



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96194171.5

[43]公开日 1998 年 6 月 17 日

[11] 公开号 CN 1185115A

[22]申请日 96.5.24

[30]优先权

[32]95.5.25 [33]US[31]08/449,436

[86]国际申请 PCT/EP96/02256 96.5.24

[87]国际公布 WO96/37233 英 96.11.28

[85]进入国家阶段日期 97.11.25

[71]申请人 诺瓦蒂斯有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72]发明人 P·K·卡帕 G·卡尔达思

A·库瑟罗维 P·拉克

P·G·马特内尔 R·C·佩特尔

M·普拉沙德 S·沙尔马

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 邵红 温宏艳

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 多粘菌素钷合物

[57]摘要

具有比未钷合多粘菌素 B 较高抗内毒素活性的水溶性多粘菌素 B/葡聚糖的钷合物(或其盐)。该钷合物是在含水介质中、pH 值约 9.3-约 10, 温度约 30°-约 35℃ 条件下, 使多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖反应制备的。

权 利 要 求 书

1. 含多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖的水溶性轆合物 (或其盐), 该轆合物具有比未轆合多粘菌素 B 更高的抗内毒素活性, 即未轆合多粘菌素 B 的 IC_{50} 与所述轆合物的 IC_{50} 之比大于 1.0。

5 2. 权利要求 1 的轆合物 (或其盐), 其中所述比值大于约 1.25 或 1.3。

3. 权利要求 1 的轆合物 (或其盐), 其中所述比值大于约 1.4。

4. 权利要求 1 的轆合物 (或其盐), 其中抗内毒素活性采用羰花青染料试验法测定, 该试验中, 所述轆合物的 IC_{50} 作为在每毫升 0.9 % 盐水中存在 0.05mg 来自埃希氏大肠杆菌的内毒素条件下, 使 450nm 波长处该羰花青染料的吸收偏移消除 50 % 所需的该轆合物浓度而测定出。

5. 权利要求 1 - 4 的任意一项的轆合物 (或其盐), 其中多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖之分子比是约 1:15 - 约 200:1。

6. 权利要求 1 - 4 的任意一项的轆合物 (或其盐), 其中所述多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖之分子比是约 1:2 - 约 1:5。

7. 权利要求 1 - 4 的任意一项的轆合物 (或其盐), 其中所述葡聚糖的重均分子量为约 25000 - 约 500000。

8. 权利要求 1 - 4 的任意一项的轆合物 (或其盐), 其中所述葡聚糖的重均分子量为约 50000 - 约 200000。

20 9. 权利要求 1 - 4 的任意一项的轆合物 (或其盐), 其中所述葡聚糖的重均分子量为约 63000 - 约 76000。

10. 权利要求 1 - 4 的任意一项的轆合物 (或其盐), 该轆合物重均分子量为约 55000 - 约 80000。

11. 权利要求 1 - 4 的任意一项的轆合物 (或其盐), 所述重均分子量为约 60000 - 约 80000。

12. 权利要求 1 - 4 的任意一项的轆合物 (或其盐), 其中所述重均分子量为约 63000 - 约 76000。

13. 生产多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖的水溶性轆合物 (或其盐) 的方法, 该方法包括在 pH 值为约 9.3 - 约 10 范围内, 温度约 30° - 35 °C 条件下, 使多粘菌素 B 或其盐在含水介质中与葡聚糖反应。

14. 权利要求 13 的方法, 其中 pH 值是约 9.5 - 约 9.7。

15. 权利要求 13 的方法, 其中温度是约 32°。

16. 权利要求 13 的方法, 其中多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖的反应包括多粘菌素 B 或其盐通过一个或多个胺键与葡聚糖共价连接。

17. 权利要求 13 的方法, 其中多粘菌素 B 盐是硫酸多粘菌素 B。

18. 权利要求 13 的方法, 其中多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖之分子比是约 1:15 - 约 200:1。

19. 权利要求 13 的方法, 其中多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖之分子比是约 1:2 - 约 1:5。

20. 权利要求 13 的方法, 其中多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖之分子比是约 1.5:5。

21. 权利要求 13 的方法, 其中葡聚糖的重均分子量为约 25000 - 约 500000。

22. 权利要求 13 的方法, 其中葡聚糖的重均分子量是约 50000 - 约 200000。

23. 权利要求 13 的方法, 其中葡聚糖的重均分子量为约 43000 - 约 76000。

24. 权利要求 13 的方法, 其中葡聚糖被部份氧化。

25. 权利要求 24 的方法, 其中葡聚糖使用高碘酸钠部份氧化。

26. 权利要求 13 的方法, 其中使用硼酸盐缓冲液来保持 pH 值。

27. 权利要求 26 的方法, 其中硼酸盐缓冲液含有四硼酸钠。

28. 权利要求 13 的方法, 包括随后与硼氢化钠反应。

29. 权利要求 13 的方法, 还包括然后调节含水介质的 pH 值到 5 - 7, 并提纯所得羧合物。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述羧合物通过超滤提纯。

31. 按照权利要求 13 生产多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖的水溶性羧合物 (或其盐) 的方法, 包括:

a) 将葡聚糖与高碘酸钠反应, 制得部份氧化的葡聚糖;

b) 在含水介质中, pH 值约 9.3 - 约 10 范围内、温度约 30° - 约 35° 条件下, 使多粘菌素 B 或其盐与所得部份氧化的葡聚糖反应;

c) 所得含水介质中加入硼氢化钠;

d) 提纯所得羧合物。

32. 含有多粘菌素 B 或其药物学上可接受的盐与葡聚糖的水溶性羧合物 (或其药物学上可接受的盐) 的药物组合物, 其中所述羧合物具有

权利要求 1 所定义的抗内毒素活性，所述组合物还含有至少一种药物学上可接受的载体或稀释剂。

33. 多粘菌素 B 或其药物学上可接受的盐与葡聚糖的水溶性轭合物（或其药物学上可接受的盐），所述轭合物具有权利要求 1 所定义的抗内毒素活性，用于预防或治疗系统性炎症反应综合症或脓毒性休克。

34. 由权利要求 13 或 31 的方法获得的、如权利要求 1 所定义的多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖的水溶性轭合物（或其药物学上可接受的盐）。

35. 如权利要求 1 定义的、由权利要求 13 或 31 的方法任何时候获得的多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖的水溶性轭合物（或其药物学上可接受的盐）。

36. 多粘菌素 B 或其药物学上可接受的盐与葡聚糖的水溶性轭合物（或其药物学上可接受的盐）之应用，所述轭合物（或其盐）具有如权利要求 1 所定义的抗内毒素活性，所述应用指配制用于预防或治疗系统性炎症反应综合症或脓毒性休克的药物。

说明书

多粘菌素 B 衍生物

发明的概述

- 5 本发明涉及生产多粘菌素 B (PMB) 或其盐与葡聚糖的水溶性衍生物 (或其盐) 的方法, 该方法包括在 pH 9.3 左右 - 10 左右 (优选约 9.5 ~ 约 9.7) 的含水介质中, 于约 30° - 约 35 °C (优选约 32 °C) 温度下, 将多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖反应。一种优选的不同方法是在约 32 °C 温度下, 使硫酸多粘菌素 B 与氧化葡聚糖反应, 通过胺键, 该多粘菌素 B 分子与葡聚糖共价连接。本发明方法制备的此种改进衍生物 (或其盐)、
- 10 可容易而又恒定地进行复制, 且药理学特性得到明显改善, 例如效力更高, 其抗内毒素活性也高于非衍合多粘菌素 B 的抗内毒素活性。

本发明也包括含有多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖的水溶性衍生物, 比非衍合多粘菌素 B 具较强抗内毒素活性的衍生物 (或其盐)。

15 发明的技术背景

对于有效治疗系统性炎症反应综合症 (SIRS) 及脓毒休克的医药需求, 已引起广泛关注, 该病患者基数大, 在发达国家需要紧急治疗的 SIRS 脓毒症严重病例超过 100000 例, 而有几乎 1 百万患者处于脓毒症高危状况, 要通过预防措施使其解脱。

- 20 根据大量人和动物解体的研究, 认识到内毒素在 SIRS/脓毒症发病机理中是主要诱因和基本媒介, 因此为抗内毒素探讨脓毒症提供一个明确的科学原理。内毒素或脂多糖是 Gram 氏阴性细菌衍生出的结构分子, 当进入血液中时, 它们可能影响体温调节, 引起发烧。它们也产生毒效应, 导致心脏、肺及肾脏衰竭。在加护病房患者中, 内毒素相关疾病是死亡
- 25 的主要原因。

- PMB 中和内毒素的能力在抗生素中是很独特的, 它通过结合于内毒素分子的脂 A 区来完成, 来自多粘杆菌 (B, 硫酸多粘菌) 的 PMB 是高载荷的两亲环肽脂, 它也可用于消除各种真菌感染, 特别是免疫功能遭致损害的个体中出现的感染。然而, PMB 也有某些使它不如理想抗生素之性质。第一, 它在体内的半衰期很短, 为了产生效果, 需重复剂量;
- 30 第二, 当其通过肾脏时可能会引起严重损伤; 第三, 高剂量时, 具神经毒性、会引起呼吸麻痹。

以前，有科研人员将 PMB 与不流动或固定分子结合，例如 Issekutz, J. Immunol. Methods 61(1983) 275 - 281，描述了将 PMB 与琼脂糖结合。而这些结合物只用于提纯工艺，并不适宜于体内治疗用。

为赋予药理学活性，延长持续时间，或降低器官毒性，已经采用的一个方法是将药物与高分子量大分子，例如葡聚糖，聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷等结合。但是，在这一高聚物结合领域里的尝试，仅仅取得了有限的成功。例如，普鲁卡因酰胺（抗心律失常药）的结合形式活性较低，且比原普鲁便卡因酰胺半衰期更短（Schact 等人，Ann N. Y., Acad. Sci. 416 [1985] 199 - 211）。同样，连接于载体上的前列腺素类似物 B245，比原分子效果也降低了（降低幅度为几个数量级）（Bamford 等人，Bioch. Biophys. Acta 886 [1986] 109 - 118）。有关激肽释放酶、抑肽酶、缓激肽（Ody 等人，Biochem. Pharmacol. 27 [1978] 173 - 179）、抗肿瘤药物正定霉素（Hurwitz 等人，J. Appl. Biochem. 2 [1980] 25 - 35）和丝裂霉素 C（Takakura 等人，Cancer Res. 44 [1984] 2505 - 2510）的结合形式，其生物学效力降低也已被披露过，结合酶也因其空间障碍使得底物不易接近而降低了生物活性（Blomhoff 等人，Biochem. Biophys. Acta 757 [1983] 202 - 208；Marshall 等人，J. Biol. Chem. 251(4) [1976] 1081 - 1087；R. L. Foster, Experimentia 31(7) [1975] 772 - 773；Wileman 等人，J. Pharm. Pharmacol. 35 [1983] 762 - 765）。但也有结合之后循环半衰期得到改善的一些例子（Wileman 前述文献；Kaneo, Chem. Pharm. Bull. 37(1) [1989] 218 - 220）。

人们企盼开发出一种能在血液中停留较长时间，和/或以治疗剂量施用不具神经毒性或肾毒性的 PMB 类型。USP 5177059 及其在其它国家的相同专利、如 EP 428486，介绍了多粘菌素 B 与多糖（如葡聚糖或羧甲基淀粉）、蛋白（如白蛋白）、及高聚物（如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、和聚乙烯醇）结合。该专利还详细描述了多粘菌素 B 与葡聚糖化学结合的方法，即将原料于室温（即 25° 左右或更低），pH 8.5 - 9.0 条件下反应。该专利所述结合物比未结合多粘菌素 B 的毒性小，并有抗内毒素活性，该活性虽未清楚定义，但看来与未结合多粘菌素 B 相等或较小。

本发明方法是对上述专利所述方法之改进并提供多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖的结合物，该结合物与已知 PMB - 葡聚糖结合物相比，其特性得到令人惊异的改善，特别是比未结合多粘菌素 B 具较高抗内毒素活

性，具较高效力、较好复制性，以及改善了药理学性质。特别令人惊异的是本发明的新型 PMB - 葡聚糖衍合物（或其盐），比未衍合 PMB 有恒定的、可重复的较高抗内毒素活性。虽然该未曾预料到的新特性之分子基础并不清楚，但很可能是本发明制备该衍合物时所用反应条件下，pH 值的变化改变了碱性侧链上的质子分布。在高 pH 值条件下，对于通过还原胺化反应，与葡聚糖的连接作用来说，一个或多个侧链氨基会变得更易利用。每个侧链氨基将有一个特定的 pKa 值，较高 pH 值下每次会释放同样胺。如果该胺给出特别有利的连接（从衍合物效力的观点来看），则产生较好衍合物类型，因为此种特别连接途径对整个结构贡献较大。该结构以恒定可复制方式赋予该衍合物高于原有 PMB 活性水平之活性水平，例如相当于原有 PMB 活性的 125 % 或更高。

详细说明

本发明涉及生产用于治疗真菌和细菌感染以及预防由细菌内毒素引起之疾病的多粘菌素 B 与葡聚糖之水溶性衍合物（或其盐）的改进方法。具体地说，本发明关系到一种水溶性多粘菌素 B/葡聚糖衍合物（或其盐）的生产方法，所述方法包括在含水介质中，pH 值约 9.3 - 约 10，温度约 30° - 约 35 °C 条件下，使多粘菌素 B 或其盐与葡聚糖反应。PMB 是一种肽抗生素、是具有一定抗生素活性的得到认可的药剂。在临床上局部使用及肠道外应用已有 40 年以上。对 PMB 产生细菌抗性是罕见的。

PMB 与内毒素结合其亲合力约 10^{-6} M，在大量体外及体内模式中，可中和来自所有临床上重要的 Gram 氏阴性细菌的内毒素之生物效应。在体外，它被用作中和内毒素的标准。而且在体内，PMB 对许多动物模式的细菌脓毒症病理学，例如酸中毒、肠细菌感染中的低血压，以及对狗、兔、鼠和小鼠的 Gram 氏阴性脓毒症致死都有保护作用。在人体中，它对预防烧伤患者之类并发的脓毒症也很有效。

用于制备本发明衍合物的 PMB 是市售的。将多粘杆菌(Prazmowski) Migula 发酵可制备 PMB。PMB 由几种相关的十肽混合物组成。PMB 或其药理学上可接受的盐（例如硫酸多粘菌素 B 等）均可用于本发明。

本发明方法中所用葡聚糖，可以是任何常规药理学上可接受的葡聚糖。优选共价结合于肽上的经化学改性之葡聚糖，例如经氧化剂（如高碘酸钠）氧化等。优选葡聚糖重均分子量为约 25000 - 约 500000，更优选约 50000 - 约 200000，也更优选约 63000 - 约 76000。该分子量，例

如可以采用凝胶渗透高效液体色谱来测定。最优选的葡聚糖由肠系白联球菌属 (NRRL B - 512) 发酵制备。该葡聚糖由长线性链中 α [1 - 6]连接的葡萄糖单元, 带有约 5 % α [1 - 3]支链组成。该支链中约 85 % 有 1 - 2 个葡萄糖单元, 而其余 15 % 平均 33 个单元。

- 5 含水介质中制备 PMB 和葡聚糖羧合物的一般方法在 USP 5177059 中有新介绍, 对本发明亦实用。本发明优选实施方案中、部份氧化的葡聚糖通过与高碘酸钠 (NaIO_4) 之类的氧化剂反应而制得。该处理通过葡萄糖单体上的连位二醇氧化裂解而形成醛。当该部份氧化的葡聚糖暴露于 PMB 或其盐中时, 形成 Schiff 氏碱。本发明范围内的羧合物生产, 在
- 10 PMB 和葡聚糖反应期间, 尤其是 Schiff 氏碱形成阶段要求小心控制 pH 值于约 9.3 - 约 10 之间, 优选约 9.5 - 10, 更优选约 9.5 - 约 9.7。优选使用硼酸盐缓冲液, 特别是含四硼酸钠的缓冲液来保持 pH 值于该范围内。当 PMB 或其盐与葡聚糖反应时, 含水介质的温度也需保持于约 30° - 约 35 °C 之间, 更优选约 32 °C。随后加入硼氢化钠 (NaBH_4) 还原 Schiff
- 15 氏碱, 并且保留的醛给 PMB 与葡聚糖之间提供稳定的共价连接, 优选通过一个或多个胺键进行。优选采用超滤作用, 例如使用 10000 分子量分隔膜, 除去残留的 PMB、无机副产物 (如硼酸盐), 及可能存在的低分子量降解产物。而使该羧合物提纯。提纯之前优选将含水介质的 pH 值调至 5 - 7。

20 因此本发明方法的优选方案包括:

- a) . 使葡聚糖与高碘酸钠反应制得部份氧化的葡聚糖;
- b) . 在含水介质中, pH 值约 9.3 - 约 10, 温度约 30° - 约 35 °C 条件下, 使多粘菌素 B 或其盐与所得部份氧化的葡聚糖反应;
- c) . 加入硼氢化钠到所得含水介质中;
- 25 d) . 提纯所得多粘菌素 B - 葡聚糖羧合物。

本发明也包括多粘菌素 B 或其药物学上可接受的盐与葡聚糖的水溶性羧合物 (或其药物学上可接受的盐), 该羧合物具有高于未羧合多粘菌素 B 的抗内毒素活性, 用于预防和治疗系统性炎性反应综合症及脓毒性休克。也包括由上面定义的方法可获得的此种羧合物 (或其药物学上可接受的盐), 以及由上述方法任何时候获得的此种羧合物 (或其药物学上可接受的盐); 本发明还包括含有上面定义的多粘菌素 B 或其药物学上可接受的盐与葡聚糖的水溶性羧合物 (或其药物学上可接受的盐),

30

加有至少一种药物学上可接受的载体或稀释剂的药物组合物；以及包括这些轭合物（或其药物学上可接受的盐）在制备用于预防和治疗系统性炎症反应综合症和脓毒性休克的药物方面之应用。

5 本发明的方法中，以及由此生产的轭合物中，PMB 或其盐与葡聚糖的分子比是约 1:15 - 约 200:1，更优选约 1:2 - 约 1:5，最优选约 1.5:5。

优选多粘菌素 B 的盐是 PMB 的药物学上可接受的盐。

10 如果该轭合物在 20℃ 时，于水中有约 25mg/ml 或更高的溶解度，则认为它是水溶性的，优选约 50mg/ml 或更高，更优选约 60mg/ml 或更高，最优选约 65mg/ml 或更高（20℃）。

15 本发明制备的 PMB - 葡聚糖（和其盐），可以以同 PMB 本身相一致的应用方式使用，即它们可以单独使用，例如作为抗生素治疗细菌或真菌感染，或者与其它杀菌剂和/或抗炎剂结合使用。它们可按原有 PMB 的常规给药方式，以任何形式给药，例如肌肉内给药，静脉内给药、鞘内给药、结膜下给药以及外部给药。肌肉注射剂一般于无菌水、生理盐水或约 1% 盐酸普鲁卡因中含有效量 PMB - 葡聚糖轭合物（或其药物学上可接受的盐）。静脉内制剂一般于 5% 葡萄糖和无菌水中含有效量轭合物。鞘内制剂一般于生理盐水中含有效量轭合物。对于眼内局部使用，有效量轭合物可与水或生理盐水（也可加有甘油）、硫酸铜混合配成滴
20 眼药水、或可以制成眼药膏或悬浮液。外部使用的乳霜，特别是用于烧伤面的，一般是在惰性基质成份、例如液体凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯，和乳化石蜡等中，含有有效量 PMB - 葡聚糖轭合物（或其药物学上可接受的盐）。

25 提纯的本发明 PMB - 葡聚糖轭合物（或其药物学上可接受的盐）基本上无毒。本发明轭合物用量，可根据给具体患者开据的原有 PMB 用量处方来确定，要考虑所治患者的症状、病人的年龄和体重，所用具体轭合物的活性等因素。由于轭合物提高了有效活性、降低了毒性，及增加了活性持久性，因此可以推断比起原有 PMB 其剂量可降低一半或更多。

30 本发明轭合物的分子量，可以使用分子量分级排斥高效液体色谱（SEC - HPLC，TSK - GEL G4000 PW × 1，用 pH 4.4 的 40mM 磷酸盐缓冲液洗脱、用低角度激光扫描检测）、参照重均分子量（MW）

为 79800 的葡聚糖标准物来测定。本发明轭合物优选重均分子量为约 55000 - 约 80000，更优选约 60000 - 约 80000，最优选约 63000 - 约 76000。

5 本发明改进的轭合物有超过现有技术轭合物的较好复制性、以及具
高于未轭合多粘菌素 B 的抗内毒素活性，本发明轭合物具改善的抗内
毒素活性、也就是说，未轭合多粘菌素 B 的 IC_{50} 与本发明轭合物的 IC_{50} 之
比大于 1.0，优选大于约 1.25、或 1.3，更优选大于约 1.4。正如本文中
所采用的， IC_{50} 意指当用羧花青染料试验测试时，在有 0.05mg 来自埃希
氏大肠杆菌的内毒素存在下，要使 450nm 波长处羧花青染料的吸收偏移
10 消除 50 % 所需的多粘菌素 B 之浓度。如本文所采用的，活性比 (%) 定
义如下：

$$\frac{\text{未轭合多粘菌素 B 的 } IC_{50}}{\text{多粘菌素 B/葡聚糖轭合物的 } IC_{50}} \times 100$$

15

所述羧花青染料试验，是用于测定多粘菌素 B 和本发明轭合物抗内
毒素性质的体外生物化学试验。该试验对从前的文献报导加以修改
(Ogawa 和 Kanoh, Microbiol. Immunol. 28 [1984] 1313 - 1323; Zey 和
Jackson, Applied Microbiol. 26 [1973] 129 - 133)、并最适宜于微滴平
20 板使用。该试验中，轭合物或未轭合物 PMB (阳性对照物) 为结合内毒
素，而与羧花青染料 (一种小分子阳离子化合物，当与内毒素结合时、
能改变分光光度吸收) 竞争。

进行羧花青染料试验的试剂配制如下：

1) . 配制 0.15M 乙酸钠溶液和 0.15M 乙酸溶液，将两溶液合并
25 (40.2ml 0.15M 乙酸钠与 159.8ml 0.15M 乙酸) 制得 0.03M 乙酸盐缓
冲液；

2) . 将 8.0mg 羧花青染料溶于 12.5ml 乙醇中。用 37.5ml 乙酸盐缓
冲液将其稀释。该最终染料溶液是 25 % 乙醇中含量为 160 μ g/ml。将其
置于冰上，于暗室中混合至少 30 分钟；

30 3) . 在 40mM 磷酸盐缓冲液中 (pH = 7.4) 配制 PMB 或各轭合
物的系列稀释液，各稀释液比其最终试验浓度高 6 倍；

4) . 经声波处理后，将埃希氏大肠杆菌 0111:B₄ 内毒素，从原先配

制的冷冻贮存浓度 1.0mg/ml (0.9 % 盐水中) 稀释为 0.5mg/ml (0.9 % 盐水中)。

准备好平板、试验进行如下, 从加入样品或缓冲液于微滴小井中开始:

- 5 a). 空白: 100 μ l 盐水和 50 μ l 40mM 磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4), 一式三份;
- b). 阳性对照物: 100 μ l 内毒素和 50 μ l 40mM 磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4), 一式三份;
- c). PMB 样品: 100 μ l 内毒素和 50 μ l PMB 样品, 一式三份;
- 10 d). 阴性对照物: 100 μ l 盐水和 50 μ l 羧合物样品, 一式三份;
- e). 实验物: 100 μ l 内毒素和 50 μ l 羧合物样品, 一式三份。

将该板转动几分钟, 各小井中加入 150 μ l 染料、将该板用薄膜包裹并置于冰上, 黑暗中放置 60 分钟。用多通道移液管将小井混合, 并于微滴平板阅读器上, 450nm 波长处立即读数以 Reed - Muench 计算法估算

15 IC₅₀。

由下面的非限制性实施例对本发明举例说明, 所用温度均为摄氏度。

实施例 1

A) 葡聚糖的氧化

20 在 5L 4 颈圆底烧瓶中加入 2.31 L 注射用水和 150g 葡聚糖。以约 140rpm 转速, 21° - 24° 下搅拌该混合物使充分溶解。加入 3.9g 高碘酸钠在 60ml 注射用水中的溶液 (慢慢升温约 1°)。用 30ml 注射用水涮洗加料漏斗。所得混合物于 21° - 24° 贮存 1 小时。该溶液通过 0.22 μ Corning 醋酸纤维素 90mm 膜滤器真空过滤, 并加热至 30° - 32°, 维持该温度。

25 B) 制备硫酸多粘菌素 B/硼酸盐缓冲溶液

 该制备从上述步骤 A) 葡聚糖氧化过滤和升温完成以前 45 分钟时开始。在 12L 4 颈圆底烧瓶中加入 3.00 L pH 9.7 硼酸盐缓冲液, 该缓冲液温度调至 32°。然后加入 45g 硫酸多粘菌素 B, 所得悬浮液于 32° 搅拌 45 分钟。测定该混合物的 pH 值 (原为 9.4), 并于 32° 下、加入 30ml 5N

30 NaOH, 将 pH 值调到 9.7。

 硼酸盐缓冲液配制如下: 在热处理 5L 4 颈圆底烧瓶中加入 114.3g 四硼酸钠十水合物和 2.906L (2.90 kg) 注射用水。将该溶液加热至 32

C, 并加入 37ml 5N NaOH 将 pH 调至 9.7 (原为 9.3)。通过无菌 0.22 μ Corning 醋酸纤维素 90mm 膜滤器真空过滤该溶液并贮存。

C) 硫酸多粘菌素 B 与氧化葡聚糖的反应

于 32° 下, 尽可能快地将预热 (30° - 32°) 氧化葡聚糖溶液 (来自 A 部份) 加入到硼酸盐缓冲液的硫酸多粘菌素 B 的搅拌混合物 (来自 B 部份) 中。加完之后测定该混合物 pH 值 (原为 9.5), 并加入 18ml 5N NaOH 调节至 9.7。该混合物于 32 °C 搅拌 1 小时, 该多相混合物中加入 3.6g 硼氢化钠在 50ml 注射用水中的溶液。于 32° 将该混合物搅拌 2 小时, 再加入另一新鲜配制的 3.6g 硼氢化钠在 50ml 注射用水中的溶液, 再于 32° 搅拌 2 小时。该混合物中再加入 3.6g 硼氢化钠在 50ml 水中的溶液。除去热源, 搅拌下在超过 14 小时期间使该反应混合物冷至室温。测定该反应混合物的 pH 值 (10.0), 加入 1.27 L 1 N HCl 将 pH 调至 3:7。酸化之后搅拌所得混合物 10 分钟, 通过无菌 0.22 μ Corning 乙酸纤维素膜滤器真空过滤, 得到 6.81 L 多粘菌素 B - 葡聚糖复合物的溶液, 待进行提纯。

D). 超滤提纯

使用带有 S1Y10 膜滤筒的预处理 Amicon CH2PRS 超滤装置提纯多粘菌素 B - 葡聚糖复合物溶液 (来自 C 部份)。将该纯化产物从超滤器中移出, 于 - 25° 冷冻贮存。

分析所得复合物表明该产物有下述特性:

IC₅₀ = 16.8 μ g/ml

比活性 = 124.7%

葡聚糖含量 = 65.37mg/ml

总多粘菌素 B 含量 = 2.47mg/ml

游离多粘菌素 B 含量 = 0.65 %

PMB: 葡聚糖的比例 = 37.71mg PMB/g 葡聚糖

看来在反应温度 32° 和 pH 9.5 条件下, 所得产物其活性为未复合 PMB 活性的约 125 %。

实施例 2

重复实施例 1 的方法, 得到有下面特性的多粘菌素 B - 葡聚糖复合物:

IC₅₀ = 16.4 μ g/ml

比活性 = 125.8%

葡聚糖含量 = 65.30mg/ml

总多粘菌素 B 含量 = 2.49mg/ml

游离多粘菌素 B 含量 = 0.67 %

5 PMB: 葡聚糖的比例 = 38.06mg PMB/g 葡聚糖

再一次表明, 在反应温度 32° 和 pH 9.5 条件下, 所得糖合物与未糖合物 PMB 相比其活性为 126 % 左右。

实施例 3

10 根据实施例 1 的方法 (除了指出的不同处外) 制备多粘菌素 B/葡聚糖糖合物, 测定 pH 9.7 条件下, 温度对 PMB 与葡聚糖之间反应的影响。测定有效载荷 (mg PMB/g 葡聚糖)、平均 IC₅₀ (μg/ml) 和比活性(%), 所得结果列于表 1:

表 1: pH 9.7 条件下温度的影响
(10g PMB; 0.65g NaIO₄; 50g 葡聚糖)

实施例 No.	温度	有效载荷 (mg PMB/g 葡聚糖)	平均 IC ₅₀ (μg/ml)	比活性 (%)
3a	35°	15.87	25.18	99.7
3b	35°	19.81	26.07	91.1
3c	35°	18.58	27.67	85.0
3d	10°	49.53	143.83	23.6
3e	10°	54.95	187.87	9.5
3f	10°	56.03	195.7	10.8

15 从实施例 3 很明显看出, 在 pH 9.7 条件下, 当反应温度降低到 10° 时, 所得产物活性降低。

实施例 4

20 根据实施例 1 的方法 (除指明的不同之处外) 制备多粘菌素 B/葡聚糖糖合物, 测定 pH 值对 PMB 与葡聚糖之间反应的影响。如实施例 3 所示测定有效载荷 (mg PMB/g 葡聚糖), 平均 IC₅₀ (μg/ml) 和比活性(%), 所得结果列于表 2:

表 2： 32° 温度下 pH 的影响
(15g PMB； 1.3g NaIO₄； 50g 葡聚糖)

实施例号	反应 pH 值	有效载荷 (mg PMB/g 葡聚糖)	平均 IC ₅₀ (μg/ml)	比活性 (%)
4a	4.0 ^{a)}	2.36	ND	ND
4b	5.0 ^{a)}	14.34	ND	ND
4c	7.0 ^{b)}	15.26	ND	ND
4d	7.0 ^{b)}	16.09	164.4	11.0
4e	8.0 ^{b)}	32.03	107.7	17.8
4f	8.0 ^{b)}	29.51	139.4	13.8
4g	8.5 ^{c)}	69.94	74.5	24.9
4h	9.0 ^{c)}	50.99	22.6	95.3
4i	9.0 ^{c)}	50.16	22.5	88.6
4j	9.3 ^{c)}	43.33	19.4	94.0
4k	9.3 ^{c)}	39.96	19.0	95.8
4l	9.5 ^{c)}	38.22	17.5	100.5
4m	9.5 ^{c)}	39.9	17.8	98.1
4n	9.7 ^{c)}	36.74	15.8	133.2
4o	9.7 ^{c)}	34.99	14.9	148.9
4p	10.0 ^{c)}	31.89	18.7	97.3

a) 乙酸盐缓冲液； b) 磷酸盐缓冲液； c) 硼酸盐缓冲液；

ND： 未测定（样品太稀无法测定该参数）。

- 5 表 2 数据表明，降低温度至 32°，而使用 9.5 - 9.7 之间的 pH 值时，仍然能产生其活性优于未结合 PMB 的甾合物（例 4 l， 4n 和 4o ）但若进一步提高 pH 值到 10，便不特别有利了（例 4p ）。

实施例 5

- 按实施例 1（除了指明的不同外）制备多粘菌素 B/葡聚糖甾合物，
10 并测定其抗内毒素活性比，所得结果列于表 3：

表 3: PMB 量的影响
(1.3g NaIO₄; pH 9.7; 32°)

实施例号	条 件	有效载荷 (mg PMB/g葡聚糖)	平均 IC ₅₀ (μg/ml)	比活性 (%)
5a	15g PMB	36.74	15.8	133.2
5b	15g PMB	34.99	14.9	148.9
5c	15g PMB	33.81	17.6	109.0
5d	20g PMB	46.06	19.7	121.5
5e	20g PMB	44.63	19.5	115.5

从表 3 结果进一步证实了最佳条件仍然是反应温度约 32°, pH 值约 9.5 - 约 9.7。

- 5 因此, 总的来说实施例 1 - 5 的数据表明, 使用反应温度约 30° - 35°, 优选 32° 左右, pH 值约 9.3 - 约 10, 优选约 9.5 - 约 9.7 便产生本发明改善的辄合物。