



(12) **Øversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2470555 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 7/62 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Øversettelse publisert	2015.05.18
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.12.24
(86)	Europeisk søknadsnr	10757791.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.09.29
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.07.04
(30)	Prioritet	2009.10.30, US, 256344 P
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Xellia Pharmaceuticals ApS, P.O. Box 1736, 2300 København, DK-Danmark
(72)	Oppfinner	KOCH, Torben, Rødkildevej 62, DK-2400 København NV, DK-Danmark OVERBALLE-PEDERSEN, Carsten, Sandholtvej 10, DK-2650 Hvidovre, DK-Danmark
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for rensing av colistin og rensede colistinkomponenter
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A2-98/20836 LI J ET AL: "Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections" LANCET INFECTIOUS DISEASES, ELSEVIER LTD, US LNKD- DOI:10.1016/S1473-3099(06)70580-1, vol. 6, no. 9, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 589-601, XP024968612 ISSN: 1473-3099 [retrieved on 2006-09-01] GMUR D J ET AL: "Determination of polymyxin E1 in rat plasma by high-performance liquid chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/S1570-0232(03)00162-4, vol. 789, no. 2, 15 June 2003 (2003-06-15) , pages 365-372, XP004422967 ISSN: 1570-0232 DECRESCENZO HENRIKSEN E ET AL: "Polymyxin E production by P. amylolyticus" LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, OXFORD, GB LNKD- DOI:10.1111/J.1472-765X.2007.02210.X, vol. 45, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 491-495, XP002551295 ISSN: 1472-765X [retrieved on 2007-07-25]

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for å rense antibiotika.

Bakgrunn

- 5 Økende multidrug-resistens i Gram-negative bakterier, *spesielt Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella pneumoniae*, representerer et
prekært problem. Begrensede terapeutiske muligheter har tvunget infeksjons-
klinikere og mikrobiologer til å gjeninnføre klinisk bruk av colistin (også kalt
polymyxin E), et polymyxin-antibiotika som ligner, men som ikke er identisk med
10 polymyxin B.
Colistin kan ha spesielle fordeler framfor polymyxin B på grunn av dets bredere
terapeutiske index.

- Colistin ble først isolert i 1947 fra *Bacillus polymyxa var. colistinus* og består av en
15 blanding av polypeptider produsert ved fermentering. Hovedkomponentene er
polymyxin E1, E2, E3 and E1-Ile (Fig. 1).

- Kommersielt opptrer colistin som colistin sulfate, som er brukt oralt for
magedekontaminering og topisk som et pulver for hudinfeksjoner og som
20 colistimetat-natrium, som er brukt parenteralt og til inhalering. Colistimetat-natrium
er funnet å være mindre toksisk og å ha færre uønskede bivirkninger enn colistin,
men er også mindre potent (jf; Critical Care 2006, 10:R27 (doi:10.1186/ cc3995) av
Falagas og Kasiokou).

- 25 Colistinsulfate blir ofte formulert i salver, otiske suspensjoner og otiske og
oftalmiske løsninger. Colistinsulfate blir også administrert oralt som suspensjoner
eller tabletter for behandling av tarminfeksjoner, eller for å hemme tarmflora.

- Colistimetat-natrium er et semisyntetisk forløpermedikament av colistin som kan
30 brukes for behandling av *Pseudomonas aeruginosa*-infeksjoner i cystisk fibrose-
pasienter og det har nylig kommet i bruk for behandling av
multimedikamentresistente *Acinetobacter*
infeksjoner. Colistimetat-natrium har også blitt gitt intratekalt og intraventrikulært
ved *Acinetobacter baumannii* og *Pseudomonas aeruginosa* meningitt/ventrikkulitt.
35 Colistimetat natrium hydrolyseres lett til en mengde metansulfonerte derivater i
vandig løsning, og er veldig vanskelig å analysere.

- Fordi colistin ble introdusert i klinisk praksis for over 50 år siden, ble dets
egenskaper aldri dokumentert så grundig som moderne legemidler blir, f.eks. med
40 spesifikke krav relatert til farmakologi, toksikologi, innhold av urenheter, etc.

Av den grunn inneholder kommersielt tilgjengelige colistinprodukter, i tillegg til hovedkomponenten polymyxin E₁, mange beslektede aktive og inaktive substanser/urenheter, hovedsakelig stammende fra fermenteringsprosessen. Et typisk HPLC kromatogram av colistin er vist i Fig. 2.

5

Hovedkomponenten i kommersielt colistin, polymyxin E₁, utgjør typisk ca. 60% av det tørre produktet. Noen av de beslektede substansene i colistinprodukter har blitt karakterisert (Fig 1), men de fleste urenheterne er fremdeles ukjente.

Minimumsaktiviteten til colistinsulfat som angitt av USP (United States

10

Pharmacopoeia) er "ikke mindre enn 500 µg/mg", men den spesifikke antimikrobiologiske aktiviteten av hver komponent er for en stor del ukjent.

[0009] Selv om produktet har blitt brukt i mer enn 50 år, er det ingen standardisert dosering av colistin og ingen detaljerte forsøk publisert om farmakologi eller farmakokinetikk. Den optimale doseringen av colistin er for de fleste infeksjoner ikke kjent. Likeledes, den anbefalte "maksimal" dosen for hvert preparat er

15

forskjellig. Hvert land har forskjellige generiske preparater av colistin og den anbefalte dosen vil avhenge av produsenten.

20

Colistin sulfat og colistimetatnatrium kan begge bli gitt intravenøst og som aerosoler, men doseringen er komplisert. Colistimetat-natrium fra noen produsenter er angitt i internasjonale enheter, mens det samme produktet fra andre produsenter er angitt i milligram av colistinbase. Det komplette fraværet av regulering eller standardisering av dose, gjør intravenøs colistindosering til et mareritt for enhver

25

Hovedtoksisiteten beskrevet ved intravenøs behandling er nefrotoksisitet (skade på nyrene) og nevrotoksisitet (skade på nervene), men dette kan reflektere de veldig høye dosene som ble gitt i tidligere tider, hvilke var mye høyere enn dosene som i dag er anbefalt av noen produsent og for hvilke ingen justering ble gjort for nyresykdom. Hovedtoksisiteten beskrevet ved aerosolbehandling er bronkospasmer.

30

I fravær av støttende data, kan en spekulere hvorvidt noe av toksisiteten av colistin kan tilskrives relaterte substanser og urenheter tilstede i de nåværende kommersielle produktene. Og videre, når man syntetiserer colistimetat-forløpermedikament ved bruk av «urent» colistin som startmateriale, vil hver relaterte substans og urenheter danne basis for flere metansulfonatderivater, og derved danne et meget komplekst endelig produkt – hvor de toksikologiske egenskaper for hver av de individuelle substansene er ukjent.

35

40

Basert på toksikologiske og farmakologiske betraktninger over, kan man se store fordeler ved å bruke en "mono-komponent"-type av colistin for medisinsk bruk. En slik mono-komponent colistin vil inneholde en veldig høy andel av

hovedkomponenten polymyxin E₁ (> 90%, sammenlignet med nåværende 60%), med alle hoved-urenheter identifisert og karakterisert.

Et mono-komponent colistin byr på flere fordeler:

- 5 1) Mulighet for å oppklare toksikologiske bidrag av hovedkomponent (PE₁), relaterte substanser og urenheter.
- 2) Produkt mottakelig for nye og mer presise farmakologiske og farmakokinetiske undersøkelser.
- 10 3) Mulighet for å syntetisere veldefinerte derivater, f.eks. colistimetat uten å danne et mangfold av dårlig definerte substanser.
- 4) Mulighet for å utvikle bedre og mer presise analytiske metoder både for colistin og colistimetat som forenkler regulatoriske prosedyrer.
- 5) Utvetydig doseringsanbefaling basert på entydige farmakologiske og toksikologiske data.
- 15 6) Oppgradering av colistin til et “moderne” antibiotika, hvilket er ettertraktet.

De Crescenzo Henriksen, et al. (Lett Appl Microbiol 45, 491-496 (2007) beskriver polymyxin E rensing fra *P. amylolyticus*-stammer på et analytisk nivå ved bruk av RP-HPLC-rensetrinn ved bruk av isopropanol og metanol mobilfase- gradienter. WO98/20836 beskriver renseprotokoller av forskjellige colistin-komponenter, blant dem polymyxin E, ved bruk av acetonitrilgradienter i RP-HPLC.

Et annet langtidsmål ville være å utsette det rensende PE1 for nye in vitro- og in vivo-effektivitetsstudier og for toksikologiske studier for å sammenligne med eldre studier av polymyxingruppen. Det er et innstendig behov for slike randomiserte og kontrollerte studier for å oppklare forskjellige problemstillinger angående effektiviteten og sikkerheten av polymyxiner (Crit Care Clin. 2008 Apr; 24(2):377-91, av Micholopoulos og Falagas).

30

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår en metode for å rense colistin komponenter, og spesielt hovedkomponenten polymyxin E₁.

35

Foreliggende oppfinnelse angår en metode for å produsere tilnærmet rene preparater av hovedkomponenten av colistin, polymyxin E₁ (90-98% renhet), kalt colistin mono-komponent.

Metoden er en enkel kromatografisk metode som gjør bruk av lite toksiske løsemidler. Metoden involverer revers fase (RP)-kromatografi, som tillater rensing av Polymyxin E₁ til en renhet på mer enn 90%, etterfulgt av hydrofob interaksjonskromatografi (HIC).

40

Metoden er karakterisert ved

- loading av RP kolonne med colistin base i eddiksyre og 20 - 30% etanol
- eluering med 10 - 15% etanol.

- 5 Overraskende kan metoden brukes til å effektivt separere Polymyxin E₁ fra andre colistin hovedkomponenter.

Arbeidet med å identifisere egnede RP-materialer ble utført i laboratorieskala på 10 x 250 mm stålkolonner.

10

Merck LiChrospher 60 RP-select B, 15 mm (C8) viste seg å være et egnet resin for rensing av PE₁ fra colistin base i laboratorieskala, og lab-metoden ble skalert opp fra 1 gram til femtograms nivå på en 50 x 850 mm stålkolonne.

- 15 En fremgangsmåte ble utviklet, hvorved colistinbase ble oppløst i 24% (4 M) etanol og 0.1 M eddiksyre og separert i polymyxin E-fraksjoner. Hovedkomponenten, PE₁ ble isolert med en typisk gjenvinning på 60% og en relativ kromatografisk renhet på 94-98%.

- 20 I den Europeiske Farmakope (EP) er potensen til en lott icolistinsulfat definert som %-vis summert innhold av polymyxin faktorer PE₁, PE₂, PE₃, PE₁-Ile og PE₁-7MOA, bestemt ved HPLC «som den er» basis. Den totale potensen av disse faktorene skulle utgjøre ikke mindre enn 77.0%. Videre, EP angir maksimum-grenser (NMT; «not more than») av spesifikke faktorer som: PE₁-Ile (NMT 10%),
25 PE₁-7MOA (NMT 10%), PE₃ (NMT 10%), and hovedurenhet NMT 4%.

Ved bruk av den beskrevne rensetmetoden, har det endelige produktet en typisk sammensetning som følger: PE₁ (94-98%), PE₂ (0-0.1), PE₃ (0.0), PE₁-Ile (0.2-1.0%), PE₁-7MOA (0.5-2.0%), og totale gjenværende urenheter 0.5-2.0%.

30

Kort beskrivelse av Figurene

Fig. 1. Molekylær struktur av hovedkomponenten i colistinsulfate, polymyxin E₁-sulfate og relaterte substanser.

- 35 Fig. 2. HPLC-kromatogram av colistin Ph. Eur. kjemiske referansesubstans.

Fig. 3. Grafene illustrerer den relative kromatografiske renhet som funksjon av fraksjonsnummer under rensing av colistin base; f1-E1 og f2-E1 i grafen er samlet referert til som f1 i den beskrivende del av søknaden; eE1 er ekvivalent til e1/e2, eeE1 er ekvivalent til e3, mens eee... er summen av mindre ukjente urenheter

- 40 Fig. 4. Grafene illustrerer de forskjellige komponenters topp-areal som funksjon av fraksjonsnummer under rensing av colistin base; f1-E1 og f2-E1 i grafen er samlet

referert til som f1 i den beskrivende del av søknaden; eE1 er ekvivalent til e1/e2, eeE1 er ekvivalent til e3, mens eee... er summen av mindre ukjente urenheter
 Fig. 5. HPLC kromatogram av colistin mono-komponent (PE₁) med hoved-urenheter.

5

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

"Colistin" er ment å dekke enhver blanding av antibiotiske peptid-komponenter hvor hovedkomponenten er Polymyxin E₁ eller salter derav.

10 "Polymyxin E₁" er ment å omfatte forbindelsen tidligere angitt som Colistin A, like mye som forbindelsen angitt som 7722-44-3 av Chemical Abstracts, like mye som N2-(6-Metyl-1-oksooctyl)-L-2,4-diaminbutanoyl-L-treonyl-L-2,4-diaminbutanoyl-L-2,4-diaminbutanoyl-L-2,4-diaminbutanoyl-D-leucyl-L-leucyl-L-2,4-diaminbutanoyl-L-2,4-diaminbutanoyl-L-treonin-syklisk (10-4)-peptid, så vel
 15 som Colistin IV.

"Colistin base" er ment å omfatte ethvert colistin inneholdende 30-70% Polymyxin E₁.

20

"Colistinsulfat" er ment å omfatte ethvert sulfat-salt av colistin

"Colistimetat" er ment å omfatte ethvert metansulfonert derivat av colistin

25 En "sammensetning" er enhver blanding som inneholder mer enn to forskjellige forbindelser, for eksempel en blanding av to aktive farmasøytiske ingredienser, eller en blanding av en aktiv farmasøytisk ingrediens og en eller flere farmasøytiske eksipienter.

30 Termen "komponent" eller "komponenter" brukt i denne søknaden refererer til en spesifikk forbindelse i en sammensetning. Følgelig, "Mindre komponenter" er forbindelser funnet i relativt små mengder i en sammensetning.
 Et "farmasøytisk preparat" er en hvilken som helst sammensetning som er egnet for anvendelse in vivo. Slike preparater kan således bli administrert kutant, subkutant,
 35 intravenøst, parenteralt, oralt etc.

"Separasjon" er enhver metode hvor en ønsket forbindelse er atskilt fra en annen forbindelse (analytisk eller preparativt).

40 "Rensing" er en hvilken som helst separasjonsmetode ved hvilken konsentrasjon av en ønsket forbindelse økes.

"Kromatografi" er en hvilken som helst renseteknikk som involverer en stasjonær fase og en mobil fase.

5 "En stasjonær fase" er en hvilken som helst overflate som omfatter ligander som er i stand til å binde forbindelser.

"Ligander" er deler av den stasjonære fase, ved hvilken bindingen av forbindelsene skjer.

10 "En mobil fase" er et hvilken som helst fluidium, løsemiddel, væske eller blanding som kan sive gjennom eller langs den stasjonære fasen i en bestemt retning.

15 "Revers fase kromatografi" er enhver kromatografi hvorved de mer polare eller ladede komponentene blir eluert før de mindre polare.

"Hydrofob interaksjonskromatografi" er enhver kromatografi basert på interaksjon mellom stasjonærfasens u-polare ligander og u-polare forbindelser eller deler av upolare forbindelser.

20 "Høy etanol konsentrasjon" betyr etanol konsentrasjoner høyere enn, eller lik 20% av volumet, typisk 20%-30%.

"Lav etanol konsentrasjon" betyr etanol konsentrasjoner lavere enn 20% av volumet, typisk 10%-15%.

25 "% v/v " betyr volumprosent.

Kommersiell colistin base er en blanding av flere nært beslektede decapeptid-fettsyreamider, inkludert polymyxin E₁, polymyxin E₂, polymyxin E₃ og polymyxin E₁-isoleucin (Fig. 1).

30 Ambisjonen om å isolere den viktigste komponenten polymyxin E₁ (PE₁) fra colistin base førte til en undersøkelse av hvorvidt en revers fase (RP) HPLC-metode ville være egnet for isolering av, og for å oppnå PE₁ av høy relativ kromatografisk renhet
35 (> 90%).

Litteraturen gir bare noen få RP-separasjonsmetoder, og de viktigste organiske løsemidler som brukes er acetonitril og metanol. Disse løsemidlene er giftige, og bør unngås i pilot og storskalaproduksjon. Imidlertid, et mikrogramnivå C18-
40 HPLC-separasjonsforsøk med colistinsulfat ved bruk av en etanolgradient fra 0 til 60% indikerte, ganske overraskende at det kan være mulig å benytte det forholdsvis

ikke-toksisk løsemiddelet etanol for en industrielt anvendelig rensemetode for polymyxin E1.

5 Startmaterialet, colistin base, fremstilles ved fermentering og rensing, og er et mellomprodukt i produksjon av bulksubstansen colistinsulfat. Startmaterialet inneholder ca. 60% PE₁, varierende med noen prosent mellom produksjonslottene. Det opprinnelige målet var å oppnå en relativ kromatografisk renhet av polymyxin E1 sulfat av > 90%. Med dette målet, ble en rekke kolonnematerialer screenet med

10

Polymyxin E₁ (fig. 1) har karakter som en ionisk detergent med en del polart dekaeptid og en del ikke-polar fettsyre. Molekylet består av en syklisk heptapeptid koblet til et 6-metyl-oktanacylert lineært tripeptid. Ettersom molekylet inneholder seks rester av 1,4-diaminsmørsyre (DAB), hvorav den ene deltar i tre

15 peptidbindinger, er det 5 primære aminogrupeer i likevekt med deres tilsvarende ammoniakk (NH₄⁺) grupper, som utgjør den sterkt polare del av molekylet.

20

Den molekylære interaksjonen mellom RP-resinet, og molekylet er antatt å finne sted ved fettsyre-delen og de ikke-polare regioner av peptiddelen.

For monitorering av HPLC-fraksjoner og mengder, ble en analytisk HPLC-metode utviklet basert på en standard-metoden. Den forbedrede metoden avdekket en liten mengde relaterte komponenter (f1, e1, e2) under PE₁ hovedtoppen som var usynlig ved bruk av konvensjonell HPLC-metode.

25

Eksperimentelt

Preparativ HPLC

30 10 x 250 kolonne: For screening av kolonnematerialer i milligramskala, ble en stålkolonne 10 x 250 mm benyttet. Kolonnen ble fylt med de forskjellige testede resiner suspendert i 96% etanol.

50 x 830 kolonne: For preparativ rensing i gram skala, ble en 50 x 850 mm stålkolonne brukt som beskrevet nedenfor. Det valgte kolonnematerialet, ca. 1 kg Merck LiChrosphere 60 RP select B (15 µm), ble suspendert i 96% etanol og fylt på

35 kolonnen. Toppflensen ble festet og stempelet skjøvet oppover til 50 bar inntil alt overskudd av etanol ble fjernet. Kolonnen ble testet ved påføring av 1 ml av en 0.1 mg/ml kaliumjodid-oppløsning, og absorpsjon ble målt ved 227 nm, AUFS = 0.05 og gjennomstrømning 55.5 ml/min. Den målte topp var en smal Gauss-kurve med

40 tilfredsstillende symmetri.

Det preparative HPLC-systemet bestod av:

- | | | |
|----|------------------|---|
| | Kolonner: | 10 x 250 mm rustfritt stål-Merck-kolonne og en 50 x 850 mm rustfritt stål-kolonne med en dynamisk aksial kompresjon produsert av Dan Process A/S |
| 5 | Pumper: | Waters Delta Prep 4000 med et gjennomstrømningsintervall på 0.5-150 ml/min, med 4 forskjellige løsemiddelporter med en blandingsventil på lavtrykksiden |
| | Detektor: | Waters 486 Tunable Absorbance Detector |
| | Integrator: | Merck-Hitachi D-2000 Chomato-Integrator |
| 10 | Fraksjonssamler: | Waters Fraction Collector |

- 15 Absorbansen av eluenten ble detektert ved 230 nm, hvor det er en cut-off for eddiksyre. På kortere bølgelengder, viste eluenten for mye interferens. Fraksjoner i milligram skala ble samlet i 25 ml reagensglass, mens fraksjonene i gram skala ble oppsamlet i 250 ml Bluecap flasker.

- 20 For regenerering av 10 x 250 mm og 50 x 850 mm kolonner etter hver HPLC-kjøring, ble en blanding inneholdende 24% etanol og 50% 1,2-propylenglykol i 0.1 M CH₃COOH anvendt. Av og til ble det observert høyt mottrykk med 50 x 850 mm kolonne, som så ble pakket på nytt eller skylt med 96% etanol før trykket ble normalt.

Analytisk HPLC:

- 25 Brukt kolonne var Novapak 4.6 x 150, 4 µm, C18 med acetonitril som mobilfase. Konsentrasjonen av CH₃CN-oppløsningen ble økt fra 21% (etter 10 minutter isokratisk kjøring) til 30% i løpet av et 5 min. tidsintervall. Kolonnene ble ikke termostattert, men kjørt ved romtemperatur (23 ± 2°C).

- 30 Det analytiske HPLC-system bestod av:

- | | | |
|----|------------------|--|
| | Kolonner: | Waters Novapak 4.6 x 150, 4µ C18 og ekvivalent 4,6 x 250 kolonne |
| | Pumper: | 2 psc. Waters 510 med Waters Pump Control Module |
| 35 | Detektor: | Waters 490 E programmerbar Multibølgelengde Detektor |
| | Fraksjonssamler: | Waters 717 plus Autosampler |

Systemet ble kontrollert av Waters programvare Millenium.

Oversikt over testede resiner:

- 1) Merck No.9303 LiChroprep RP-18, 25-40µm, batch: L 275703 614.
- 2) Merck No.9324 LiChroprep RP-8, 25-40µm, batch: L 240124 541.
- 5 3) Merck No. 11023 LiChrospher 60 RP-select B, 15µm, (C8), batch: L 139923 633.
- 4) Merck No.150385 Hibar Fertigsäule RT LiChrospher, RP-18, 15µm, Cat. 50014.
- 5) Eka Nobel Kromasil-100 Å, C8, 16µm, batch: DT0026.
- 6) ToosoHaas Amberchrom CG 71 S, 35µm, Lot No. 23770319.
- 10 7) ToosoHaas No. 22227 Toyopearl MD-P Ether, 35µm, svakt hydrofob
- 8) ToosoHaas No. 22225 Toyopearl MD-P Butyl, 35µm, sterkt hydrofob

Kjemikalier for forsøkene med 10 x 250 kolonner:

- 15 Colistinsulfat, batch: A4660314, Axellia ApS, Copenhagen DK
Colistinbase, batch: A1551701, Axellia ApS, Copenhagen, DK
Etanol, 96%, "Danisco Distillers", Danisco A/S
Metanol, Merck LiChrosolv no. 6018
Dimetylsulfoksid, Merck Uvasol No. 2950
- 20 1,2-Propandiol reinst, Merck no. 7478
2-Propanol, LiChrosolv gradientgrad, Merck No. 1040
Eddiksyre, 100% G.R. Merck No. 63
1-Metylpyrrolidon-(2) z.s., Merck No. 806072
Trietylamin, Picrce No. 25108
- 25 Tetrahydrofuran, Fluka No. 87367
Ammoniumacetat p.a., Merck No. 1116
Ammoniumsulfat p.a., Merck No. 1217
Svovelsyre 98% p.a.
Natriumhydroksidpellets, GR, Merck No. 6498
- 30 Mili-Q-water, Purification lab., R&D, FCD, Axellia ApS, Copenhagen, DK
Millipore, type HV membranfilter, 0.45µm.

Kjemikalier for forsøkene med 50 x 825-kolonner:

- 35 Etanol 96% and 99.9% from Danisco Distillers, Danisco A/S
Eddiksyre, 100% G.R. Merck No. 63
Natriumhydroksidpellets, GR, Merck No. 6498
NaOH, 27% Production dept.
Kaliumhydroksid, USP XIX, Ferak Berlin No. 20907

Forsøk med 10 x 250 kolonner:

De følgende kromatografiske resiner viste seg å være uegnet for separasjonsoppgaven enten på grunn av sterk binding til resinet, fremtredende haleprofil, lav kromatografisk renhet eller lavt utbytte: ToosoHaas Amberchrom CG 71 S; ToosoHaas Toyopearl MD-P Eter, 35µm, ToosoHaas Toyopearl MD-P Butyl, 35µm; Merck LiChroprep RP-8, 25-40µm; Merck Hibar RT Fertigsauale LiChrospher RP-18, 15 µm; Eka Nobel Kromasil-100 Å, C8, 16µm

For de første 10 x 250 kolonneforsøk med Lichroprep C18, 25 - 40µm med en etanolgradient fra 0% til 60% i løpet av 60 min. ved pH ~ 3.5 (50 mM HAc) med applisert 11 mg colistin sulfat, ble det oppnådd en relativ kromatografisk renhet (RCP) på ca. 90% med gode utbytter. Imidlertid, når man forsøkte å redusere etanolkonsentrasjonen ved påføring en 10 til 25% etanol-gradient i løpet av 45 min. på samme vilkår, ble ingen separasjon og en fremtredende haleprofil observert.

Liknende forsøk med 5 mM NH_4HSO_4 ved pH = 2.5 resulterte i fullstendig binding av forbindelsene på kolonnen. Dette, og lignende eksperimenter indikerte sterkt at colistin base, snarere enn colistin sulfat skal brukes for rensing PE_1 under de valgte betingelser.

Dersom 1,2-propylenglykol (1,2-PG) ble tilsatt som erstatning for en del av etanolen, f.eks. ved et konsentrasjonsnivå av 24% etanol og 20% 1,2-PG, og eddiksyrenivået (pH = 3) ble øket til ca. 1%, ga dette, overraskende et PE_1 produkt med en RCP på ca. 90% med 70% utbytte.

Basert på disse innledende forsøk, ble det konkludert med at eddiksyre hadde en positiv innvirkning på forbindelseslikevekten mellom resin (LiChroprep C18) og elueringsmiddel, og at man bør heller bruke colistin basen oppløst i fortynnet eddiksyre istedenfor colistinsulfat. Imidlertid resulterte bruken av 1,2-propylenglykol /etanol-blanding i et uttalt trykkfall med dette kolonnematerialet, og denne spesielle resin og løsningsmiddelblanding med ble derfor ansett som uegnet for oppskalering.

Det ble klart at ikke bare fettsyregruppen og ikke-polare aminosyrer var involvert i kolonnebinding, men at også amino- og ammonium-grupper var involvert.

Eksperimentene ovenfor ga noen overraskende resultater, f.eks at a) HMS-vennlig løsemiddel etanol var nyttig som elueringsmiddel for revers fase (RP) HPLC-separasjon av colistin, og at b) separasjon bør utføres med colistin base i nærvær av eddiksyre i stedet for å bruke colistinsulfat for ytterligere rensing. Selv om resinet LiChroprep C18 viste lovende separasjonsegenskaper, viste det seg ikke egnet for oppskalering.

Listen over kommersielt tilgjengelige kromatografisk media er omfattende, men etter grundig screening og utvalg lyktes vi med å identifisere en egnet kandidat fra Merck, nemlig LiChrospher 60 RP-select B 15µm (C8).

- 5 Bruk av lineære gradienter 5-24% etanol i 0.1 M eddiksyre ga lovende separasjoner med lite fremtredende haleprofil. Gradienter fra 5 til 15% etanol i 0.1 M eddiksyre (pH = 3) fungerte bra, men med en RCP på bare 85 til 90% og PE1 med lavt utbytte. [0074] Et stort gjennombrudd kom da en revers etanol gradient ble prøvd ut (dvs. applisering ved høy konsentrasjon og eluering ved lavere konsentrasjon av etanol).
- 10 De første forsøk med de følgende parametere viste seg å gi en samling med 90-95% PE1 og ca. 70% utbytte:

	Ekvilibrering:	5% etanol i 0.1 M eddiksyre
	Applisering:	110 mg colistin basen oppløst i 4 ml 30% etanol i 0.1 M eddiksyre
15	Eluent:	15% etanol i 0.1 M eddiksyre, ved en temperatur på 60 ° C
	Temperatur:	40 ° C
20	Eluentgjennomstrømning:	2.22 ml/min

- Den høyere temperaturen ble valgt for å nå likevekt av colistin komponentene mellom fast fase og elueringsmiddel raskere, men eksperimenter viste at høyere temperatur ikke har noen markert innvirkning på resultatene. Temperaturene i både
- 25 kolonne oven og eluentfasen ble dermed redusert fra 40°/60° til 35°/50 ° uten noen vesentlig endring av oppsamlingens renhet og utbytte. Til slutt ble en 5 til 15% etanol-gradient i 0.1 M eddiksyre kjørt ved 30°/40° med gode resultater, som bekrefter at den reversgradienten faktisk var ansvarlig for den store positive endring i relativ kromatografisk renhet, utbytte og haleprofil.

- 30 Det skal bemerkes at en modifisert, analytisk HPLC-metode ble gjennomført i løpet av utviklingsarbeidet og at denne nye metoden avdekket noen beslektede stoffer, f1 og e1/e2, som tidligere ble maskert av hovedtoppen E₁.

- 35 Den aktuelle substans f1 eluerer på forsiden av PE₁ toppen, mens stoffene e1/e2 eluerer som en dobbel topp med to mer eller mindre delte maksima ved halen av PE1 toppen. Disse to stoffene er spesielt vanskelig å separere fra PE₁ og utgjør en renseutfordring ved fremtidig optimalisering av den preparative HPLC-metoden. Se særlig Fig. 3 og fig. 4, hvor separasjon av PE₁ og beslektede substanser er illustrert
- 40 med diagrammer som viser fordelingen av komponenter som funksjon av HPLC-fraksjon.

På Fig. 3 blir den relative kromatografiske renhet av polymyxin E₁ sammenlignet med beslektede stoffer som funksjon av fraksjonsnummer. De relaterte stoffer som er mest vanskelig å skille fra PE₁ er e₁/e₂, mens E₁-isoleucin, f₁ og e₃ (eluering etter e₁/e₂) er lettere å fjerne. Fig. 4 viser resultatene fra et utbytteperspektiv, hvor integrasjonen av komponenttopper er plottet som funksjon av fraksjonsnumrene. Hovedoppsamlingen spenner vanligvis over fraksjoner 7 til 12, men renheten kan økes ved smalere utvalg av fraksjoner.

Eksempler - metoder for rensing av polymyxin E₁ fra colistin base

10

Eksempel 1 - RP-HPLC rensingen; miniprep-skala

Utstyr: Stålkolonne 10 x 250 mm (ø = 10 mm)

Waters Delta Prep 4000 Prep. Chrom. System

15

Waters 4000 System Controller

Waters 486 Tunable Absorbance Detector

Waters Fraction Collector

Merck Hitachi D-2000 Chromato-Integrator

20 Resin: LiChrospher 60 RP-select B Merck No: 11 023.

Gjennomstrømming: 2.22 ml / min. (Skalert opp til 300 x 700 mm ~ 2 l/min.)

λ: 230 nm

AUFS: 2 (detektorfølsomhet ~ laveste nivå).

A-buffer: 12% Etanol (96%) i 0.10 M CH₃COOH i Mili-Q-vann

25 Appliseringsløsn.: Colistin base, 600 mg ~ 0.5 mmol ble oppløst i 15 ml 24% etanol (fra 96%) i 0.10 M CH₃COOH ved tilsetning av 5 syreekvivalenter av CH₃COOH ~ 2.5 mmol ~ 0.15 ml 100% CH₃COOH (17M); justert med 2 M NaOH til pH = 7.5; oppløsningen blir membranfiltrert (0.45 μm)

30

1) Ekvilibrering av kolonnen: ekvilibrert med A-buffer

2) Applisering: colistin-acetatløsning (40 mg/ml) blir applisert 2,22 ml/min, fulgt av 1 ml A-buffer via materøret

35 3) Eluering: Kolonnen elueres umiddelbart med A-buffer og effluenten samlet i 1 ml fraksjoner ~ 2.22 ml

4) Vask av kolonne: 5 ml 96% etanol blir applisert, etterfulgt av A-buffer inntil absorpsjonen er redusert til null-nivå

5) HPLC-analyse: Prøver ble fortynnet til arealet E₁ når 20-30 x 10⁶ AU; høy colistin standard vanligvis når 20 x 10⁶ AU; prøvene analyseres ved bruk av

40 Colistin NovaS (30 min. kjøring).

Eksempel 2 - RP-HPLC rensing; pilot skala:

	Utstyr:	Stålkolonne 50 x 830 mm ($\varnothing = 50$ mm), "Dan-process" Waters Delta Prep 4000 Prep. Chrom. system Waters 4000 System Controller Waters 486 Tunable Absorbance Detector Waters Fraction Collector Merck Hitachi D-2000 Chromatog-Integrator
5		
10	Resin:	LiChrospher 60 RP-select B, Merck No: 11023, 1 kg
	Flow:	65 ml/min. (Skalert opp til 300 x 700 mm ~ 2 l / min.)
	λ :	230 nm
	AUFS:	2 (detektor følsomhet ~ laveste nivå)
	A-buffer:	12% Etanol (96%) i 0.10 M CH ₃ COOH i Mili-Q-vann.
15	Appliseringsløn.:	Colistin base, 50 g ~ 42 mmol (som den er) oppløses i 1000 ml 24% etanol (96%) ved tilsetning av 5.83 syreekvivalenter av CH ₃ COOH ~ 245 mmol ~ 14.5 ml 100% CH ₃ COOH (17M); pH justeres med 2 M NaOH til pH = 7.5; løsningen blir membranfiltrert (0.45) med bruk av Celite som filtrerings-hjelpemiddel
20	Ionestyrke:	4 -6 mS/cm.
	1) Ekvilibrering av kolonne: ekvilibrert med A-buffer	
	2) Applisering: colistinacetatløsning (48 mg/ml) blir applisert 65 ml/min i løpet av 14 min., fulgt av A-buffer i løpet av 0,1 min ~ 43,5 g applisert	
25	3) Eluering: Kolonnen elueres med A-buffer inntil absorpsjonen har sunket til det asymptote 0,010 V $\pm$ 10mV og effluent samlet i 18 fraksjoner av 3 min ~ 585 ml	
	4) Vask av kolonne: 5 ml 96% etanol blir applisert, etterfulgt av A-buffer inntil absorpsjonen er redusert til null-nivå	
30	5) HPLC-analyse: Prøver ble fortynnet til arealet E1 når 20-30 x 10 ⁶ AU; høy colistin standard vanligvis når 20 x 10 ⁶ AU; prøvene analyseres ved bruk av Colistin NovaS (30 min. kjøring).	

35 Eksempel 3 - Total rensing og sluttbehandling; storskala

Colistin sulfat mono-komponent (polymyxin E₁) er et fermenteringsprodukt, noe som innebærer at dets første opptreden er i en fermenteringsbuljong («broth»).

Polymyxin E₁ utvinnes og renses fra væsken som inneholder en stor variasjon av forurensninger og bare et par gram polymyxin E₁ og relaterte substanser per liter.

40

Utvinning fra fermenteringsbuljong omfatter utfelling av colistin (polymyxin E₁) og relaterte substanser og en primærseparasjon ved sentrifugering. Den sekundære rensing består av reversfase-kromatografi og utfelling, noe som resulterer i mer rent produkt med hensyn til polymyxin E₁. De relaterte stoffer og urenheter tilstede i colistin sulfat mono-komponent produkt er i hovedsak co-fermenteringsstoffer.

Under fermentering av colistin, dannes en kompleks blanding av strukturelt beslektede komponenter med et forhold karakteristisk for hver *Bacillus polymyxa* stamme. Eksempler er:

- Endring i fettsyrekjeden, som for eksempel danner enten polymyxin E₁ (med 6-metyl-oktansyre) eller polymyxin E₂ (med 7-metyl-oktansyre),
- Erstatning av aminosyrer i molekylet, for eksempel hvis D-leucin i colistin er erstattet med D-fenylalanin, da dannes det beslektede antibiotikumet polymyxin B. Hvis L-leucin i polymyxin E₁ blir erstattet med isoleucin, da dannes polymyxin E₁-isoleucin.

Rensing ved preparativ HPLC

De følgende buffere blir tilberedt:

Buffer I: 1.6-2 M etanol, og 0.1-0.15 M eddiksyre. Bufferen ble filtrert gjennom et 0.45 µm filter umiddelbart før bruk.
Buffer II: ca. 6.8 M 1,2-propandiol, ca. 4 M etanol og ca. 0.1 M eddiksyre. Bufferen ble filtrert gjennom et 0.45 µm filter umiddelbart før bruk.

HPLC-kolonnen (diameter 30 cm) med et volum på ca. 48 liter, er ekvilibrert med ca. 40 liter Buffer I. Gjennomstrømmingen er 0.8 til 1.2 l/min. (Samme gjennomstrømming brukes for alle HPLC-trinn). Kolonnen ble regenerert med ca. 8 liter buffer II fulgt av ca. 50 liter Buffer I eller inntil UV-signal er tilbake til utgangspunktet.

En vakuumtørket colistin base batch, 1000-1500 g, veies ut og suspenderes i 20 til 30 liter 4 M etanol. Suspensjonen ble oppløst ved tilsetning av en 0.3 M eddiksyre under omrøring i 30 min. pH-verdien justeres til ca. 7.5 med natriumhydroksid, og oppløsningen filtreres gjennom et membranfilter, 0.45 µm. Colistinacetat-løsningen føres gjennom HPLC-kolonne og bindes til resinet. HPLC-kolonnen ble eluert med omtrent 160 liter buffer I. Eluatet oppsamles i fraksjoner. Fraksjoner i samsvar med en forhåndsinnstilt spesifikasjon oppsamles, mens resten av fraksjoner blir kastet. En batch med en renhet på minst 92% med hensyn til polymyxin E₁ er samlet fra fraksjonene. Oppkonsentrering av polymyxin E₁ og fjerning av overskudd av etanol blir utført ved omvendt osmose. Oppsamlingen blir konsentrert til ca. 50 g/l og deretter dialysert med DI-vann (ca. 8 volumer).

Rensing ved hjelp av hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)

De følgende buffere blir tilberedt:

5

Kalibreringsbuffer: Ca. 200 mm (NH₄)₂SO₄; pH-verdien justeres til ca. 7 med fortynnet ammoniakk.

Elueringsbuffer: Ca. 200 mm (NH₄)₂SO₄; pH-verdien justeres til ca. 3.7 med eddiksyre

10

HIC-kolonnen (diameter 35 cm) med et volum på ca. 90 liter, ble ekvilibrert med 250 liter av kalibreringsbuffer, gjennomstrømming ca. 1.7 l/min, etterfulgt av ca. 200 liter elueringsbuffer, gjennomstrømming ca. 1.0 l/min.

15

Saltinnholdet i colistin acetat-løsningen fra omvendt osmose blir justert til ca. 200 mm ved å tilsette (NH₄)₂SO₄ og pH justeres til ca. 7 med fortynnet ammoniakk.

Konsentrasjonen av colistin acetat oppløsningen er 15-20 g/l. Oppløsningen føres gjennom HIC-kolonne, gjennomstrømming 950-1050 ml/min. Elueringen foregår med 10 ganger bed-volumet. Oppsamling av effluentfraksjoner er gjort automatisk

20

av PLC. Prøver blir tatt fra hver fraksjon og analysert. Fraksjoner i samsvar med forhåndsinnstilte spesifikasjoner blir slått sammen, hvilket gav en batch med en renhet på 94-98% med hensyn til polymyxin E₁. Konsentrasjon av polymyxin E₁ og fjerning av ammoniumsulfat utføres ved ultrafiltrering til en konsentrasjon på 10-20 g/l.

25

Utfelling av colistin base monokomponent

Oppløsningen fortynnes til 10 g/l med DI-vann og ble omrørt inntil den er homogen.

pH justeres til 9.6 til 9.8 med natriumhydroksid, og omrøringen ble fortsatt mens colistin base monokomponent utfelles. Bunnfallet utvinnes ved filtrering på en

30

filterpresse. Når filtreringen er fullført, blir kaken vasket med ca. 800 liter DI-vann, hvilket fortrenses av luft. Colistin mono-komponent kaken fjernes fra filterpresse og lagret i fryseren.

Konvertering til colistinsulfat mono-komponent

35

Colistin base monokomponent blir suspendert og oppløst i DI-vann under omrøring. pH justeres til 5.0 med fortynnet svovelsyre. Oppløsningen blir filtrert gjennom 0.45 µm filter.

Lyofilisering, oppmaling og lagring

40

Den filtrerte løsning fylles i frysetørkingskar av rustfritt stål og lyofilisert i omtrent 70 timer ved anvendelse av en PIC kontrollert temperaturprofil i området - 25°C →

+45°C. Det tørre produkt blir fjernet fra frysetørkeren, og oppmalt for å oppnå den ønskede partikkelfordeling.

ANALYTISKE HPLC METODER

5

Metode 1: HPLC for i-prosess-kontroll fra fermentering til colistin base

Utstyr: Waters automatisk HPLC utstyr, som består av:

- 10 Pumpe: Modell 6000 A / 510
 Injektor: WISP 712 A
 Detector: Modell 441
 Pre-filter: Guard Pak, Resolve C18 (kan sløyfes)
 Kolonne: Resolve C18, 10x8.5 micron eller Nova-Pak, 4 micron
 15 Kolonnemontering: RCM 8x10

Metode: Isokratisk

Mobilfase:

20

Buffer: Natriumsulfatdekahydrat, 16.1 g (0.05 M) kons. eddiksyre, 0.56 ml (0.01 M) trietylamin 20 ml (0.15 M), vann til 1000 ml. pH justeres til 2.5 med fosforsyre.

Alternativ buffer: Natriumsulfat 0.04 M, 0.56 M metansulfonsyre, trietylamin 0.087 M, pH 3.0. Før bruk, acetonitril, 170 g, ble oppløst i bufferen til 1000 ml.

25 Oppløsningen avluftes med helium i 15 min.

Analyseprosedyre:

- 30 Gjennomstrømming: 1.5 ml / min, alternativt 1.0 ml / min.
 Temperatur: Ambient.
 Injeksjonsvolum: 20 mikro-L, alternativ 25.
 Deteksjon: 214 nm, 0.1 AUFS eller 1.0 AUFS.
 Kjøretid: 30 min.
 Standard: Autentisk standard colistin sulfat, oppløst i vann for å gi 1 mg/ml.

35

Standard: Colistin base, 1.0 mg/ml i 0.1 M saltsyre.

Analytiske prøver: Fortynnet til å inneholde 0.5-1 mg/ml. Fortynningsmiddel: 3% fosforsyre, 40 ml, og acetonitril, 60ml. Sentrifugering hvis grumset.

40 Metode 2: HPLC for colistin base til det endelige bulkprodukt

Utstyr: Waters automatisk HPLC utstyr, som består av:

Pumpe: Modell 510

Injektor: 717 pluss auto sampler

Detector: 490 E

Pre-filter: Guard Pak, Nova-Pak, C18

5 Kolonne: Nova-Pak, C18, 60Å, 4 µm, 150 x 4.6 mm.

Kolonne ovn: Jones Kromatografi Modell 7955

Reagenser:

10 Natriumsulfat, vannfritt, pro analyse

Trietylamin, HPLC-kvalitet

Metansulfonsyre, $\geq 99\%$

Milli-Q vann

15 Buffer: Natriumsulfat, vannfritt 28.4 g (0.10 M), trietylamin 14.0 ml (0.05 M), metansulfonsyre 10.0 ml (0.06 M), Milli-Q vann til 2000 ml. Bufferen er vakuumbfiltrert gjennom et 0.45 µm filter.

A-eluent: 50% buffer, 35% Milli-Q-vann, 15% acetonitril. Justert til pH 2.0 med metansulfonsyre.

20 B-eluent: 50% buffer, 20% i Milli-Q vann, 30% acetonitril. Justert til pH 2.0 med metansulfonsyre.

Prøvepreparering:

Colistin acetat: 1-2 g/l i 0.05 M eddiksyre. Omrørt i 30 minutter og filtrert gjennom et 0.45 µm membranfilter

25

Standarder:

To in-house standarder ble tilberedt, en med høy aktivitet (2000 µg/mg) og en med lav aktivitet (400 µg/mg).

30 Analyseprosedyre:

Gjennomstrømming: 0.8 ml / min

Kolonnetemperatur: 25 °C

Deteksjon: 214 nm

Tid konstant: 1.0 sek.

35 AUFS: 1.000 AU

Auto zero: On

Wisp temperatur: 25 ° C.

Injeksjon: 20 µl/kjøring

40

Gradientprogram:

Gradient		Tid	Flow (ml/min)	%A	%B	%C	Kurve
	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
Endring etter 40 minutter er ikke en del av analysen, blir bare utført etter en serie av analyser							
	7	41.00	0.8	0.0	100	0.0	6
	8	50.00	0.8	0.0	100	0.0	6
	9	51.00	0.00	0.0	100	0.0	6

Eluent A er anvendt som blind og trukket fra standarder og prøver.

5

Method 3: HPLC for colistin sulfate monokomponent

Utstyr: Waters automatisk HPLC utstyr, bestående av:

Pumpe: Modell 510

10 Injektor: 717 pluss autosampler

Detektor: 490 E

Kolonne: Nova-Pak, C18, 60Å, 4 mm, 250x4.6 mm

Kolonne ovenn: Jones Kromatografi Modell 7955

15 Reagenser:

Milli-Q vann

Acetonitril, HPLC-kvalitet

Metansulfonsyre, ≥99%

Triethylamin, HPLC-kvalitet

20 Natriumsulfat, vann gratis, pro analyse

Buffer: Natriumsulfat, vannfritt 28.4 g (0.10 M), triethylamin 14.0 ml (0.05 M), metansulfonsyre 10.0 ml (0.06 M), Milli-Q vann til 2000 ml. Bufferen er vakuumfiltrert gjennom et 0.45 µm filter.

25 A-eluent: 50% buffer, 35% Milli-Q-vann, 15% acetonitril. Justert til pH 2.0 med metansulfonsyre.

B-eluent: 50% buffer, 20% i Milli-Q vann, 30% acetonitril. Justert til pH 2.0 med metansulfonsyre.

Prøvepreparering:

Colistin sulfat mono-komponent: 2.8 mg / ml i Milli-Q vann. Omrørt i 15 minutter. og filtrert gjennom et 0.45 µm filter.

5 Analyseprosedyre

Gjennomstrømming: 1.0 ml/min

Deteksjonsbølgelengde: 214 nm

Kolonnetemperatur: 25°C

Injeksjonsvolum: 40 µl

10 Autosampler temperatur: 25°C

Gradient program:

Gradient		Tid	Flow (ml/min)	%A	%B	Kurve
	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	6
	6	55.00	1.00	0	100	6
	7	56.00	1.00	67.0	33.0	6
	8	70.00	1.00	67.0	33.0	6
Endring etter 70 minutter er ikke en del av analysen, blir bare utført etter en serie av analyser						
	9	71.00	1.00	0	100	6
	10	81.00	1.00	0	100	6
	11	82.00	0	0	100	6

15

Referanser

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.

20 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

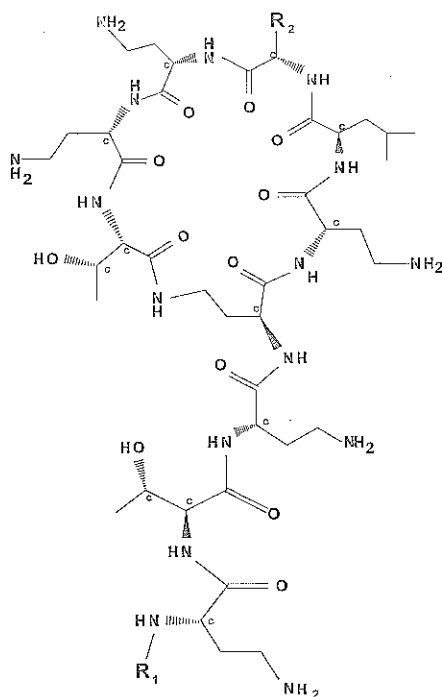
Patentkrav

1. Fremgangsmåte for rensing av colistin ved reversfasekromatografi,
k a r a k t e r i s e r t v e d loading av en kolonne med colistin base i eddiksyre og
5 20 til 30% etanol og eluering med 10 - 15% etanol.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori etanolkonsentrasjonen er 20% -24%.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori etanolkonsentrasjonen er 24%.
- 10 4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori etanolkonsentrasjonen er 12%.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori eddiksyrekonsentrasjonen er 0.1M.
- 15 6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, videre etterfulgt av et trinn med hydrofob
interaksjonskromatografi.
7. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori pH av mobilfasen er 7-8.
- 20 8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori pH av mobilfasen er 7.5.
9. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori
den høye etanolkonsentrasjonen er 24%,
den lave etanolkonsentrasjonen er 12%,
25 eddiksyrekonsentrasjonen er 0.1 M,
pH i mobilfasen er 7.5, og
stasjonærfasen er en C8-resin.

30

35

Fig. 1



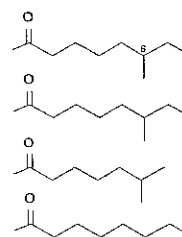
Polymyxin-E

Colistin-A = Polymyxin-E1 : R_1 = 6-methyl-octanoyl

Colistin-A-Ile = Polymyxin-E1-I : R_1 = 6-methyl-octanoyl

Colistin-B = Polymyxin-E2 : R_1 = 6-methyl-heptanoyl

Polymyxin-E3 : R_1 = octanoyl



R_2 =

R_2 =

R_2 =

R_2 =

Fig. 2

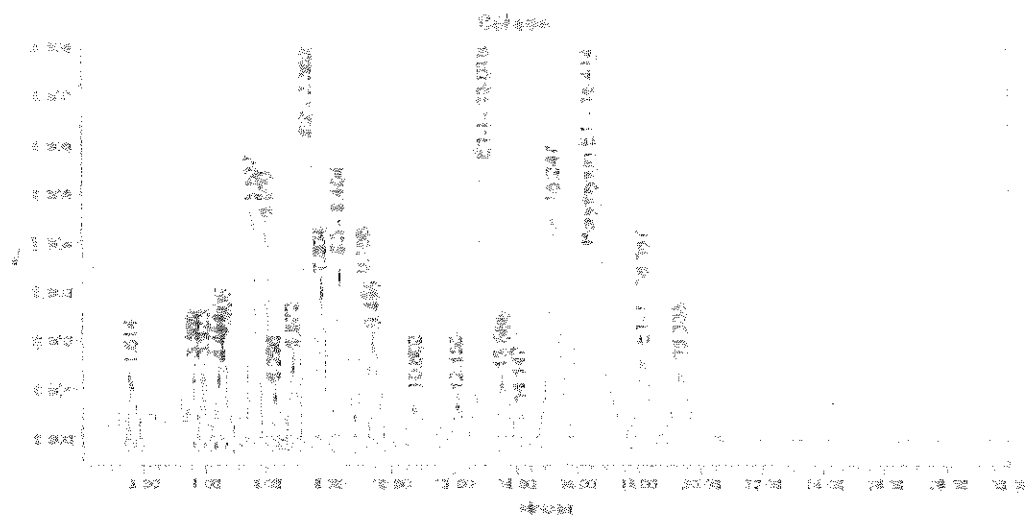


Fig. 4

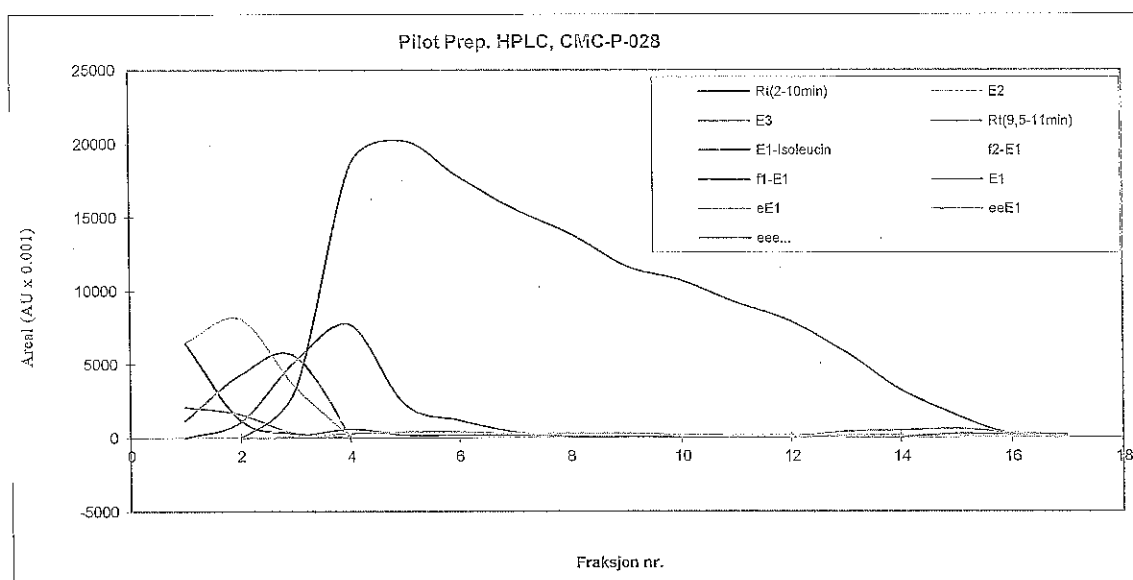


Fig. 5

