

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 408**

51 Int. Cl.:

C07K 7/62

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2010 E 10757791 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2470555**

54 Título: **Procedimiento para purificar colistina y componentes de colistina purificados**

30 Prioridad:

30.10.2009 US 256344 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.03.2015

73 Titular/es:

**XELLIA PHARMACEUTICALS APS (100.0%)
P.O. Box 1736
2300 Kobenhaven , DK**

72 Inventor/es:

**KOCH, TORBEN y
OVERBALLE-PEDERSEN, CARSTEN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 532 408 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para purificar colistina y componentes de colistina purificados.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de antibióticos.

Antecedentes

10 El aumento de la multiresistencia en las bacterias gramnegativas, en particular, en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*, constituye un problema crítico. La limitación de las opciones terapéuticas ha obligado a los médicos y microbiólogos que se dedican a las enfermedades infecciosas a reevaluar la aplicación clínica de la colistina (también llamada polimixina E), un antibiótico polimixina similar, pero no idéntico, a la polimixina B. La colistina puede presentar ventajas sobre la polimixina B debido a su índice terapéutico más amplio.

20 La colistina se aisló por primera vez en 1947 a partir de *Bacillus polymyxa* var. colistinus y se compone de una mezcla de polipéptidos producidos por fermentación. Los componentes principales son la polimixina E₁, E₂, E₃ y E₁-Ile (figura 1).

25 Comercialmente, la colistina se encuentra como sulfato de colistina, que se utiliza por vía oral para la descontaminación intestinal y por vía tópica como polvo para infecciones de la piel, y como colistimetato de sodio, que se utiliza por vía parenteral y por inhalación. Se ha determinado que el colistimetato de sodio es menos tóxico y tiene menos efectos secundarios indeseables que la colistina, pero también es menos potente. (Véase Critical Care 2006, 10:R27 (doi:10.1186/cc3995), de Falagas y Kasiokou).

30 El sulfato de colistina se formula a menudo en pomadas, suspensiones óticas y soluciones óticas y oftalmológicas. El sulfato de colistina también se administra por vía oral en forma de suspensiones o comprimidos para tratar infecciones intestinales o para eliminar la flora del colon.

35 El colistimetato de sodio es un profármaco semisintético de colistina que puede utilizarse para tratar infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, y recientemente se ha utilizado para tratar infecciones por *Acinetobacter* multiresistente. El colistimetato de sodio también se ha administrado por vía intratecal e intraventricular en meningitis/ventriculitis por *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. El colistimetato de sodio se hidroliza fácilmente, dando lugar a una variedad de derivados metanosulfonados en solución acuosa, y es muy difícil de analizar.

40 Dado que la colistina se introdujo en la práctica clínica hace más de 50 años, sus propiedades nunca se documentaron tan exhaustivamente como se hace con los fármacos modernos, por ejemplo con requisitos específicos en cuanto a su farmacología, toxicología, contenido de impurezas, etc. Por esta razón, los productos de colistina disponibles en el mercado contienen, además de su componente principal, la polimixina E₁, muchas sustancias/impurezas activas e inactivas relacionadas, principalmente derivadas del proceso de fermentación. En la figura 2 se muestra un cromatograma de HPLC típico de la colistina.

45 Habitualmente, el componente principal de la colistina comercial, la polimixina E₁, constituye aproximadamente el 60% del producto seco. Se han caracterizado algunas de las sustancias relacionadas en los productos de colistina (figura 1), pero la mayoría de las impurezas siguen sin conocerse. La potencia mínima del sulfato de colistina, tal como especifica la USP (United States Pharmacopeia) es "no menor de 500 µg/mg", pero la actividad antimicrobiana específica de cada componente es, en gran medida, desconocida.

50 A pesar de que el producto se ha utilizado durante más de 50 años, no existe ninguna dosificación normalizada de la colistina y no se han publicado ensayos detallados sobre su farmacología o su farmacocinética. Por lo tanto, se desconoce la dosificación óptima de colistina para la mayoría de las infecciones. Del mismo modo, la dosis "máxima" recomendada para cada preparación es diferente. Cada país tiene diferentes preparaciones genéricas de colistina y la dosis recomendada depende del fabricante.

55 El sulfato de colistina y el colistimetato de sodio se pueden administrar por vía intravenosa y como aerosoles, pero la dosificación es compleja. El colistimetato de sodio de algunos fabricantes se prescribe en unidades internacionales, mientras que el mismo producto de otros fabricantes se prescribe en miligramos de base de colistina. Esta ausencia total de regulación o normalización de las dosis hace que la dosificación intravenosa de la colistina constituya una pesadilla para cualquier médico.

60 Las principales toxicidades descritas en el tratamiento intravenoso son la nefrotoxicidad (afectación de los riñones) y la neurotoxicidad (afectación del sistema nervioso), pero esto puede reflejar las dosis muy altas que se administraban al principio, mucho más elevadas que las recomendadas actualmente por cualquier fabricante, y para

las que no se realizaba ningún ajuste en caso de enfermedad renal. La toxicidad principal descrita en el tratamiento con aerosoles es el broncoespasmo.

5 En ausencia de datos de apoyo, se puede especular que parte de la toxicidad de la colistina se puede atribuir a las sustancias relacionadas e impurezas presentes en los productos comerciales actuales. Además, cuando se sintetiza el profármaco colistimetato utilizando colistina “impura” como material de partida, cada sustancia relacionada y cada impureza formarán una base para diversos derivados metanosulfonados, creándose un producto final muy complejo, en el que se desconocen las propiedades toxicológicas de cada sustancia individual.

10 A partir de las consideraciones toxicológicas y farmacológicas anteriores, pueden apreciarse grandes ventajas en la utilización de una variedad “monocomponente” de la colistina con fines médicos. Dicha colistina monocomponente contendrá una proporción muy elevada del componente principal polimixina E₁ (> 90%, en comparación con el actual 60%), y todas las impurezas principales estarán identificadas y caracterizadas.

15 Una colistina monocomponente ofrece diversas ventajas:

- 1) Posibilidad de discernir las contribuciones toxicológicas del componente principal (PE₁), las sustancias relacionadas y las impurezas,
- 20 2) Producto susceptible de nuevas y más precisas investigaciones farmacológicas y farmacocinéticas,
- 3) Posibilidad de sintetizar derivados bien definidos, por ejemplo el colistimetato, sin dar lugar a una multitud de sustancias mal definidas,
- 25 4) Posibilidad de desarrollar métodos analíticos mejores y más precisos para la colistina y el colistimetato, simplificándose los procedimientos reguladores,
- 5) Recomendaciones inequívocas de dosis basadas en datos farmacológicos y toxicológicos claros,
- 30 6) Actualización de la colistina para convertirla en un antibiótico “moderno”, lo que constituye una gran necesidad.

35 En De Crescenzo Henriksen et al (Lett Appl Microbiol 45, 491-496 (2007) se describe la purificación de la polimixina E a partir de cepas de *P. amylolyticus* en grado analítico mediante etapas de purificación por HPLC de fase inversa, utilizando gradientes de fase móvil de isopropanol y metanol. El documento WO98/20836 da a conocer protocolos de purificación de diversos componentes de la colistina, entre ellos la polimixina E, utilizando gradientes de acetonitrilo en HPLC de fase inversa.

40 Un segundo objetivo, a más largo plazo, sería someter la PE₁ purificada a nuevos estudios de eficacia *in vitro* e *in vivo*, así como a estudios toxicológicos, a fin de compararlos con los estudios anteriores del grupo de las polimixinas. Dichos ensayos aleatorizados y controlados se necesitan con urgencia para esclarecer diversas cuestiones relativas a la eficacia y la seguridad de las polimixinas (Crit Care Clin. abril de 2008; 24(2):377-91, por Micholopoulos y Falagas).

45 **Características de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar componentes de la colistina, y particularmente el componente principal, la polimixina E₁.

50 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una preparación prácticamente pura del componente principal de colistina, la polimixina E₁ (90-98% de pureza), denominada colistina monocomponente.

Dicho procedimiento es un método cromatográfico simple que utiliza disolventes de baja toxicidad. El procedimiento comprende una cromatografía de fase inversa (RP), que permite la purificación de la polimixina E₁ hasta una pureza mayor del 90%, seguida por una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

55 El procedimiento está caracterizado por

- la carga de una columna de fase inversa con base de colistina en ácido acético y etanol al 20-30%,
- 60 - la elución con etanol al 10-15%.

Sorprendentemente, el procedimiento se puede utilizar para separar eficientemente la polimixina E₁ de los otros componentes principales de la colistina.

65 Los trabajos de identificación de un material de fase inversa adecuado se llevaron a cabo a escala de laboratorio en

columnas de acero de 10 x 250 mm.

La resina Merck LiChrospher 60 RP-select B, 15 µm (C8) se reveló adecuada para la purificación de la PE₁ a partir de la base de colistina a escala de laboratorio, y el método de laboratorio se trasladó de la escala de un gramo a la de cincuenta gramos en una columna de acero de 50 x 850 mm.

Se desarrolló un procedimiento en el que la base de colistina se disolvió en etanol al 24% (4 M) y ácido acético 0,1 M, y se separó en fracciones de polimixina E. El componente principal, la PE₁, se aisló con una recuperación típica del 60% y una pureza cromatográfica relativa del 94-98%.

En la European Pharmacopoeia (EP), la potencia de un lote de sulfato de colistina se define como el contenido en % de la suma de los factores de polimixina PE₁, PE₂, PE₃, PE₁-Ile y PE₁-7MOA, determinados por HPLC en el estado en el que se encuentran. La potencia total de estos factores debe constituir no menos del 77,0%. Además, la EP establece límites máximos (NMT = no más de) para factores específicos, como: PE₁-Ile (NMT 10%), PE₁-7MOA (NMT 10%), PE₃ (NMT 10%), e impureza principal NMT 4%.

Aplicando el método de purificación descrito, el producto final tiene la siguiente composición típica: PE₁ (94-98%), PE₂ (0-0,1%), PE₃ (0,0%), PE₁-Ile (0,2-1,0%), PE₁-7MOA (0,5-2,0%), e impurezas totales restantes 0,5-2,0%.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estructura molecular del componente principal del sulfato de colistina, sulfato de polimixina E₁ y sustancias relacionadas.

Figura 2. Cromatograma de HPLC de colistina, sustancia química de referencia de la Ph. Eur.

Figura 3. Los gráficos ilustran la pureza cromatográfica relativa en función del número de fracción durante la purificación de la base de colistina; f₁-E₁ y f₂-E₁ del gráfico se denominan en conjunto f₁ en la parte descriptiva de la solicitud; eE1 es equivalente a e₁/e₂, eeE1 es equivalente a e₃, mientras que eee... es la suma de las impurezas menores desconocidas.

Figura 4. Los gráficos ilustran las áreas de pico de los diversos componentes en función del número de fracción durante la purificación de la base de colistina; f₁-E₁ y f₂-E₁ del gráfico se denominan en conjunto f₁ en la parte descriptiva de la solicitud; eE1 es equivalente a e₁/e₂, eeE1 es equivalente a e₃, mientras que eee... es la suma de las impurezas menores desconocidas.

Figura 5. Cromatograma de HPLC de colistina monocomponente (PE₁) con impurezas principales.

Descripción detallada de la invención

El término "colistina" pretende comprender cualquier mezcla de componentes peptídicos antibióticos en la que el componente principal es la polimixina E₁ o sus sales.

El término "polimixina E₁" pretende comprender el compuesto anteriormente designado colistina A, así como

el compuesto designado 7722-44-3 en Chemical Abstracts,

así como

el péptido cíclico (10-4) N₂-(6-metil-1-oxooctil)-L-2,4-diaminobutanoil-L-treonil-L-2,4-diaminobutanoil-L-2,4-diaminobutanoil-L-2,4-diaminobutanoil-D-leucil-L-leucil-L-2,4-diaminobutanoil-L-2,4-diaminobutanoil-L-treonina,

así como

colistina IV.

El término "base de colistina" pretende comprender cualquier colistina que comprenda el 30-70% de polimixina E₁.

El término "sulfato de colistina" pretende comprender cualquier sal de sulfato de colistina.

El término "colistimetato" pretende comprender cualquier derivado metanosulfonado de la colistina.

Una "composición" es cualquier mezcla que comprende más de dos compuestos diferentes, por ejemplo, una mezcla de dos principios farmacéuticos activos, o una mezcla de un principio farmacéutico activo y uno o más excipientes

farmacéuticos.

5 Los términos “componente” o “componentes”, utilizados en la presente solicitud, se refieren a un compuesto específico de una composición. Por consiguiente, “componentes menores” son compuestos que se encuentran en cantidades relativamente pequeñas en una composición.

Una “composición farmacéutica” es cualquier composición adecuada para su utilización *in vivo*. Dichas composiciones pueden administrarse por vía cutánea, subcutánea, intravenosa, parenteral, oral, etc.

10 “Separación” se refiere a cualquier método en el que un compuesto deseado se separa de otro compuesto (en grado analítico o preparativo).

“Purificación” es cualquier método de separación por el que se aumenta la concentración de un compuesto deseado.

15 “Cromatografía” es cualquier técnica de purificación que comprende una fase estacionaria y una fase móvil.

Una “fase estacionaria” es cualquier superficie que comprende ligandos capaces de retener compuestos.

20 Los “ligandos” son restos de la fase estacionaria en los que se produce la unión con los compuestos.

Una “fase móvil” es cualquier fluido, disolvente, líquido o mezcla que puede pasar a través o a lo largo de la fase estacionaria en una determinada dirección.

25 “Cromatografía de fase inversa” es cualquier cromatografía en la que los componentes más polares o cargados se eluyen antes que los menos polares.

“Cromatografía de interacción hidrófoba” es cualquier cromatografía basada en la interacción entre los ligandos apolares de la fase estacionaria y los compuestos apolares o la parte apolar de los compuestos.

30 “Concentración alta de etanol” se refiere a una concentración de etanol mayor o igual al 20% en volumen, habitualmente del 20%-30%.

35 “Concentración baja de etanol” se refiere a una concentración de etanol menor del 20% en volumen, habitualmente del 10%-15%.

“% v/v” se refiere a porcentaje en volumen.

40 La base de colistina comercial es una mezcla de muchas amidas de ácido graso y decapéptido estrechamente relacionadas, incluidas la polimixina E₁, la polimixina E₂, la polimixina E₃ y la polimixina E₁-isoleucina (figura 1).

La pretensión de aislar el componente principal polimixina E₁ (PE₁) de la base de colistina llevó a una investigación acerca de si un método de HPLC de fase inversa (RP) podía o no ser adecuado para el aislamiento de la PE₁ y la obtención de la misma con una pureza cromatográfica relativa elevada (> 90 %).

45 En la bibliografía se encuentran únicamente algunos métodos de separación de fase inversa, y los principales disolventes orgánicos utilizados son el acetonitrilo y el metanol. Estos disolventes son tóxicos y deben evitarse en la producción en planta piloto y a gran escala. Sin embargo, un ensayo a escala de microgramos de HPLC en columna C18 con sulfato de colistina utilizando un gradiente de etanol del 0% al 60% indicó, sorprendentemente, que podía ser posible utilizar el disolvente relativamente no tóxico etanol para un método de purificación de la polimixina E₁ útil a escala industrial.

50 El material de partida, la base de colistina, se produce por fermentación y purificación, y es un producto intermedio en la producción del sulfato de colistina como sustancia a granel. El material de partida contiene aproximadamente 60% de PE₁, variando en un pequeño porcentaje entre lotes. El objetivo original era alcanzar una pureza cromatográfica relativa de sulfato de polimixina E₁ > 90%. Con este objetivo, se evaluaron una serie de materiales de columna con sistemas de elución a base de etanol.

55 La polimixina E₁ (figura 1) tiene carácter detergente iónico con una parte decapeptídica polar y una parte de ácido graso apolar. La molécula consiste en un heptapéptido cíclico unido a un tripéptido lineal acilado con 6-metil-octano. Como la molécula contiene 6 restos de ácido 1,4-diaminobutírico (DAB), uno de los cuales participa en tres enlaces peptídicos, hay 5 grupos amino primarios en equilibrio con sus correspondientes grupos amonio (NH₄⁺), que constituyen la parte fuertemente polar de la molécula.

60 Se previó que la interacción molecular entre la resina de fase inversa y la molécula tendría lugar en el resto de ácido graso y las regiones apolares de la parte peptídica.

Para el seguimiento de las fracciones y grupos de muestra de HPLC, se desarrolló un método de HPLC analítica basado en un método estándar. El método mejorado reveló una pequeña cantidad de componentes relacionados (f_1 , e_1 , e_2) debajo del pico principal de PE_1 , que eran invisibles con el método convencional de HPLC.

5 Parte experimental

HPLC preparativa

10 Columna 10 x 250: Para la evaluación de los materiales de columna a escala de miligramos, se utilizó una columna de acero de 10 x 250 mm. La columna se llenó con las diversas resinas sometidas a ensayo suspendidas en etanol al 96%.

15 Columna 50 x 830: Para la purificación preparativa a escala de gramos, se utilizó una columna de acero de 50 x 850 mm, tal como se describe a continuación. El material de columna seleccionado, aproximadamente 1 kg de Merck LiChrosphere 60 RP select B (15 μ m), se suspendió en etanol al 96% y con ello se llenó la columna. Se fijó la brida superior y el pistón se empujó hacia arriba a 50 bar hasta que se eliminó todo el exceso de etanol. La columna se evaluó mediante la aplicación de 1 ml de una solución de yoduro de potasio 0,1 mg/ml, y la absorción se midió a 227 nm, AUFS = 0,05 y caudal de 55,5 ml/min. El pico registrado era una curva de Gauss estrecha con una simetría satisfactoria.

20 El sistema de HPLC preparativa comprendía:

Columnas:	Columna Merck de acero inoxidable de 10 x 250 mm y columna de acero inoxidable de 50 x 850 mm con compresión axial dinámica fabricada por Dan Process A/S
Bombas:	Waters Delta Prep 4000 con un intervalo de caudales de 0,5-150 ml/min, con 4 entradas diferentes de disolvente y con una válvula de mezcla en la parte de baja presión
Detector:	Waters 486 Tunable Absorbance Detector
Integrador:	Merck-Hitachi D-2000 Chromato-Integrator
Colector de fracciones:	Waters Fraction Collector

25 La absorbancia del eluyente se detectó a 230 nm, donde existe un punto de corte para el ácido acético. A menores longitudes de onda, el eluyente mostró demasiada interferencia. Las fracciones a escala de miligramos se recogieron en tubos de ensayo de 25 ml, mientras que las fracciones a escala de gramos se recogieron en botellas de tapón azul de 250 ml.

30 Para la regeneración de las columnas de 10 x 250 mm y 50 x 850 mm tras cada ciclo de HPLC, se utilizó una mezcla que contenía el 24% de etanol y el 50% de 1,2-propilenglicol en CH_3COOH 0,1 M. Ocasionalmente se observó una contrapresión elevada con la columna de 50 x 850 mm, en cuyo caso se reempaqueto o se lavó con etanol al 96% hasta que la presión fue normal.

HPLC analítica:

35 Se utilizó una columna Novapak 4,6 x 150, 4 μ m, C18, con acetonitrilo como fase móvil. La concentración de la solución de CH_3CN se aumentó del 21% (tras 10 minutos de ciclo isocrático) al 30% durante un intervalo de tiempo de 5 min. Las columnas no se termostataron, sino que se hicieron funcionar a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ C$).

40 El sistema de HPLC analítica comprendía:

Columnas:	Waters Novapak 4,6 x 150, 4 μ C18 y columna equivalente de 4,6 x 250
Bombas:	2 x Waters 510 con Waters Pump Control Module
Detector:	Waters 490 E Programmable Multi-wavelength Detector
Colector de fracciones:	Automuestreador Waters 717 Plus

El sistema se controló mediante el software Millennium, de Waters.

Descripción general de las resinas evaluadas:

- 1) Merck n.º 9303 LiChroprep RP-18, 25-40 μ m, lote: L 275703 614.

- 2) Merck n.º 9324 LiChrorep RP-8, 25-40 µm, lote: L 240124 541.
- 3) Merck n.º 11023 LiChrospher 60 RP-select B, 15 µm, (C8), lote: L 139923 633.
- 4) Merck n.º 150385 Hibar Fertigsäule RT LiChrospher, RP-18, 15 µm, Cat. 50014.
- 5) Eka Nobel Kromasil-100 A, C8, 16 µm, lote: DT0026.
- 6) ToosoHaas Amberchrom CG 71 S, 35 µm, n.º de lote 23770319.
- 7) ToosoHaas No. 22227 Toyopearl MD-P Ether, 35 µm, débilmente hidrófoba.
- 8) ToosoHaas No. 22225 Toyopearl MD-P Butyl, 35 µm, fuertemente hidrófoba.

Productos químicos para los ensayos de la columna 10 x 250:

Sulfato de colistina, lote: A4660314, Axellia ApS, Copenhagen, Dinamarca

Base de colistina, lote: A1551701, Axellia ApS, Copenhagen, Dinamarca

Etanol, 96%, "Danisco Distillers", Danisco A/S

Metanol, Merck LiChrosolv n.º 6018

Dimetilsulfóxido, Merck Uvasol n.º 2950

1,2-propanodiol puro, Merck n.º 7478

2-propanol, LiChrosolv grado de gradiente, Merck n.º 1040

Ácido acético, 100% G.R. Merck n.º 63

1-metilpirrolidona-(2) z.s., Merck n.º 806072

Trietilamina, Picrce n.º 25108

Tetrahidrofurano, Fluka n.º 87367

Acetato de amonio p.a., Merck n.º 1116

Sulfato de amonio p.a., Merck n.º 1217

Ácido sulfúrico 98% p.a.

Gránulos de hidróxido de sodio, GR, Merck n.º 6498

Agua Milli-Q, Purificación en lab., R&D, FCD, Axellia ApS, Copenhagen, Dinamarca

Millipore, filtro de membrana de tipo HV, 0,45 µm.

Productos químicos para los ensayos de la columna 50 x 825:

Etanol 96% y 99,9% de Danisco Distillers, Danisco A/S

Ácido acético, 100% G.R. Merck n.º 63

Gránulos de hidróxido de sodio, GR, Merck n.º 6498

NaOH 27%, dept. producción

Hidróxido de potasio, USP XIX, Ferak Berlin n.º 20907

Ensayos de la columna 10 x 250:

Las siguientes resinas cromatográficas resultaron inadecuadas para la tarea de separación debido a una unión

fuerte con la resina, a un fenómeno pronunciado de aparición de colas en los picos, a una baja pureza cromatográfica o a una baja recuperación: ToosoHaas Amberchrom CG 71 S; ToosoHaas Toyopearl MD-P Ether, 35 μm ; ToosoHaas Toyopearl MD-P Butyl, 35 μm ; Merck LiChrorep RP-8, 25-40 μm ; Merck Hibar Fertigsäule RT LiChrospher, RP-18, 15 μm ; Eka Nobel Kromasil-100 A, C8, 16 μm .

En los primeros ensayos de columna 10 x 250 con Lichrorep C18, 25-40 μm , con un gradiente de etanol del 0% al 60%, durante 60 min, a pH ~ 3,5 (HAc 50 mM), con aplicación de 11 mg de sulfato de colistina, se obtuvo una pureza cromatográfica relativa (RCP) de aproximadamente el 90% con buenos rendimientos. Sin embargo, al tratar de reducir la concentración de etanol mediante la aplicación de un gradiente de etanol de 10-25% durante 45 min y en igualdad de condiciones, no se observó separación ni ningún fenómeno pronunciado de aparición de colas en los picos.

Unos ensayos similares con NH_4HSO_4 5 mM a pH = 2,5 dieron lugar a la unión completa de los compuestos a la columna. Este hecho y experimentos similares indicaron claramente que debía usarse base de colistina en lugar de sulfato de colistina para la purificación de la PE_1 en las condiciones seleccionadas.

Sorprendentemente, si se añadió 1,2-propilenglicol (1,2-PG) como sustituto de parte del etanol, por ejemplo a una concentración del 24% de etanol y el 20% de 1,2-PG, y la cantidad de ácido acético (pH = 3) se incrementó hasta aproximadamente 1%, se obtuvo un producto de PE_1 con una RCP de aproximadamente 90% con un rendimiento de 70%.

A partir de estos experimentos iniciales, se concluyó que el ácido acético tenía una influencia positiva en el equilibrio de compuestos entre la resina (LiChrorep C18) y el eluyente, y que era mejor usar base de colistina disuelta en ácido acético diluido en lugar de sulfato de colistina. Sin embargo, la utilización de una mezcla de 1,2-propilenglicol/etanol dio lugar a una caída pronunciada de la presión con este material de columna, por lo que esta resina y mezcla de disolventes en particular se consideraron inadecuadas para trasladar los ensayos a una mayor escala.

Se hizo evidente que no solo participaban en la unión a la columna el resto de ácido graso y los aminoácidos apolares, sino también los grupos amino y amonio.

Los experimentos anteriores arrojaron algunos resultados sorprendentes, por ejemplo, que a) el disolvente etanol, respetuoso con el medio ambiente, la salud y la seguridad (EHS), era útil como eluyente para la separación por HPLC de fase inversa (RP) de la colistina, y que b) la separación debe realizarse con base de colistina en presencia de ácido acético en lugar de utilizar sulfato de colistina para una purificación adicional. Aunque la resina LiChrorep C18 mostró propiedades de separación prometedoras, no resultó adecuada para su utilización a mayor escala.

La lista de medios cromatográficos disponibles en el mercado es muy amplia, pero a través de un cribado y una selección minuciosos logramos identificar un candidato adecuado de Merck, concretamente la columna LiChrospher 60 RP-select B 15 μm (C8).

La utilización de gradientes lineales de etanol, del 5% al 24%, en ácido acético 0,1 M dio separaciones prometedoras con poca aparición de colas en los picos. Los gradientes de etanol del 5% al 15% en ácido acético 0,1 M (pH = 3) funcionaron bien, pero con una RCP de sólo el 85-90% de PE_1 y con rendimientos bajos.

Se produjo un gran avance cuando se probó un gradiente de etanol invertido (es decir, aplicación a concentración alta de etanol y elución a concentración baja). Los primeros ensayos con los siguientes parámetros dieron un grupo de muestra con un 90-95% de PE_1 y un rendimiento de aproximadamente el 70%:

Equilibrado:	Etanol al 5% en ácido acético 0,1 M
Aplicación:	110 mg de base de colistina disueltos en 4 ml de etanol al 30% en ácido acético 0,1 M
Eluyente:	Etanol al 15% en ácido acético 0,1 M a una temperatura de 60°C
Temperatura:	40°C
Caudal de eluyente:	2,22 ml/min

Se seleccionó una temperatura más alta con el fin de alcanzar más rápidamente el equilibrio de los componentes de colistina entre la fase sólida y el eluyente, pero los experimentos pusieron de manifiesto que dicha temperatura más alta no tuvo una influencia notable en los resultados. Por consiguiente, las temperaturas del horno de columna y de la fase de eluyente se redujeron de 40°/60° a 35°/50° sin que se produjera ningún cambio significativo en la pureza y el rendimiento del grupo de muestra. Finalmente, se hizo pasar un gradiente de etanol del 5% al 15% en ácido acético 0,1 M a 30°/40° con buenos resultados, con lo que se confirmó que el gradiente invertido era realmente responsable del gran cambio positivo en la pureza cromatográfica relativa, el rendimiento y el perfil de asimetría de

los picos.

Cabe señalar que durante las tareas de desarrollo se implementó un método de HPLC analítica modificado y que dicho nuevo método reveló algunas sustancias relacionadas, f_1 y e_1/e_2 , anteriormente enmascaradas por el pico principal de E_1 .

La sustancia relacionada f_1 se eluye en la parte delantera del pico de PE_1 , mientras que las sustancias e_1/e_2 se eluyen como un pico doble con dos máximos más o menos desdoblados en la cola del pico de PE_1 . Estas dos sustancias son particularmente difíciles de separar de la PE_1 y constituyen un desafío en cuanto a la purificación en la futura optimización del método de HPLC preparativa. Véanse, en particular, la figura 3 y la figura 4, donde la separación de la PE_1 y las sustancias relacionadas se ilustra con diagramas que muestran la distribución de los componentes según la fracción de HPLC.

En la figura 3, la pureza cromatográfica relativa de la polimixina E_1 se compara con las sustancias relacionadas en función del número de fracción. Las sustancias relacionadas más difíciles de separar de la PE_1 son la e_1/e_2 , mientras que la E_1 -isoleucina, la f_1 y la e_3 (que se eluyen después de e_1/e_2) son más fáciles de eliminar. La figura 4 muestra los resultados desde la perspectiva del rendimiento, donde la integración de los picos de los componentes se representa en función de los números de fracción. El grupo de muestra principal comprende típicamente las fracciones 7 a 12, pero se puede aumentar la pureza reduciendo la selección de fracciones.

Ejemplos - Procedimientos para la purificación de polimixina E_1 a partir de la base de colistina

Ejemplo 1 - purificación por HPLC de fase inversa; escala de minipreparación

Equipo: Columna de acero 10 x 250 mm ($\varnothing = 10$ mm)
Waters Delta Prep 4000 Prep. Chrom. System
Waters 4000 System Controller
Waters 486 Tunable Absorbance Detector
Waters Fraction Collector
Merck Hitachi D-2000 Chromato-Integrator

Resina: LiChrospher 60 RP-select B Merck n.º 11023.

Caudal: 2,22 ml/min (aumentado a la escala de 300 x 700 mm ~ 2 l/min)

λ : 230 nm

AUFS: 2 (sensibilidad del detector ~ nivel más bajo).

Tampón A: etanol al 12% (96%) en CH_3COOH 0,10 M en agua Milli-Q

Sol. de aplicación: Base de colistina, 600 mg ~ 0,5 mmol, disuelta en 15 ml de etanol al 24% (a partir de etanol al 96%) en CH_3COOH 0,10 M por adición de 5 equivalentes de ácido de CH_3COOH ~ 2,5 mmol ~ 0,15 ml de CH_3COOH 100% (17 M); ajustado con NaOH 2 M a pH = 7,5; la solución se filtra por membrana (0,45 μ m)

- 1) Equilibrado de la columna: Equilibrada con tampón A.
- 2) Aplicación: Se aplica la solución de acetato de colistina (40 mg/ml) a 2,22 ml/min, seguido de 1 ml de tampón A a través del tubo de alimentación.
- 3) Elución: La columna se eluye inmediatamente con tampón A y el efluente se recoge en fracciones de 1 ml ~ 2,22 ml.
- 4) Lavado de la columna: se aplican 5 ml de etanol al 96%, seguido de tampón A hasta que la absorción disminuye al nivel cero.
- 5) Análisis por HPLC: Las muestras se diluyen hasta que el área de E_1 alcanza el valor 20-30 x 10^6 AU; un patrón alto de colistina alcanza habitualmente el valor 20 x 10^6 AU; las muestras se analizan utilizando Colistin NovaS (ciclo de 30 min).

Ejemplo 2 - purificación por HPLC de fase inversa; escala piloto:

Equipo: Columna de acero 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 Chromato-Integrator

Resina: LiChrospher 60 RP-select B, Merck No: 11023, 1 Kg
 Caudal: 65 ml/min (Aumentado a la escala de 300 x 700 mm ~ 2 l/min)
 λ : 230 nm
 AUFS: 2 (sensibilidad del detector ~ nivel más bajo)
 Tampón A: etanol al 12% (96%) en CH₃COOH 0,10 M en agua Milli-Q
 Sol. de aplicación: Base de colistina, 50 g ~ 42 mmol (en el estado en que se encuentra) se disuelve en 1.000 ml de etanol al 24% (96%) por adición de 5,83 equivalentes de ácido de CH₃COOH ~ 245 mmol ~ 14,5 ml de CH₃COOH 100% (17 M); el pH se ajusta con NaOH 2 M a pH = 7,5; la solución se filtra por membrana (0,45 μ m) utilizando celita como coadyuvante de filtración
 Fuerza iónica: 4-6 mS/cm.

- 1) Equilibrado de la columna: Equilibrada con tampón A.
- 5 2) Aplicación: Se aplica la solución de acetato de colistina (48 mg/ml) a 65 ml/min durante 14 min, seguido de tampón A durante 0,1 min ~ 43,5 g aplicados
- 3) Elución: La columna se eluye con tampón A hasta que la absorción se reduce hasta la asíntota 0,010 V \pm 10 mV y el efluente se recoge en 18 fracciones de 3 min ~ 585 ml.
- 10 4) Lavado de la columna: se aplican 200 ml (4 min a 50 ml/min) de una mezcla de etanol al 24% y 1,2 propanodiol al 50%, seguido por tampón A hasta que la absorción disminuye a nivel cero.
- 15 5) Análisis por HPLC: Las muestras se diluyen hasta que el área de E₁ alcanza el valor 20-30 x 10⁶ AU (5x); un patrón alto de colistina alcanza habitualmente el valor 20 x 10⁶ AU; las muestras se analizan utilizando Colistin NovaS (ciclo de 30 min).

Ejemplo 3 - purificación total y manipulación final: gran escala

20 El sulfato de colistina monocomponente (polimixina E₁) es un producto de fermentación, lo que implica que su primera aparición se da en un caldo fermentado. La polimixina E₁ se recupera y se purifica a partir del caldo que contiene una gran variedad de impurezas y únicamente unos gramos de polimixina E₁ y sustancias relacionadas por litro.

25 La recuperación a partir del caldo de fermentación comprende la precipitación de la colistina (polimixina E₁) y sustancias relacionadas, y una separación primaria por centrifugación. La purificación secundaria consiste en una cromatografía de fase inversa y una precipitación, que dan lugar al producto más puro con respecto a la polimixina E₁. Las sustancias relacionadas y las impurezas presentes en el producto de sulfato de colistina monocomponente son principalmente sustancias cofermentadas.

30 Durante la fermentación de la colistina, se genera una mezcla compleja de componentes relacionados estructuralmente, con una relación característica de cada cepa de *Bacillus polymyxa*. Son ejemplos de ello:

- 35 - Cambios en la cadena de ácido graso que generan, por ejemplo, polimixina E₁ (con ácido 6-metil-octanoico) o polimixina E₂ (con ácido 7-metil-octanoico),
- Sustitución de aminoácidos en la molécula; por ejemplo, si la D-leucina de la colistina se sustituye por D-fenilalanina, se genera el antibiótico relacionado polimixina B. Si la L-leucina de la polimixina E₁ se sustituye por isoleucina, se genera polimixina E₁-isoleucina.

40 Purificación por HPLC preparativa

Se preparan los siguientes tampones:

45 Tampón I: etanol 1,6-2 M y ácido acético 0,1-0,15 M. El tampón se filtra a través de un filtro de 0,45 μ m inmediatamente antes de su uso.

Tampón II: 1,2-propanodiol aproximadamente 6,8 M, etanol aproximadamente 4 M y ácido acético aproximadamente 0,1 M. El tampón se filtra a través de un filtro de 0,45 µm inmediatamente antes de su uso.

5 La columna de HPLC (diámetro de 30 cm), con un volumen de aproximadamente 48 litros, se equilibra con aproximadamente 40 litros de tampón I. El caudal es de 0,8-1,2 l/min (se utiliza el mismo caudal para todas las etapas de HPLC). La columna se regenera con aproximadamente 8 litros de tampón II, seguido por aproximadamente 50 litros de tampón I o hasta que la señal UV vuelve al valor de partida.

10 Se pesa un lote de base de colistina secada al vacío, 1.000-1.500 g, y se suspende en 20-30 litros de etanol 4 M. La suspensión se disuelve mediante la adición de ácido acético 0,3 M mientras se agita durante 30 min. El pH se ajusta aproximadamente a 7,5 con hidróxido de sodio y la solución se filtra a través de un filtro de membrana, 0,45 µm. La solución de acetato de colistina se hace pasar a través de la columna de HPLC y se une a la resina. La columna de HPLC se eluye con aproximadamente 160 litros de tampón I. El efluente se recoge en fracciones. Se recogen las fracciones que cumplen con una especificación predeterminada y las demás se descartan. A partir de las fracciones se agrupa un lote con una pureza de por lo menos 92% con respecto a la polimixina E₁. Se lleva a cabo una concentración de la polimixina E₁ y la eliminación del exceso de etanol mediante ósmosis inversa. El grupo de muestra se concentra hasta aproximadamente 50 g/l y se somete a continuación a diálisis con agua desionizada (aproximadamente 8 volúmenes).

20 Purificación por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

Se preparan los siguientes tampones:

25 Tampón de calibración: (NH₄)₂SO₄ aproximadamente 200 mM; el pH se ajusta aproximadamente a 7 con amoníaco diluido;

Tampón de elución: (NH₄)₂SO₄ aproximadamente 200 mM; el pH se ajusta aproximadamente a 3,7 con ácido acético.

30 La columna de HIC (diámetro de 35 cm), con un volumen de aproximadamente 90 litros, se equilibra con 250 litros del tampón de calibración, con un caudal de aproximadamente 1,7 l/min, seguido de aproximadamente 200 litros de tampón de elución, con un caudal de aproximadamente 1,0 l/min.

35 El contenido salino en la solución de acetato de colistina procedente de la ósmosis inversa se ajusta aproximadamente a 200 mM mediante la adición de (NH₄)₂SO₄ y el pH se ajusta aproximadamente a 7 con amoníaco diluido. La concentración de la solución de acetato de colistina es de 15-20 g/l. La solución se hace pasar a través de la columna de HIC, con un caudal de 950-1.050 ml/min. La elución se sucede con 10 veces el volumen de lecho. La recolección de las fracciones de efluente se lleva a cabo automáticamente por PLC. Se toman muestras de cada fracción y se analizan. Las fracciones que cumplen con las especificaciones predeterminadas se combinan, obteniéndose un lote con una pureza del 94-98% con respecto a polimixina E₁. Se lleva a cabo una concentración de la polimixina E₁ y la eliminación del sulfato de amonio por ultrafiltración hasta una concentración de 10-20 g/l.

Precipitación de la base de colistina monocomponente

45 La solución se diluye a 10 g/l con agua desionizada y se agita hasta homogeneidad. El pH se ajusta a 9,6-9,8 con hidróxido de sodio y se continúa agitando mientras precipita la base de colistina monocomponente. El precipitado se recupera por filtración en un filtro prensa. Cuando se ha completado la filtración, la torta se lava con aproximadamente 800 litros de agua desionizada, que es desplazada por el aire. La torta de colistina monocomponente se extrae del filtro prensa y se guarda en un congelador.

50 Conversión a sulfato de colistina monocomponente

La base de colistina monocomponente se suspende y se disuelve en agua desionizada con agitación. El pH se ajusta a 5,0 con ácido sulfúrico diluido. La solución se filtra a través de un filtro de 0,45 µm.

55 Liofilización, molienda y almacenamiento

60 La solución filtrada se introduce en bandejas de liofilización de acero inoxidable y se liofiliza durante aproximadamente 70 horas con un perfil de temperatura controlado por PIC dentro del intervalo -25°C → +45°C. El producto seco se extrae del liofilizador y se muele para obtener la distribución de partículas deseada.

Métodos de HPLC analítica

Método 1: HPLC para el control durante el proceso desde la fermentación hasta la base de colistina

65 Equipo: Equipo de HPLC automático Waters, que comprende:

ES 2 532 408 T3

Bomba: Modelo6000 A/510
Inyector: WISP 712 A
Detector: Model 441
Prefiltro: Guard Pak, Resolve C18 (puede omitirse)
Columna: Resolve C18, 10 x 8,5 µm o Nova-Pak, 4 µm
Montaje de columna: RCM 8 x 10

Método: Isocrático

Fase móvil:

Tampón: Sulfato de sodio decahidrato, 16,1 g (0,05 M), ácido acético conc., 0,56 ml (0,01 M), trietilamina, 20 ml (0,15 M), agua hasta 1.000 ml. El pH se ajusta a 2,5 con ácido fosfórico.

Tampón alternativo: Sulfato de sodio 0,04 M, ácido metanosulfónico 0,56 M, trietilamina 0,087 M, pH a 3,0.

Antes de su utilización, se disuelve acetonitrilo, 170 g, en el tampón para tener 1.000 ml. La solución se purga con helio durante 15 min.

Procedimiento de ensayo:

Caudal: 1,5 ml/min, alternativa 1,0 ml/min

Temperatura: ambiente.

Volumen de inyección: 20 µl, alternativa 25 µl.

Detección: 214 nm, 0,1 AUFS o 1,0 AUFS.

Duración: 30 min.

Patrón: Patrón auténtico de sulfato de colistina, disuelto en agua hasta 1 mg/ml.

Patrón: Base de colistina, 1,0 mg/ml en ácido clorhídrico 0,1 M.

Muestras analíticas: Se diluyen para que contengan 0,5-1 mg/ml. Diluyente: ácido fosfórico al 3%, 40 ml, y acetonitrilo, 60 ml. Centrifugación si se observa turbidez.

Método 2: HPLC para la base de colistina hasta producto final a granel

Equipo: Equipo de HPLC automático Waters, que comprende:

Bomba: Modelo 510

Inyector: automuestreador 717 Plus

Detector: 490 E

Prefiltro: Guard Pak, Nova-Pak, C18

Columna: Nova-Pak, C18, 60 Å, 4 µm, 150 x 4,6 mm.

Horno de columna: Jones Chromatography Model 7955

Reactivos:

Sulfato de sodio anhidro para análisis

Trietilamina, grado HPLC

Ácido metanosulfónico, ≥ 99%

Agua Milli-Q

Tampón: Sulfato de sodio anhidro, 28,4 g (0,10 M), trietilamina 14,0 ml (0,05 M), ácido metanosulfónico 10,0 ml (0,06 M), agua Milli-Q hasta 2.000 ml. El tampón se filtra al vacío a través de un filtro de 0,45 µm.

Eluyente A: 50% de tampón, 35% de agua Milli-Q, 15% de acetonitrilo. Ajustado a un pH de 2,0 con ácido metanosulfónico.

Eluyente B: 50% de tampón, 20% de agua Milli-Q, 30% de acetonitrilo. Ajustado a un pH de 2,0 con ácido metanosulfónico.

Preparación de la muestra:

Acetato de colistina: 1-2 g/l en ácido acético 0,05 M. Agitación durante 30 minutos y filtración a través de un filtro de membrana de 0,45 µm

Patrones:

Se preparan dos patrones propios, uno con actividad alta (2.000 µg/mg) y uno con actividad baja (400 µg/mg).

ES 2 532 408 T3

Procedimiento de ensayo:

Caudal: 0,8 ml/min
 Temperatura de la columna: 25°C
 Detección: 214 nm
 Constante de tiempo: 1,0 s
 AUFS: 1.000 AU
 Auto cero: Activado
 Temperatura de WISP: 25°C.
 Inyección: 20 µl/ciclo

Programa de gradiente:

Gradiente:		Tiempo	Caudal (ml/min)	%A	%B	%C	Curva
	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
Los cambios tras 40 minutos no forman parte del ensayo, sólo tienen lugar después de una serie de análisis							
	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

- 5 El eluyente A se utiliza como blanco y se resta de los patrones y muestras.

Método 3: HPLC para el sulfato de colistina monocomponente

Equipo: Equipo de HPLC automático Waters, que comprende:

Bomba: Modelo 510
 Inyector: automuestreador 717 Plus
 Detector: 490 E
 Columna: Nova-Pak, C18, 60 Å, 4 µm, 250 x 4,6 mm
 Horno de columna: Jones Chromatography Model 7955

Reactivos:

Agua Milli-Q
 Acetonitrilo, grado HPLC
 Ácido metanosulfónico, ≥ 99%
 Trietilamina, grado HPLC
 Sulfato de sodio anhidro para análisis
 Tampón: Sulfato de sodio anhidro, 28,4 g (0,10 M), trietilamina 14,0 ml (0,05 M), ácido metanosulfónico 10,0 ml (0,06 M), agua Milli-Q hasta 2.000 ml. El tampón se filtra al vacío a través de un filtro de 0,45 µm.
 Eluyente A: 50% de tampón, 35% de agua Milli-Q, 15% de acetonitrilo. Ajustado a un pH de 2,0 con ácido metanosulfónico.
 Eluyente B: 50% de tampón, 20% de agua Milli-Q, 30% de acetonitrilo. Ajustado a un pH de 2,0 con ácido metanosulfónico.

Preparación de la muestra:

Sulfato de colistina monocomponente: 2,8 mg/ml en agua Milli-Q. Agitación durante 15 minutos y filtración a través de un filtro de 0,45 µm.

Procedimiento de ensayo:

Caudal: 1,0 ml/min
 Longitud de onda de detección: 214 nm
 Temperatura de la columna: 25°C
 Volumen de inyección: 40 µl

ES 2 532 408 T3

Temperatura del automuestreador: 25°C

Programa de gradiente:

Gradiente:		Tiempo	Caudal (ml/min)	%A	%B	Curva
	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
Los cambios tras 70 minutos no forman parte del ensayo, sólo tienen lugar después de una serie de análisis						
	9	71,00	1,00	0	100	6
	10	81,00	1,00	0	100	6
	11	82,00	0	0	100	6

5 Referencias

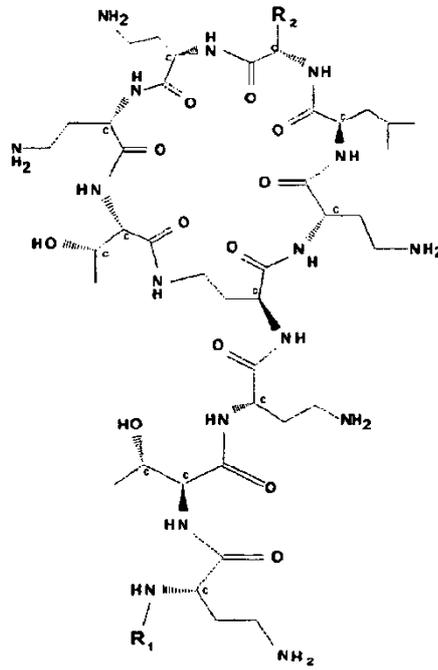
- 1) Suzuki, T., Hayashi, K., Fujikawa, K. (1963), Studies on the Chemical Structure of Colistin: III. Enzymatic Hydrolysis of Colistin A, J Biochem 54: 412-418.
- 2) Elverdam, I., P. Larsen y E. Lund (1981), Isolation and characterization of three new polymyxins in polymyxin B and E by high-performance liquid chromatography. J. Chrom. (218) 653- 661.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la purificación de colistina por cromatografía de fase inversa, caracterizado porque presenta las etapas de
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de etanol es de 20% a 24%.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de etanol es de 24%.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de etanol es de 12%.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de ácido acético es de 0,1 M.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, seguido por una etapa adicional de cromatografía de interacción hidrófoba.
- 20 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pH de la fase móvil es de 7 a 8.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pH de la fase móvil es de 7,5.
- 25 9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que
- la concentración alta de etanol es de 24%,
- la concentración baja de etanol es de 12%,
- 30 la concentración de ácido acético es de 0,1 M,
- el pH de la fase móvil es de 7,5, y
- la fase estacionaria es una resina C8.

Fig. 1



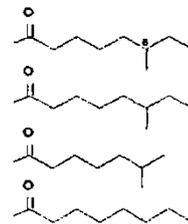
Polimixina E

Colistina A = Polimixina E1 : R1 = 6-metil-octanoilo

Colistina A-IIe = Polimixina E1-I : R1 = 6-metil-octanoilo

Colistina B = Polimixina E2 : R1 = 6 metil-heptanoilo

Polimixina E3 : R1 = octanoilo



R2 =



R2 =



R2 =



R2 =



Fig. 2

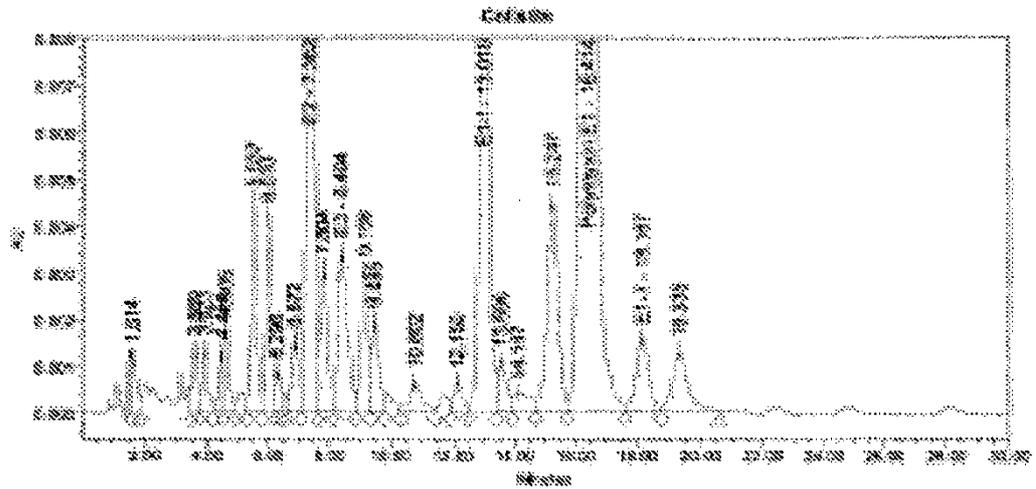


Fig. 3

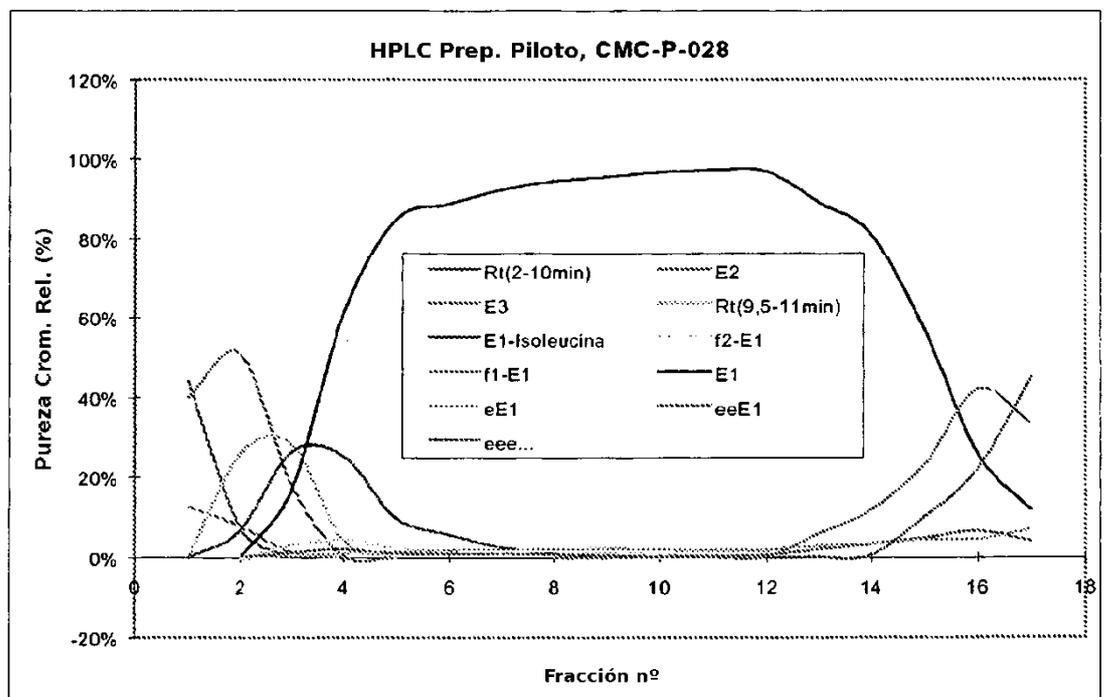


Fig. 4

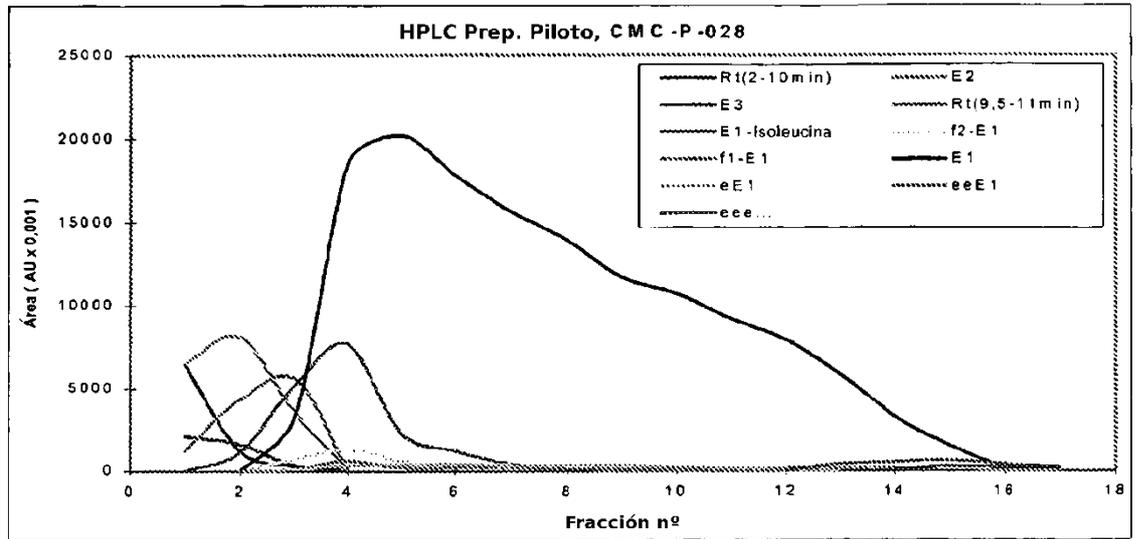


Fig. 5

