

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C07H 1/00

(45) 공고일자 1999년 12월 01일

(11) 등록번호 10-0230142

(24) 등록일자 1999년 08월 20일

(21) 출원번호	10-1992-0014690	(65) 공개번호	특 1993-0004321
(22) 출원일자	1992년 08월 14일	(43) 공개일자	1993년 03월 22일
(30) 우선권주장	7/746,021 1991년 08월 15일 미국(US)		
(73) 특허권자	아메리칸 사이아나미드 컴퍼니	윌리엄 에이취 캘넌	
	미합중국 뉴저지 매디슨 파이프 지랄다-팜츠		
(72) 발명자	라리사 크리스난		
	미합중국 뉴욕주 10901 서퍼언시 로너건 드라이브 82		
(74) 대리인	차순영, 차윤근		

심사관 : 이충재

(54) 개선된 반코마이신 단리 방법

요약

본 발명은 pH5 내지 9의 수용액에 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속 무기 염을 첨가함으로써 상기 용액으로부터 반코마이신을 단리하는 것으로 구성된, 상기 pH5 내지 9의 수용액으로부터 반코마이신 단리에 있어서의 개선에 관한 것이다.

명세서

[발명의 명칭]

개선된 반코마이신 단리 방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 pH5 내지 9의 수용액으로부터 반코마이신을 단리 시키기 위한 침전 방법에서, 상기 용액에 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속 무기염을 첨가함으로써 상기 용액으로부터 반코마이신을 단리 함을 개선점으로 하는 방법에 관한 것이다.

반코마이신 염산염은 조절된 발효 조건하에서 노르카디아 오리엔탈리스(*Nocardia orientalis*)에 의해 생성된 양쪽성 글리코펩티드 항생물질이다. 반코마이신은 Barna and Williams Ann. Rev. Microbiol 38, 339(1984). 에 의해 기술된 바와 같이 글리코펩티드의 밀접하게 관련된 기이다. 임상적으로 반코마이신 염산염은, 1950년대 후반 이래로 통상적으로 시판되어 왔다. 그것은 D-Ala-D-Ala으로 끝나는 무코펩티드 전구체에 결합한다고 공지되며 박테리아 세포-벽 합성 잔기들을 억제한다. 그 외에, 반코마이신은 RNA 합성 뿐만 아니라 세포막 투과성도 변화게 한다.

반코마이신은 포도상구균의 베타-락탐 내성 균주에 의해 야기된 심한 감염의 치료에 주로 사용된다. 반코마이신은 페니실린 알레르기 환자의 감수성 감염의 치료에 및 소화관 내 다루기 어려운 것에 의해 야기된 수술후 설사 치료에 선택된 항생 물질이다.

반코마이신의 통상적 제조는 값비싸고 또한 각 단계에서 생성물이 손실되는 다단계 방법이다. 항생물질에 대한 요구의 증가로, 보다 간단하고 보다 효과적인 단리 절차가 계속 조사된다.

발효에 의한 반코마이신의 제조 및 그것의 단리 방법은 U. S. Pat. No. 3,067,099에 기술된다.

반코마이신을 회수하는 방법으로 : U. S. Pat. No. 4,440,753에 제시된 바와 같이 이소프로필 알코올, 에틸 알코올 또는 아세톤과 같은 수 혼화성 비-용매로 정제된 발효 육즙으로부터 침전시킨 후에 생성물의 분리; EP0 0 145 484에 개설했던 바와 같이 인산염으로서 생성물의 분리; U. S. Pat. No. 4,845,194에 개설했던 구리염으로서 생성물의 단리; EP0 0 323 150에 개설했던 바와 같이 염기로 발효 육즙을 pH7.8로 조정하고 교반하지 않고 생성물의 침전; U. S. Pat. No. 4,868,285에 제시된 바와 같이, 여과에 의해 수확된 이미다졸/반코마이신 복합체 형성을 포함한다.

단리 방법에서 제이구리염 또는 이미다졸의 사용은 구리/반코마이신 또는 이미다졸/반코마이신 복합체의 후속 해리를 요구한다. 이것은 구리염 또는 이미다졸로 오염된 생성물을 초래한다. 알코올 또는 아세톤 같은 비-용매에 의한 반코마이신의 침전은 여과하기 매우 어려운 반코마이신 염기의 슬러리를 초래한다. 반코마이신이 생성되는 발효 육즙으로부터 반코마이신을 회수할 때, 목적은 최소한의 단계수를 사용하여 항생 물질의 최대량을 회수하는 것이다. 항생물질의 희석용액으로부터의 최대 회수는 더욱 더 어렵다. 항생물질은 대량의 복합 수성 발효 혼합물로부터 단리되어야만 한다. 항생물질이 생성되는 전(全)발효 육즙은 항생물질뿐만 아니라, 미반응 배지 영양소 및 이중 혼합 대사 중간물질 및 생성물의 희석용액에 현탁된 불용성 군사도 함유한다. 항생물질의 단리는 보통 어렵고 다수의 분리, 농축 및 정제 단계를 요구한다.

본 발명은 pH5.0 내지 9.0에서 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속 무기염으로 생성물을 염석함으로써 희석 수용액으로부터 반코마이신을 얻는 개선되고 편리한 방법을 제공한다.

따라서, 본 발명은 발효 육즙으로부터 반코마이신 단리의 개선된 방법을 제공한다. 개선된 방법은 개선된 여과성 및 수용 역가의 높은 회수율로, 발효 육즙으로부터 직접 반코마이신을 낸다. 상기는 염화나트륨, 염화리튬, 브롬화나트륨, 요오드화리튬, 요오드화칼륨, 요오드화나트륨, 브롬화리튬, 황산나트륨, 염화칼슘, 염화마그네슘, 염화바륨 등과 같은 알칼리금속 또는 알칼리토류 금속 염을 상기 육즙에 첨가 및, 여과를 통과한 반코마이신이 없는 염기의 단리에 의하여 실행된다.

본 발명에 따른 방법은 예를 들어, 여과, 추출, 침전 및/또는 크로마토그래피와 같은 방법에 의해 미리 정제된 전 육즙 또는 전 발효 육즙을 사용하여 반코마이신 생산의 임의의 단계에서 이용될 수 있다. 출발 물질로서 사용된 반코마이신을 함유한 전 발효 육즙은 당 분야에 잘 공지된 조건하에서 공지된 생성 미생물의 발효에 의해 얻어질 수 있다. 그 결과, 예를들면, 반코마이신-함유 전 육즙은 U. S. Pat. No. 3,067,099에 기술된 방법을 사용하여 노카르디아 오리엔탈리스 예컨대 노카르디아 오리엔탈리스 NRRL 2452인 생성 균주의 발효에 의해 얻어질 수 있다.

먼저, 반코마이신의 통상적 제조에서, 전 육즙은 약 8 내지 10의 알칼리성 pH에서 여과되고, 여과액의 pH는 약 6 내지 7로 조정되며, 다음 여과액을 이온-교환 수지, 전형적으로 저 가교 폴리스티렌-디비닐벤젠 양이온-교환 수지를 거쳐 통과된다. 반코마이신은 수지 상에 흡착된다. 수지는 물로 세척되고 반코마이신은 pH 9-11의 알칼리성 수용액으로 용출된다. 용출을 위한 전형적인 용매는 pH 10-11의 수성 수산화나트륨이다. 반코마이신을 함유한 알칼리성 용출액은 중화되고 활성은 비-관능 수지 상에 반코마이신의 재흡착에 의해 또는 구리 착체로서 분리에 의해 부가적으로 정제된다.

그 결과, 본 발명의 바람직한 양상에서 불순물과 혼합되는 반코마이신의 수용액을 5 내지 10% 농도 범위의 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속 무기염과 접촉시키고 그 결과 생성된 반코마이신 중성 침전물을 회수하는 단계들로 구성된, 상기 수용액으로부터의 반코마이신 분리 방법을 제공한다. 약 10%의 농도의 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속 할로겐화물이 보다 바람직하다. 염화나트륨이 가장 바람직하다.

본 발명에 따른 방법을 사용하여 반코마이신을 생성한 노카르디아 오리엔탈리스의 균주로부터 얻은 발효 육즙에 존재하는 반코마이신의 정제에 적합한 방법을 개발하였다. 새로운 방법은 여과 및 흡착 크로마토그래피에 의한 발효 생성물질의 초기 부분 정제를 포함하는데, 정제는 상기 수용액을 알칼리 또는 알칼리 토류 무기 염과 접촉시켜 생성물을 침전시키고 여과에 의해 모으는 것으로 완료된다. 상기 방법은 행하기 간단하고 불순물이 실질적으로 없는 좋은 수율로 반코마이신을 제공한다. 본 발명의 개선된 방법은 5-6g/l 만큼 낮은 농도를 갖는 희석 수용액으로부터, 반코마이신의 최고 회수를 가능케 한다. 100-150g/l의 농도에서, 무기염의 첨가는 생성물의 여과도를 향상시키고 반코마이신 중성의 최대 회수를 가능케 한다.

본 발명의 방법은 매우 쉽게 여과하는 반코마이신이 없는 염기를 산출하고 부분 정제 육즙이 사용될 때, 얻어진 반코마이신은 비경구 투여용 배합물로 사용하기에 적당한 산 첨가 염으로 전환될 허용가능한 순도이다.

본 발명에 따라서, 상기 방법은 여과 및/또는 크로마토그래피에 의해 부분적으로 정제된 전 육즙 또는 전 발효 육즙을 사용하여, 반코마이신 생성의 임의 단계에서 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 얻어진 반코마이신이 없는 염기의 순도 및 그러므로 그것으로부터 얻어진 산첨가 염은 이용된 출발 용액의 순도에 주로 의존할 것이다.

그 결과, 본 발명의 또 다른 양상에서 (1) 반코마이신을 생성하는 노카르디아 오리엔탈리스의 균주로부터 얻어진 발효 육즙을 여과하여 여과액을 수집하고, (2) 상기 여과액을 저 가교 스티렌 디비닐벤젠 양이온 교환 수지와 접촉시켜 반코마이신을 흡착시키고, (3) 상기 수지로부터 반코마이신을 용출시키고, (4) 용출된 상기 반코마이신을 알칼리 또는 알칼리 토류 금속 무기염과 접촉시키며 그 결과 생성된 침전 반코마이신을 여과에 의해 회수하는 단계로 구성된 반코마이신 제조 방법을 제공한다.

예를 들면 약 pH 2에서 염산을 함유한 물과 같은 적당한 용매내에서 수확된 침전물을 재용해 시킴으로써 수확된 침전물로부터 반코마이신이 제거될 수 있다. 다음 염산염으로서 반코마이신은 에탄올 또는 이소프로판올과 같은 반코마이신에 적당한 비-용매를 첨가함으로써 침전되고 여과에 의해 수확되어 염산염으로서 매우 순수한 반코마이신을 산출할 수 있다.

반코마이신 중성 및 반코마이신 염산염의 순도는 산성화 아세토니트릴-수(水) 계와 함께 이온 쌍 절차 및 역상 컬럼을 사용하여 HPLC에 의해 결정된다.

본 발명에 따른 방법이 반코마이신과 함께 사용하기에 특히 적합하다는 것이 발견되었다.

본 발명은 하기 비-제한 실시예에 의해 부가적으로 설명된다.

[실시예 1]

[염화나트륨으로 반코마이신의 단리]

반코마이신 중성 [812 µg/mg] (94g/l) 용액 100ml에 염화나트륨 10g을 교반하면서 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 16시간동안 계속 교반하였다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척하고, 건조하며 분석한다. 반코마이신 중성을 100% 수율로 회수하고 역가 926 µg/mg을 가진다.

[실시예 2]

[염화나트륨으로 반코마이신의 단리]

반코마이신 중성(100g/l) 용액 100ml에 염화나트륨 10g을 교반하면서 첨가한다. pH를 6.0으로 조정한다

다. 18시간 동안 계속 교반하고 결과의 고체를 여과하고, 건조하여 분석한다. Hplc 분석은 역가 920 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 및 반코마이신의 양적 회수를 알린다.

[실시예 3]

[염화나트륨으로 반코마이신의 분리]

표준 발효 실행으로부터 얻은 반코마이신 65g/습한 수지 kg으로 미리 로우딩된 습한 스티렌-디비닐 벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) 50kg을 탈이온수 150l에 현탁시킨다. 슬러리를 50% 수산화나트륨으로 pH 7.8로 조정하고 45분 동안 교반한다. 혼합물을 여과하고, 50% 수산화나트륨으로 pH 7.8로 조정된 탈이온수 50l로 케이크를 세척한다. 40psig에서 15분 동안 공기로 케이크로부터 세척제를 제거한다. 실질적인 색상 및 적은 반코마이신을 함유한, 수지 여과액 및 세척제를 버린다.

상기 작업을 되풀이함으로써 수지를 다시 한번 세척한다. 두 번 세척된 수지를 반코마이신 용출을 위하여 모은다.

세척 수지 20kg분을 pH 9-11에서 알칼리로 용출시킨다. 수지 용출액을 탄소로 탈색한다.

고체 염화나트륨(14.3kg)을 탄소 처리된 여과액 및 세척제(120l, 16.1g/l 반코마이신)에 첨가한다. 용액을 혼합하고, 50% 수산화나트륨을 첨가함으로써 pH를 8.0으로 조정한다. 용액을 20-28°C에서 24시간 동안 교반한다.

침전 반코마이신 중성을 여과하고 케이크를 5% w/v 수성 염화암모늄용액 20l 및 메탄올 15l로 세척한다. 40psig에서 15분 동안 질소로 케이크로부터 용매를 밀어낸다. 케이크를 40°C 진공하에서 건조시켜 로우딩된 수지로부터 69.2%의 전체 수율에 대하여 1007 mcg/mg을 분석하는 반코마이신 중성 1806g을 산출한다.

[실시예 4]

[염화나트륨으로 반코마이신의 분리]

스티렌-디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (20.33g/l)로부터의 용출액 500ml에 염화나트륨 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 1065 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 를 알린다.

[실시예 5]

[염화 리튬으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (20.33g/l)로부터의 용출액 500ml에 염화리튬 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 980 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 를 알린다.

[실시예 6]

[염화 칼륨으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (20.33g/l)로부터의 용출액 500ml에 염화칼륨 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 906 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 를 알린다.

[실시예 7]

[염화 바륨으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (20.33g/l)로부터의 용출액 500ml에 염화바륨 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 940 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 를 알린다.

[실시예 8]

[염화마그네슘으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (20.33g/l)로부터의 용출액 500ml에 염화마그네슘 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 810 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 를 알린다.

[실시예 9]

[염화 칼슘으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (20.33g/l)로부터의 용출액 500ml에 염화칼슘 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 1065 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 를 알린다.

[실시예 10]

[브롬화 나트륨으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (14.6g/l)로부터의 용출액 500ml에 브롬화 나트륨 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한

다. 고체의 Hplc 분석은 역가 1020 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 을 알린다.

[실시에 11]

[요오드화 칼륨으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (14.6g/ℓ)로부터의 용출액 500ml에 요오드화 칼륨 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 984 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 을 알린다.

[실시에 12]

[요오드화 나트륨으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (14.6g/ℓ)로부터의 용출액 500ml에 요오드화 나트륨 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 949 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 을 알린다.

[실시에 13]

[브롬화 리튬으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (14.6g/ℓ)로부터의 용출액 500ml에 브롬화 리튬 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 990 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 을 알린다.

[실시에 14]

[브롬화 칼륨으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (14.6g/ℓ)로부터의 용출액 500ml에 브롬화 칼륨 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 1011 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 을 알린다.

[실시에 15]

[황산 나트륨으로 반코마이신의 분리]

스티렌디비닐벤젠 양이온 교환 수지(2% 가교) (14.6g/ℓ)로부터의 용출액 500ml에 황산 나트륨 50g을 첨가한다. pH를 8.0으로 조정하고 18시간 동안 계속 교반한다. 혼합물을 여과하고 케이크를 물로 세척한다. 고체의 Hplc 분석은 역가 1012 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 을 알린다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

pH5 내지 9의 수용액으로부터 반코마이신을 분리하는 방법에 있어서, 상기 용액에 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속 무기염을 약 5% 내지 약 10% 농도 범위로 첨가함으로써 상기 용액으로부터 반코마이신을 분리하는 것을 개선점으로하는 반코마이신 분리 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속 무기 염의 농도는 약 10%이고, pH는 약 7.8내지 약 9.0이고, 온도는 약 20℃내지 약 25℃이고, 반코마이신의 침전이 일어나는 시간은 약 16내지 약 24시간이며 반코마이신 농도는 5-200g/ℓ 범위인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속 무기염은 알칼리 금속 또는 알칼리토류 금속 무기 할로겐화물인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속 무기 할로겐화물은 염화나트륨, 염화칼륨, 염화리튬, 염화바륨, 염화마그네슘, 염화칼슘, 브롬화나트륨, 요오드화칼륨, 요오드화나트륨, 브롬화리튬, 브롬화칼륨 또는 황산나트륨인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 무기염은 염화나트륨인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 무기염은 염화나트륨인 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 무기염은 염화나트륨인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 무기염은 염화나트륨인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 반코마이신을 함유한 수용액의 농도는 최소한 5g/ℓ 인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 반코마이신을 함유한 수용액의 농도는 최소한 5g/ℓ 인 방법.