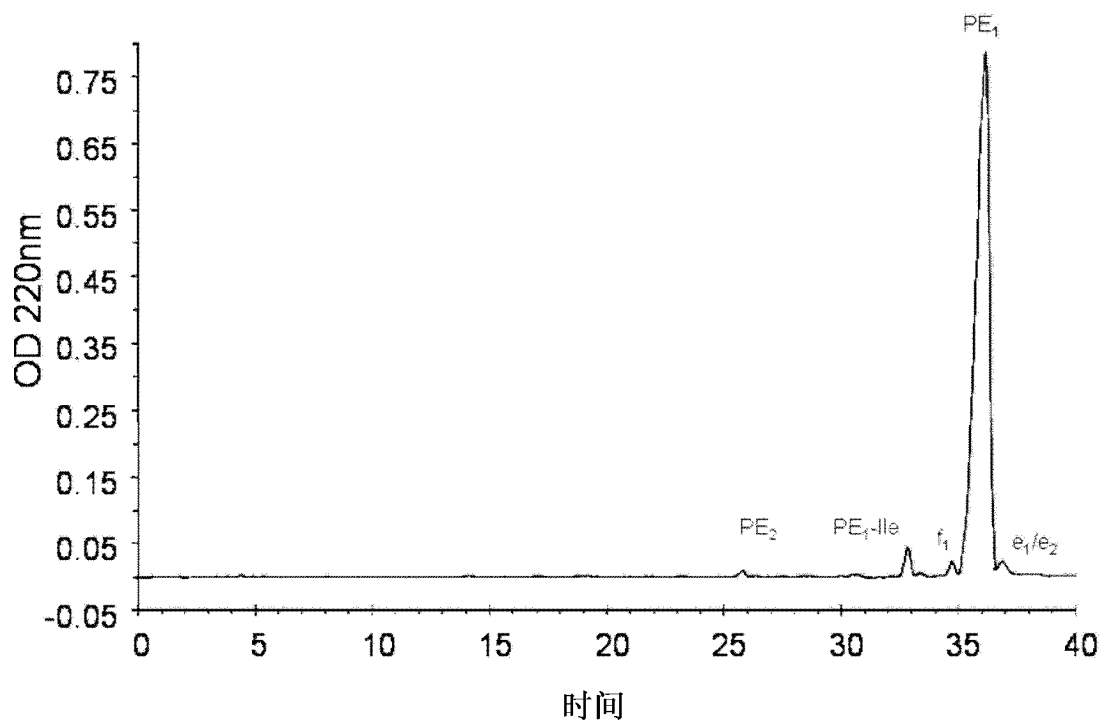


图 5