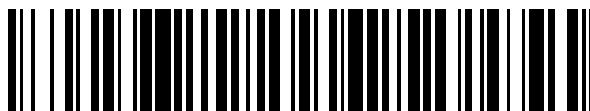


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 554**

51 Int. Cl.:

A61K 38/14 (2006.01)

C07K 9/00 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2014 PCT/CN2014/000950**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15062168**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2014 E 14857463 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3064214**

54 Título: **Procedimiento de separación y purificación para el clorhidrato de vancomicina de alta pureza**

30 Prioridad:

01.11.2013 CN 201310537310

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

06.04.2020

73 Titular/es:

**ZHEJIANG MEDICINE CO., LTD. XINCHANG
PHARMACEUTICAL FACTORY (100.0%)
No.59 Huancheng Donglu Xinchang County
Zhejiang 312500, CN**

72 Inventor/es:

**LI, ENMIN;
ZHUANG, YIYUN;
WANG, JUE;
SUN, XINQIANG;
LAO, XUEJUN y
JIANG, BIWANG**

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

ES 2 752 554 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

5 **Procedimiento de separación y purificación para el clorhidrato de vancomicina de alta pureza.**

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a un procedimiento de separación y purificación para clorhidrato de vancomicina de alta pureza.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El clorhidrato de vancomicina es un antibiótico glucopéptido anfótero producido por fermentación de *Actinomyces Amycolatopsis orientalis* en condiciones de control, que tiene una fórmula molecular $C_{66}H_{75}C_{12}N_9O_{24}.HCl$ y un peso molecular de 1,486. El clorhidrato de vancomicina actúa uniendo los péptidos C-terminales D-Ala-D-Ala, lo que inhibe la síntesis de las paredes celulares y también cambia la permeabilidad de las membranas celulares, así como la síntesis de ARN. El clorhidrato de vancomicina se usa particularmente para el tratamiento inicial de infecciones serias o graves causadas por estafilococos resistentes a los antibióticos β -lactámicos, así como en pacientes sensibles a la penicilina o que no responden a la penicilina o la cefalosporina.

25 Desde hace mucho tiempo ya se menciona en la bibliografía que el clorhidrato de vancomicina tiene una toxicidad y ototoxicidad renal grave y, por lo tanto, no se ha utilizado significativamente en clínica. Sin embargo, debido a la gran cantidad recientemente de usos de antibióticos, provocaría un aumento de las infecciones clínicas de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MASA), lo que aumenta la cantidad de uso de clorhidrato de vancomicina año tras año. Por lo tanto, es muy importante reducir la toxicidad del clorhidrato de vancomicina y aumentar la seguridad del uso del clorhidrato de vancomicina medicinal, en donde mejorar la pureza del clorhidrato de vancomicina medicinal es un medio eficaz.

30 Recientemente, con el continuo desarrollo de la ciencia y la tecnología, los expertos en la materia han mejorado constantemente la pureza del clorhidrato de vancomicina, y la toxicidad renal severa, reduciendo constantemente la ototoxicidad causada por el clorhidrato de vancomicina. Con base en los motivos anteriores, es muy importante desarrollar un proceso de purificación de clorhidrato de vancomicina con una mayor pureza, que sea simple y factible, y adecuado para su producción industrial.

40 La molécula de vancomicina se compone de dos estructuras básicas, que incluyen un grupo sacárido, α -o-vancosamina- β -o-glucosilo, y un esqueleto heptapéptido. La estructura de la vancomicina determina su inestabilidad, y las moléculas de vancomicina se degradan para producir productos de degradación en condiciones de ácido, álcali o alta temperatura. Mientras tanto, múltiples grupos hidroxilo fenólicos libres de la estructura se oxidan fácilmente en quinoides.

45 La bibliografía ha informado que la vancomicina se hidrolizaría en condiciones de ácido y a alta temperatura para producir desvancosaminil vancomicina o aglucovancomicina, quitando uno o dos glicosilos, y degradando en amino vancomicina quitando el acilamino que tiene dos isómeros en condiciones ácidas débiles. Con base en estas características de la estructura química de la vancomicina, es difícil producir clorhidrato de vancomicina con alta pureza.

50 Ha habido décadas de antecedentes para desarrollar productos de clorhidrato de vancomicina. En la tecnología de preparación temprana, el clorhidrato de vancomicina se prepara por cristalización usando solventes como metanol, etanol, isopropanol y acetona, etc. y precipitación usando cloruro de amonio o cloruro de sodio. Sin embargo, generalmente su pureza no es alta debido a muchas impurezas, especialmente a muchos análogos estructurales de vancomicina en el medio de fermentación de vancomicina. Por lo tanto, es difícil cumplir con los estándares europeos de farmacopea con una pureza cromatográfica de más del 93%.

60 Recientemente la tecnología se ha usado ampliamente en la separación y purificación de clorhidrato de vancomicina, con el desarrollo de tecnología de separación cromatográfica de todo tipo de medios. El documento CN200710187300.5 realiza una cromatografía utilizando cargas de intercambio iónico tales como gel de glucano Sephadex CM-25, agarosa SP Sepharose o agarose CM Sepharose, en donde una fase móvil es bicarbonato de amonio de 4-6%, para obtener clorhidrato de vancomicina con una pureza cromatográfica de 95%-98%, y luego se solidifica por precipitación añadiendo una solución de cloruro de sodio, y luego se separa y se lava con etanol y se seca para obtener clorhidrato de vancomicina.

La pureza del clorhidrato de vancomicina obtenida mediante el procedimiento es mayor, sin embargo, la tasa de recuperación no es alta. Además, este procedimiento de cromatografía de intercambio iónico no es muy ideal para eliminar el pigmento. Por lo tanto, el producto producido por el procedimiento no es muy ideal en apariencia de color y absorción de la solución.

La solicitud de patente PCT N°. WO2006061166 utiliza un gel de sílice de fase inversa (gel de sílice octadecilo) con un tamaño de partícula de 5 µm como medio cromatográfico, una fase móvil que incluye una solución acuosa de 5 mM acetato de amonio y 3% de solución de metanol con pH = 4,0 y un 2% de un agente analítico con n-pentanol en la fase móvil, para recoger clorhidrato de vancomina con una pureza cromatográfica de más del 97,5%. Posteriormente, el clorhidrato de vancomina se concentra al vacío a una concentración de 140 mg/ml, y se agrega metanol, luego se ajusta el pH = 8,5 a 9,0 con una solución acuosa de amoníaco, y se enfría a 0°C para producir precipitado, y luego se separa y se lava con metanol, y luego se disuelve la separación con agua y se ajusta el pH = 3,2 y se cristaliza con isopropanol, y se seca al vacío, para obtener clorhidrato de vancomicina con una pureza del 97-99,3%. Existen algunas deficiencias en el procedimiento de la patente, especialmente se dificulta su producción comercial expansiva. En primer lugar, el procedimiento utiliza diferentes solventes como fase móvil y eluato, por lo que es difícil recuperar solventes; en segundo lugar, no puede alcanzar una pureza cromatográfica del 99% por de una vez debido a la purificación de fase inversa en el procedimiento. Así que, finalmente necesita dos etapas en la cristalización del solvente para obtener clorhidrato de vancomina mediante secado al vacío. Sin embargo, los solventes residuales no pueden eliminarse efectivamente en la cristalización del solvente, y los solventes residuales no pueden cumplir con los requisitos de ICH. Finalmente, el rendimiento del producto no es ideal en este procedimiento debido a la multitud de etapas.

Por lo tanto, se puede ver en la bibliografía actual que no existe ningún procedimiento adecuado para la producción comercial para preparar clorhidrato de vancomicina con alta pureza (pureza cromatográfica de más del 99%) debido a muchas deficiencias. En vista de la seguridad de los medicamentos del clorhidrato de vancomicina, se necesitan procedimientos para preparar el clorhidrato de vancomicina con alta pureza.

30

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un procedimiento de separación y purificación para clorhidrato de vancomicina de acuerdo con la reivindicación 1 con alta pureza (pureza cromatográfica de más del 99%), bajas impurezas y alta eficiencia adecuada para su producción comercial. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 comprende las siguientes etapas:

(1) obtener una solución de clorhidrato de vancomicina a partir de un producto de vancomicina en bruto mediante cromatografía de intercambio iónico y obtener un primer concentrado de clorhidrato de vancomicina mediante nanofiltración, desalinización y concentración por desalinización y concentración por nanofiltración, en donde un relleno de la columna de cromatografía de intercambio iónico es un intercambio catiónico Sephadex o Sepharose, una fase móvil es una solución acuosa de NH_4HCO_3 ;

(2) ajustar el primer concentrado de clorhidrato de vancomicina con una solución de ácido clorhídrico a pH = de 3,5 a 4,5 y luego realizar una cromatografía en columna usando una columna de cromatografía inversa para el primer concentrado de clorhidrato de vancomicina ajustado, en donde una fase estacionaria es un polímero de poliestireno, y una fase móvil es una solución acuosa que contiene etanol al 5% (V/V) para prelavado, luego la proporción de etanol en la fase móvil se incrementa al 10% para eluir;

(3) recoger una solución cromatográfica de contenido de vancomicina B de más del 98,5%;

(4) ajustar la solución cromatográfica con ácido clorhídrico a pH = 2,5 a 3,5, y separar el disolvente y la sal mediante nanofiltración, desalinización y concentración para obtener un segundo concentrado de clorhidrato de vancomicina; y

(5) obtener un polvo seco de vancomicina con una pureza cromatográfica de hasta el 99% y una apariencia blanca pura deshidratando y secando el segundo concentrado de clorhidrato de vancomicina de la etapa (4).

Preferiblemente, la solución de clorhidrato de vancomicina de la etapa (1) obtenida por cromatografía de intercambio iónico tiene una pureza cromatográfica de más del 95%. La solución de clorhidrato de vancomicina con una pureza cromatográfica no inferior al 95% se produce mediante el siguiente procedimiento de la técnica anterior.

5 (1) en primer lugar, según el procedimiento de la publicación de patente china N°. CN01132048.6, *Amycolatopsis Orientalis* SIPI43491 como cepas de fermentación se inocula en un primer tanque de siembra al cultivar un inóculo, y se cultiva en un tanque de fermentación después de expandir el cultivo en un segundo tanque de siembra a una temperatura de control de 24 a 34 °C y a una presión de cultivo de 0,01 a 0,08 MPa, mediante el control de oxígeno disuelto y pH en el proceso, con un período de fermentación de 4 a 6 días, para obtener un caldo de fermentación de vancomicina.

10 (2) en segundo lugar, de acuerdo con el procedimiento de la solicitud de patente china N°. CN200710198599.4, el caldo de fermentación de vancomicina se extrae con resina adsorbente macroporosa, se eluye con una solución acuosa ácida que contiene etanol, se decolora agregando un carbón activado al eluyente para obtener una solución desteñida, y luego se agrega bicarbonato de amonio en la solución desteñida, y se ajusta a pH = 7,5 a 8,5 con hidróxido de amoniaco, luego se agita y se estabiliza para obtener un producto en bruto de vancomicina con una pureza cromatográfica no inferior al 80% (el producto en bruto de vancomicina se denomina producto en bruto de vancomicina de la etapa (1)).

15 (3) El producto en bruto de vancomicina se disuelve en agua purificada y se filtra mediante una membrana cerámica con un diámetro de poro de 0,01 a 0,5 µm, para obtener un filtrado transparente de vancomicina. Y el filtrado transparente de vancomicina se purifica mediante una columna de cromatografía de intercambio iónico para obtener una solución cromatográfica efectiva con un contenido de vancomicina B de más del 95% (es decir, la pureza cromatográfica de la vancomicina no es inferior al 95% de la solución de clorhidrato de vancomicina).

20 De acuerdo con la presente invención, la carga de la columna de cromatografía de intercambio iónico es un Sephadex o Sepharose de intercambio catiónico. El filtrado de vancomicina se aplica para cromatografía en columna en condiciones ácidas, y se aplica para cromatografía en condiciones de sal de metal alcalino o sal de amonio, en donde las sales NH₄⁺ y las Na⁺ pueden ser NaCl, NH₄HCO₃ y (NH₄)₂CO₃, etc.; las fracciones con un contenido de vancomicina B de más del 93% se recogen cuando se realiza la cromatografía. Esto hace que el contenido de vancomicina B sea superior al 95% en la solución cromatográfica efectiva.

25 La solución cromatográfica efectiva que contiene vancomicina con una pureza cromatográfica no inferior al 95% se realiza por nanofiltración para obtener un concentrado que contiene clorhidrato de vancomicina del 10-20% (es decir, la concentración es 100 mg / ml-200 mg / ml), y preferiblemente el concentrado se almacena a una temperatura de 2 a 8 °C. La membrana de nanofiltración con un peso molecular de 100 a 800 Da se utiliza para la nanofiltración. En donde, la temperatura concentrada es igual o inferior a 20 °C.

30 El concentrado se ajusta a pH = 3,5 ~ 4,5 con solución de ácido clorhídrico 4N y se pasa a través de una columna cromatográfica inversa con polímero de poliestireno como relleno, y el tamaño de partícula de poliestireno es preferiblemente de 20 µm a 40 µm. La fase móvil de acuerdo con la presente invención es una solución acuosa que contiene etanol al 5% (V/V) para el prelavado, y preferiblemente el agente tampón es sal de amonio para ajustar el pH, preferiblemente para ajustar el pH = 3,5 ~ 5,5 con ácido clorhídrico o ácido acético, preferiblemente se realiza una elución en gradiente con cloruro de amonio y acetato de amonio, en donde, la concentración de solución acuosa de metanol o solución acuosa de etanol que contiene sal de amonio tiene de 0,1% en peso a 1% en peso. Se recogen las fracciones con un contenido de vancomicina B de más del 98,5%, para obtener el contenido de vancomicina B de más del 99% en el eluyente mixto.

35 El eluato mixto se ajusta a pH = 2,5 ~ 3,5 con ácido clorhídrico 4N, y luego se separan los solventes y las sales por nanofiltración, preferiblemente, la nanofiltración se realiza usando una membrana de nanofiltración con un peso molecular de 100 a 800 Da. En donde, la temperatura concentrada es igual o inferior a 20 °C. La solución se concentra para obtener un concentrado que contiene clorhidrato de vancomicina del 15 al 25%, y el concentrado se deshidrata usando un liofilizador o un secador por atomización (en donde el procedimiento de deshidratación es liofilización, secado por pulverización, cristalización con sal o cristalización con solvente, el procedimiento de deshidratación pertenece a las técnicas anteriores normales) y se seca para obtener clorhidrato de vancomicina con una pureza cromatográfica de más del 99%. La absorbancia del polvo de clorhidrato de vancomicina es inferior a 0,02, y la blancura del polvo de clorhidrato de vancomicina es más del 88% bajo una concentración del 10% y una longitud de onda de 450 nm.

40 En comparación con las patentes anteriores, el procedimiento de preparación de la presente invención tiene las siguientes ventajas: la pureza del clorhidrato de vancomicina final es superior al 99% y su apariencia de color ha mejorado enormemente mediante la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de gel de sílice inversa; el contenido de vancomicina es más del 99% mediante dos cromatografías de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía inversa; y el procedimiento es simple y fácil; utilizando sal de amonio y etanol o metanol como fase móvil de cromatografía inversa. Es más fácil procesar

posteriormente y recuperar solventes en comparación con patentes anteriores; y el eluyente se concentra fácilmente mediante una membrana de nanofiltración, y la operación es conveniente. De esta forma, el proceso no solo mejora la calidad de los productos, sino que también es adecuado para expandirlo en la producción comercial.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La figura 1 muestra el cromatograma de vancomicina bruta del ejemplo 1, el contenido de vancomicina B es del 90,2%.

La figura 2 muestra el cromatograma del concentrado de clorhidrato de vancomicina del ejemplo 1, el contenido de vancomicina B es del 95,3%.

15

La figura 3 muestra el cromatograma del producto de clorhidrato de vancomicina del ejemplo 2, el contenido de vancomicina B es del 99,1%.

20

La figura 4 muestra el cromatograma de concentrado de clorhidrato de vancomicina de los ejemplos 4 a 6, el contenido de vancomicina B es del 95,8%.

La figura 5 muestra el cromatograma del producto de clorhidrato de vancomicina del ejemplo 4, el contenido de vancomicina B es del 99,0%.

25

La figura 6 muestra el cromatograma del producto de clorhidrato de vancomicina del ejemplo 5, el contenido de vancomicina B es del 99,2%.

La figura 7 muestra el cromatograma del producto de clorhidrato de vancomicina del ejemplo 6, el contenido de vancomicina B es del 99,0%.

30

La figura 8 muestra el cromatograma del concentrado de clorhidrato de vancomicina de los ejemplos 7-9, el contenido de vancomicina B es del 95,9%.

35

La figura 9 muestra el cromatograma del producto de clorhidrato de vancomicina del ejemplo 7, el contenido de vancomicina B es del 99,0%.

La figura 10 muestra el cromatograma del producto de clorhidrato de vancomicina del ejemplo 8, el contenido de vancomicina B es del 99,2%.

40

La figura 11 muestra el cromatograma del producto de clorhidrato de vancomicina del ejemplo 9, el contenido de vancomicina B es del 99,3%.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION Y SUS REALIZACIONES PREFERIDAS

45

En lo sucesivo, la presente invención se ilustrará adicionalmente con referencia a ejemplos. Los ejemplos se muestran solo para ilustrar la solución técnica de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

50

La presente invención además se ilustra específicamente mediante los siguientes ejemplos, pero no se limita a los siguientes ejemplos y al alcance de los parámetros de proceso de los ejemplos.

55 **Ejemplo 1: Preparación de una solución de clorhidrato de vancomicina con un contenido de vancomicina B no inferior al 95%**

60 Se disuelven 250 g de vancomicina en bruto en 2,0 L de agua purificada en un vaso de precipitados, se agita completamente y se filtra con una membrana de filtro de tamaño de poro de 0,2 µm después de disolverse por completo, y luego se diluye con agua, para finalmente obtener 3,0 L de la solución disuelta que contiene clorhidrato de vancomicina en bruto con una concentración de 43,6 mg/ml y una pureza cromatográfica del 90,2%, como se muestra en la figura 1.

65 Se aplican 3000 ml de la solución disuelta de clorhidrato de vancomicina en bruto a 8cm*60cm de columna cromatográfica de vidrio que contiene glucano Sephadex CM-25, la capacidad de la columna es del 4% del volumen de la columna cromatográfica. La solución de la columna se mezcla con 1/5 de relleno

5 cromatográfico para formar una solución mixta, y luego la solución mezclada se aplica directamente a la columna cromatográfica de vidrio, y luego se lava con agua purificada a un caudal de 1,5 veces los volúmenes de columna por hora, después de lavar 6 veces los volúmenes de la columna, y se prelava con 0,3% (p/v) de NH_4HCO_3 solución acuosa con un volumen de columna de una vez por hora. El volumen de prelavado es de 15 a 20 veces el volumen de la columna.

10 Después de terminar el prelavado, el contenido de vancomicina B del eluyente es más del 90%, y luego se eluye en un 5% (p/v) de NH_4HCO_3 de solución acuosa para obtener vancomicina, y el eluyente se recoge en fracciones, y las fracciones con un contenido de vancomicina B de más del 95% determinado por HPLC se mezclan, y luego se ajustan a $\text{pH} = 3,1$ con ácido clorhídrico 4N, para obtener un eluyente eficaz de 5600 ml con la concentración de 18,6 mg/ml, una pureza cromatográfica del 96,5%, tal y como se muestra en la figura 2.

15 A continuación, el eluyente efectivo se desala y se concentra mediante una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400, el agua purificada se agrega 5 veces, para finalmente obtener un dializado con una conductividad de 1255 $\mu\text{s}/\text{cm}$, y luego el líquido de alimentación se concentra para obtener concentrado de clorhidrato de vancomicina con una concentración de 156 mg/ml, $\text{pH}=3,8$, la pureza cromatográfica del 95,3% (véase la figura 2), el volumen de 680 ml y el concentrado se almacena entre 2 a 8 °C para su uso.

20

Ejemplo 2: Preparación de clorhidrato de vancomicina con alta pureza (no según la presente invención)

25

Se pasan 680 ml del concentrado del ejemplo 1 a través de una columna (15cm*30cm) que tiene una carga de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 μm , ajustado a $\text{pH} 4,0$ mediante ácido clorhídrico, prelavado durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene NH_4Cl al 0,2% (W/V) y solución acuosa de metanol al 8% (V/V) como fase móvil con un caudal de 5 BV/h, y luego la proporción de metanol de la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5 BV/h. En la longitud de onda de detección en línea $\lambda = 280$, el eluyente se recoge alrededor de 10 botellas con 2,5 L por botella cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, y se determina el contenido de vancomicina B por botella, luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener la solución cromatográfica mixta de 12,5 L, con la concentración de 6,8 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a $\text{pH} = 2,8$ con ácido clorhídrico 4N.

35

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación, cuando ya no se produce disolvente, la solución de mezcla se concentra a un concentrado con una concentración de 240 mg/ml y un volumen de 338 ml, y luego el concentrado se filtra con una membrana de filtro de 0,45 μm y se liofiliza en el liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 68,5 g, con un rendimiento del 64,6%, pureza cromatográfica del 99,1% (véase la figura 3), y la absorbancia de la solución del 10% a 450 nm es 0,012.

40

Ejemplo 3: Comparación de los efectos de concentración por membrana de nanofiltración con diferentes diámetros de poro

Se seleccionan tubos de membrana de nanofiltración con diferentes diámetros de poro tales como 100Da, 200Da, 400Da y 800Da y con la misma área de filtro de 0,32 m^2 respectivamente, para instalar a su vez en un pequeño equipo de membrana de nanofiltración para laboratorio (tipo LNG-NF-101). Se dividen 8000 ml de concentrado que contiene 10% de clorhidrato de vancomicina en 4 partes, y una de ellas se concentra por nanofiltración, con la presión de 10 bar controlada mediante bomba de circulación. La potencia de la muestra de diálisis se detecta al comienzo de la concentración y registra un índice de flujo de la diálisis, cuando el fluido circulante se concentra a un volumen de 1000 ml, la detección de potencia de la muestra de diálisis finaliza y se registra el índice de flujo de la diálisis. El equipo se lava cada vez después de usarlo, y el tubo de la membrana de nanofiltración se reemplaza por el siguiente, al usar otro concentrado para el experimento. Los resultados del ensayo se muestran a continuación:

55

60

Diámetro poro Elemento de prueba	100Da	200Da	400Da	800Da
Caudal flujo (L/H)	2,2	4	4,2	4,2
Potencia inicial ($\mu\text{m/l}$)	5	6	5	8
Caudal flujo final (L/H)	1,6	3,8	3,8	4,0
Potencia final ($\mu\text{m/l}$)	6	7	7	8

5 Tal y como se muestra en la tabla anterior, las membranas de nanofiltración con diferentes diámetros de poro tienen poco impacto en la potencia del dializado. Así que todos ellos son adecuados para concentrar clorhidrato de vancomicina. Pero los tubos de membrana con diferentes diámetros de poro tienen efectos sobre los índices de flujo, y los tubos de membrana con diámetros de poro de más de 200Da son más apropiados para la tasa de flujo.

10

Ejemplo 4: Comparación de geles de sílice C18 con diferentes tamaños de partículas (no según la presente invención)

15 Con 3330 ml del concentrado con la concentración de 150 mg/ml, con una pureza cromatográfica del 95,8% (véase la figura 4) ajustados a un pH = 4,0 con ácido clorhídrico o solución de hidróxido de sodio, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 5 μm y se ajusta a pH = 4,0 con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene NH_4Cl al 0,1% (V/V) y 8% (V/V) de solución acuosa de metanol como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a una velocidad de flujo de 5BV/h la longitud de onda de detección en línea $\lambda = 280$, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 8 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 10 L, con una concentración de 3,8 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

20 La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de la mezcla se concentra a una concentración de 150 mg/ml y a un volumen de 248 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 30,8 g, con un rendimiento del 62,2%, una pureza cromatográfica del 99,0% (véase la figura 5) y la absorbancia A de la solución del 10% a 450 nm es 0,014.

35

Ejemplo 5: Comparación de geles de sílice C18 con diferentes tamaños de partículas (no según la presente invención)

40

45 Con 330 ml del concentrado con una concentración de 150 mg/ml, pureza cromatográfica del 95,8% (véase la figura 4) ajustados a pH = 4,0 con ácido clorhídrico o solución de hidróxido de sodio, se llena una columna preparativa (15 cm * 30 cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 μm y se ajusta a pH = 4,0 con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene NH_4Cl al 0,1% (V/V) y 8% (V/V) de solución acuosa de metanol como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al

12% para eluir a una velocidad de flujo de 5BV/h la longitud de onda de detección en línea $\lambda = 280$, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 8 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 10 L, con una concentración de 4,1 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de la mezcla se concentra a una concentración de 150 mg/ml y un volumen de 265 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 32,5 g, con un rendimiento del 65,6%, la pureza cromatográfica del 99,2% (véase la figura 6) y la absorbancia A de la solución del 10% a 450 nm es de 0,015.

Ejemplo 6: Comparación de geles de sílice C18 con diferentes tamaños de partículas (no según la presente invención)

Con 330 ml del concentrado con la concentración de 150 mg/ml, la pureza cromatográfica del 95,8% ajustados a pH = 4,0 con ácido clorhídrico o solución de hidróxido de sodio, se llena una columna preparativa (15cm*30 cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 60 μm y se ajusta a pH = 4,0 con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución de NH_4Cl al 0,1% (V/V) y de metanol como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a una velocidad de flujo de 5BV/h la longitud de onda de detección en línea $\lambda = 280$, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 8 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 10 L, con una concentración de 3,8 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una concentración de 150 mg/ml y un volumen de 245 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 29,8 g, con un rendimiento del 60,2%, la pureza cromatográfica del 99,0% (véase la figura 7) y la absorbancia A de la solución del 10% a 450 nm es 0,012.

De la comparación de los ejemplos 4, 5 y 6 se puede encontrar que la cromatografía inversa que contiene relleno de gel de sílice C18 con diferente tamaño de partícula tiene poco impacto en la pureza, rendimiento y absorbancia cromatográfica. Pero, en cuanto a las presiones de operación, cuanto menor sea el tamaño de partícula, mayor es la presión. De esta forma, es más adecuado para la producción en masa elegir gel de sílice C18 con un tamaño de partículas de 30 μm a 60 μm .

Ejemplo 7: Comparación de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ y NH_4Cl en la fase móvil (no según la presente invención)

Con 330 ml del concentrado con una concentración de 152 mg/ml, con pureza cromatográfica del 95,9% (véase la figura 8) ajustados a pH = 4,0 con ácido clorhídrico o solución de hidróxido de sodio, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 μm y se ajusta a pH = 4,0 con ácido acético, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ al 0.1% (V/V) y de metanol como fase móvil, a la velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5BV/h la longitud de onda de detección en línea $\lambda = 280$, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 8 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 10 L, con una concentración de 4,0 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2.8 con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de la mezcla se concentra a una concentración de 150 mg/ml y un volumen de 252 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para

obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 31,1 g, la pureza cromatográfica del 99,0% (véase la figura 9) y la absorbancia A de la solución del 10% a 450 nm es 0,017.

5 A partir de la comparación del ejemplo 5, se puede encontrar que los componentes de la fase móvil que contienen NH_4Cl y sus rendimientos son poca diferencia con respecto a $\text{CH}_3\text{COONH}_4$.

10 **Ejemplo 8: Comparación de diferentes proporciones de NH_4Cl en fase móvil (no según la presente invención)**

15 Con 330 ml del concentrado con una concentración de 152 mg/ml, la pureza cromatográfica del 95,9% ajustado a un pH = 4,0 con solución de ácido clorhídrico, se llena una columna preparativa (15 cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 μm y se ajusta a pH = 4,0 con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución de NH_4Cl al 0,5% (W/V) y de metanol al 8% (V/V) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5BV/h, la longitud de onda de detección en línea $\lambda = 280$, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 9 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 12,5 L, con una concentración de 3,2 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

25 La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una concentración de 150 mg/ml y un volumen de 260 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 32,1 g, el campo de 64,0%, la pureza cromatográfica de 99,2% (véase la figura 10) y la absorbancia A de la solución de 10% a 450 nm es 0,016.

35 **Ejemplo 9: Comparación de diferentes proporciones de NH_4Cl en fase móvil (no según la presente invención)**

40 Con 330 ml del concentrado con una concentración de 152 mg/ml, la pureza cromatográfica del 95,9% ajustados a pH = 4,0 con solución de ácido clorhídrico, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 μm y se ajusta a pH = 4,0 con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución acuosa de NH_4Cl al 1,0% (W/V) y de metanol al 8% (V/V) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5BV/h, la longitud de onda de detección en línea $\lambda = 280$, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 9 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 12,5 L, con una concentración de 3,1 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

50 La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una concentración de 150 mg/ml y un volumen de 258 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra por una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 32,0 g, el campo de 63,8%, la pureza cromatográfica de 99,3% (véase la figura 10) y la absorbancia A de la solución de 10% a 450 nm es 0,014.

60 A partir de la comparación de los ejemplos 5, 8 y 9 se puede encontrar que la solución acuosa que contiene diferentes contenidos de la solución acuosa de NH_4Cl (W/V) y de metanol al 8% (V/V) como las fases móviles tiene poco impacto en los rendimientos, los componentes cromatográficos y la absorbancia, pero tiene impactos en el volumen recogido.

65 **Ejemplo 10: Comparación de diferentes pH de la solución de columna y la fase móvil (no según la presente invención)**

Con 670 ml del concentrado con la concentración de 146 mg/ml, la pureza cromatográfica del 96,4%

ajustados a pH = 3,5 con solución de ácido clorhídrico, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 µm y se ajusta a pH = 3,5 con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución acuosa de NH₄Cl al 0,5% (W/V) y de metanol al 8% (V/V) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5BV/h, la longitud de onda de detección en línea λ = 280, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 10 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego el eluyente con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezcla para obtener la solución cromatográfica mixta de 12,5 L, con la concentración de 6,3 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una concentración de 200 mg/ml y un volumen de 380 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 µm, y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 63,1 g, el campo de 64,5%, la pureza cromatográfica de 99,2% y la absorbancia A de solución de 10% a 450 nm es 0,015.

Ejemplo 11: Comparación de diferentes pH de la solución de columna y la fase móvil (no según la presente invención)

Con 670 ml del concentrado con una concentración de 146 mg/ml, la pureza cromatográfica del 96,4% ajustados a pH = 4,5 con solución de ácido clorhídrico, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 µm y se ajusta a pH = 4,5 con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución acuosa de NH₄Cl al 0,5% (W/V) y de metanol al 8% (V/V) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego una proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5BV/h, la longitud de onda de detección en línea λ = 280, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 10 botellas, una botella por 2,5 L, y determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego el eluyente con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezcla para obtener la solución cromatográfica mixta de 15 L, con la concentración de 5,1 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una concentración de 200 mg/ml y un volumen de 360 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 µm, y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 58,2 g, el campo de 59,5%, la pureza cromatográfica de 99,0% y la absorbancia A de la solución de 10% es 0,018.

A partir de la comparación de los ejemplos 7, 10 y 11, se puede encontrar que pH = 3,5 y pH = 4,0 de la solución de la columna y la fase móvil tienen poco efecto sobre el rendimiento y los componentes del producto, y un pH = 4,5 de la solución de la columna daría como resultado aumento del volumen recogido, y el rendimiento y los componentes se ven afectados ligeramente.

Ejemplo 12: Comparación de diferentes concentraciones de CH₃COONH₄ en la fase móvil (no según la presente invención)

Con 330 ml del concentrado con una concentración de 154 mg/ml, la pureza cromatográfica del 95,9% ajustados a pH = 4,0 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 µm y se ajusta a pH = 4,0 con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución acuosa de CH₃COONH₄ al 0,5% (W/V) y metanol al 8% (V/V) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5BV/h, la longitud de onda de detección en línea λ = 280, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 8 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 10 L, con una concentración de 4,1 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una concentración de 150 mg/ml y un volumen de 260 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 32,5 g, el campo de 64,0%, la pureza cromatográfica de 99,1% y la absorbancia A de la solución de 10% es 0,013.

Ejemplo 13: Comparación de diferentes concentraciones de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ en la fase móvil (no según la presente invención)

Con 330 ml del concentrado con una concentración de 154 mg/ml ajustados a $\text{pH} = 4,0$ con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 μm y se ajusta a $\text{pH} = 4,0$ con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución acuosa de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ al 1% (W/V) y metanol al 8% (V/V) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5BV/h, la longitud de onda de detección en línea $\lambda = 280$, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 9 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 12,5 L, con una concentración de 3,2 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a $\text{pH} = 2,8$ con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de la mezcla se concentra a una concentración de 150 mg/ml y un volumen de 265 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 33,0 g, el campo de 65,0%, la pureza cromatográfica de 99,0% y la absorbancia A de la solución de 10% es 0,015.

De la comparación de los ejemplos 7, 12 y 13 se puede encontrar que la solución acuosa que contiene diferentes concentraciones de soluciones acuosas de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (W/V) y de metanol al 8% (V/V) ya que la fase móvil tiene poco impacto en el componente del producto, el rendimiento y la absorbancia, sin embargo, la alta concentración de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tiene impacto en el volumen recogido.

Ejemplo 14: Comparación de diferentes pH en $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ sistema como fase móvil (no según la presente invención)

Con 670 ml del concentrado con una concentración de 145 mg/ml, la pureza cromatográfica del 96,6% ajustados a $\text{pH} = 3,5$ con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 μm y se ajusta a $\text{pH} = 3,5$ con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución acuosa de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ al 0,5% (W/V) y metanol al 8% (V/V) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5BV/h, la longitud de onda de detección en línea $\lambda = 280$, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 10 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 12,5 L, con una concentración de 6,2 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a $\text{pH} = 2,8$ con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una concentración de 200 mg/ml y un volumen de 370 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 60,6 g, el campo del 62,4%, la pureza cromatográfica del 99,2% y la absorbancia A de la solución del 10% es 0,016.

Ejemplo 15: Comparación de diferentes pH en los sistemas $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ como fase móvil (no según la presente invención)

Con 650 ml de concentrado con una concentración de 156 mg/ml, la pureza cromatográfica del 95,7% ajustados a pH = 4,0 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 µm y se ajusta a pH = 4,0 con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución acuosa de CH₃COONH₄ al 0,5% (W/V) y de metanol al 8% (V/V) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5BV/h, la longitud de onda de detección en línea λ = 280, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 10 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 12,5 L, con una concentración de 6,4 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de la mezcla se concentra a una concentración de 200 mg/ml y un volumen de 385 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra por una membrana de filtro de 0,45 µm, y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 63,9 g, el campo de 63,0%, la pureza cromatográfica de 99,0% y la absorbancia A de la solución de 10% es 0,014.

Ejemplo 16: Comparación de diferentes pH en el sistema CH₃COONH₄ como fase móvil (no según la presente invención)

Con 670 ml de concentrado con una concentración de 145 mg/ml, la pureza cromatográfica del 96,6% ajustados a pH = 4,5 con hidróxido de sodio, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene relleno de gel de sílice C18 con un tamaño de partícula de 30 µm y se ajusta a pH = 4,5 con ácido acético, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene una solución acuosa de CH₃COONH₄ al 0,5% (W/V) y de metanol al 8% (V/V) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5BV/h, luego la proporción de metanol en la fase móvil se incrementa al 12% para eluir a la velocidad de flujo de 5BV/h, la longitud de onda de detección en línea λ = 280, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 10 botellas, una botella por 2,5 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 12,5 L, con una concentración de 6,1 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una concentración de 200 mg/ml y un volumen de 370 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 µm, y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 61,0 g, el campo de 62,8%, la pureza cromatográfica de 99,1% y la absorbancia A de la solución de 10% es 0,018.

A partir de la comparación de los ejemplos 14, 15 y 16, se puede encontrar que el pH se controla entre 3,5 ~ 4,5 en la solución de la columna y la fase móvil, con poco impacto en el rendimiento y la calidad del producto preparado.

Ejemplo 17: Ejemplo de preparación de fase inversa con relleno de polímero de resina PS

Con 680 ml de concentrado con una concentración de 148 mg/ml, la pureza cromatográfica del 95,9% ajustados a pH = 4,0 con hidróxido de sodio, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene resina de adsorción de PS con un tamaño de partícula de 20 µm y se ajusta a pH = 4,0 con ácido clorhídrico, y se lava previamente durante 100 minutos con una solución acuosa que contiene etanol al 5% (V/V) como fase móvil, a la velocidad de flujo de 2BV/h, luego la proporción de etanol en la fase móvil se incrementa al 10% para eluir a la velocidad de flujo de 2BV/h, la longitud de onda de detección en línea λ = 280, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para recolectar totalmente 10 botellas, una botella por 2 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener una solución cromatográfica mixta de 12 L, con una concentración de 6,4 mg/ml, y la solución cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una

concentración de 200 mg/ml y un volumen de 365 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 60,6 g, el campo del 60,2%, la pureza cromatográfica del 99,3% y la absorbancia A de la solución del 10% es 0,016.

5

Ejemplo 18: Ejemplo de preparación de fase inversa con relleno de polímero de resina PS

10 Con 680 ml de concentrado con una concentración de 148 mg/ml, la pureza cromatográfica del 95,9%
ajustados a pH = 3,5 con ácido clorhídrico, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene
resina de adsorción de PS con un tamaño de partícula de 20 μm y se ajusta a pH = 3,5 con ácido
15 clorhídrico, y se lava previamente durante 60 minutos con una solución acuosa que contiene etanol al 5%
(V/V) como fase móvil, a la velocidad de flujo de 2BV/h, luego la proporción de etanol en la fase móvil se
incrementa al 10% para eluir a la velocidad de flujo de 2BV/h, la longitud de onda de detección en línea λ =
280, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para
recolectar totalmente 10 botellas, una botella por 2 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por
20 botella, y luego los eluyentes con Se mezcla una pureza cromatográfica de más del 98,5% para obtener una
solución cromatográfica mixta de 12 L, con una concentración de 6,2 mg/ml, y la solución cromatográfica
mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro
de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una
concentración de 200 mg/ml y un volumen de 370 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el
25 concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para
obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 61,2 g, el campo de 60,8%, la pureza
cromatográfica de 99,0% y la absorbancia A de la solución de 10% es 0,015.

Ejemplo 19: Ejemplo de preparación de fase inversa con relleno de polímero de resina PS

30 Con 650 ml de concentrado con la concentración de 158 mg/ml, la pureza cromatográfica del 96,2%
ajustados a pH = 3,5 con ácido clorhídrico, se llena en una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene
35 resina de adsorción de PS con un tamaño de partícula de 40 μm y se ajusta a pH = 3,5 con ácido
clorhídrico, y se lava previamente durante 60 minutos con una solución acuosa que contiene etanol al 5%
(V/V) como fase móvil, a la velocidad de flujo de 2BV/h, luego la proporción de etanol en la fase móvil se
incrementa al 10% para eluir a la velocidad de flujo de 2BV/h, la longitud de onda de detección en línea λ =
40 280, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para
recolectar totalmente 10 botellas, una botella por 2 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por
botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener
una solución cromatográfica mixta de 12 L, con una concentración de 7,1 mg/ml, y la solución
cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

45 La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro
de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una
concentración de 200 mg/ml y un volumen de 370 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el
concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para
50 obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 64,7 g, el campo de 63,0%, la pureza
cromatográfica de 99,0% y la absorbancia A de la solución de 10% es 0,012.

Ejemplo 20: Ejemplo de preparación de fase inversa con relleno de polímero de resina PS

55 Con 650 ml de concentrado con la concentración de 158 mg/ml, la pureza cromatográfica del 96,2%
ajustados a pH = 4,0 con ácido clorhídrico, se llena una columna preparativa (15cm*30cm) que contiene
resina de adsorción de PS con un tamaño de partícula de 40 μm y se ajusta a pH = 4,0 con ácido
60 clorhídrico, y se lava previamente durante 60 minutos con una solución acuosa que contiene etanol al 5%
(V/V) como fase móvil, a la velocidad de flujo de 2BV/h, luego la proporción de etanol en la fase móvil se
incrementa al 10% para eluir a la velocidad de flujo de 2BV/h, la longitud de onda de detección en línea λ =
280, el eluyente se recolecta cuando el valor de absorción comienza a aumentar rápidamente, para
recolectar totalmente 10 botellas, una botella por 2 L, y para determinar el contenido de vancomicina B por
65 botella, y luego los eluyentes con una pureza cromatográfica de más del 98,5% se mezclan para obtener
una solución cromatográfica mixta de 12 L, con una concentración de 6,8 mg/ml, y la solución
cromatográfica mixta se ajusta a pH = 2,8 con ácido clorhídrico 4N.

ES 2 752 554 T3

5 La solución cromatográfica anterior se pasa a través de una membrana de nanofiltración con un diámetro de poro de peso molecular de 400 para la desolvatación. La solución de mezcla se concentra a una concentración de 200 mg/ml y un volumen de 380 ml cuando ya no se produce disolvente, y luego el concentrado se filtra mediante una membrana de filtro de 0,45 μm , y se liofiliza en un liofilizador para obtener polvos liofilizados de clorhidrato de vancomicina de 63,5 g, el campo de 61,8%, la pureza cromatográfica de 99,1% y la absorbancia A de la solución de 10% es 0,018.

10 En los ejemplos 17 a 20, la cromatografía se prepara usando rellenos de fase inversa de polímero PS con dos especificaciones, y se prepara usando pH indiferente. A partir de los resultados, se puede demostrar que las diferencias del componente del producto, el rendimiento y la absorbancia entre ellos son pequeñas y sus efectos son mejores.

15 La presente invención se ilustra mediante los ejemplos anteriores, sin embargo, se entiende que, la presente invención no se limita a instancias especiales y esquemas de implementación aquí descritos. En el presente documento, el propósito que incluye estas instancias especiales y esquemas de implementación tiene como objetivo ayudar a las personas expertas en la materia a realizar esta invención. La presente invención está limitada por el contenido y el alcance de las reivindicaciones de la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de separación y purificación para clorhidrato de vancomicina con alta pureza, que comprende las siguientes etapas:
- 10 (1) obtener una solución de clorhidrato de vancomicina a partir de un producto de vancomicina en bruto mediante cromatografía de intercambio iónico y obtener un primer concentrado de clorhidrato de vancomicina mediante nanofiltración, desalinización y concentración; en donde el relleno de la columna de cromatografía de intercambio iónico es un catión de intercambio Sephadex o Sepharose, la fase móvil es una solución acuosa de NH_4HCO_3 ;
- 15 (2) ajustar el primer concentrado de clorhidrato de vancomicina con una solución de ácido clorhídrico a un pH = 3,5 a 4,5, y luego realizar una cromatografía en columna usando una columna de cromatografía inversa para el primer concentrado de clorhidrato de vancomicina ajustado, en donde una fase estacionaria es polímero de poliestireno, y una fase móvil es una solución acuosa que contiene etanol al 5% (V/V) para prelavado, luego la proporción de etanol en la fase móvil se incrementa al 10% para eluir;
- 20 (3) recoger una solución cromatográfica de contenido de vancomicina B de más del 98,5%;
- (4) ajustar la solución cromatográfica con ácido clorhídrico a pH = 2,5 a 3,5, y separar el disolvente y la sal mediante nanofiltración, desalinización y concentración para obtener un segundo concentrado de clorhidrato de vancomicina; y
- 25 (5) obtener un polvo seco de vancomicina con una pureza cromatográfica de hasta el 99% y una apariencia blanca pura deshidratando y secando el segundo concentrado de clorhidrato de vancomicina de la etapa (4).
- 30 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la solución de clorhidrato de vancomicina de la etapa (1) obtenida por cromatografía de intercambio iónico tiene una pureza cromatográfica de más del 95%.
- 35 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de la solución de clorhidrato de vancomicina de la etapa (1) es de 100 mg/ml ~ 200 mg/ml.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el tamaño de partícula del polímero de poliestireno es de 20 ~ 40 μm .
- 40 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fase móvil de la etapa (2) se ajusta a pH = 3,5 a 5,5 con ácido clorhídrico o ácido acético.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la membrana de nanofiltración con un peso molecular de 100 ~ 800 Da de la etapa (4) se usa para la nanofiltración.

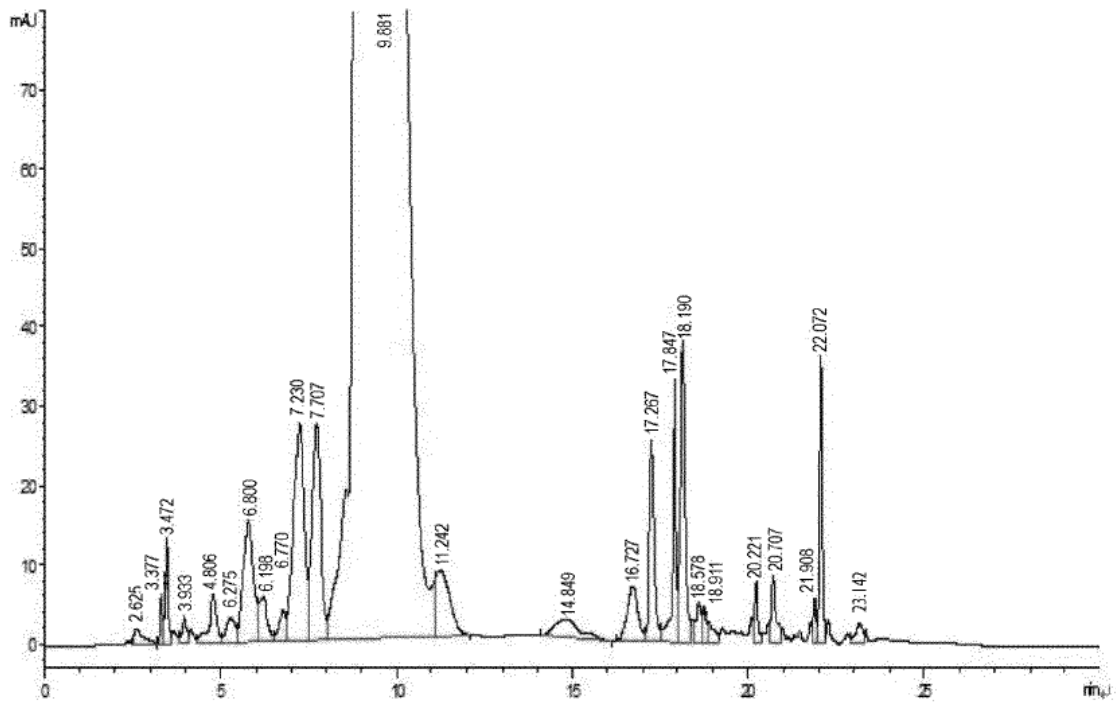


Figura 1

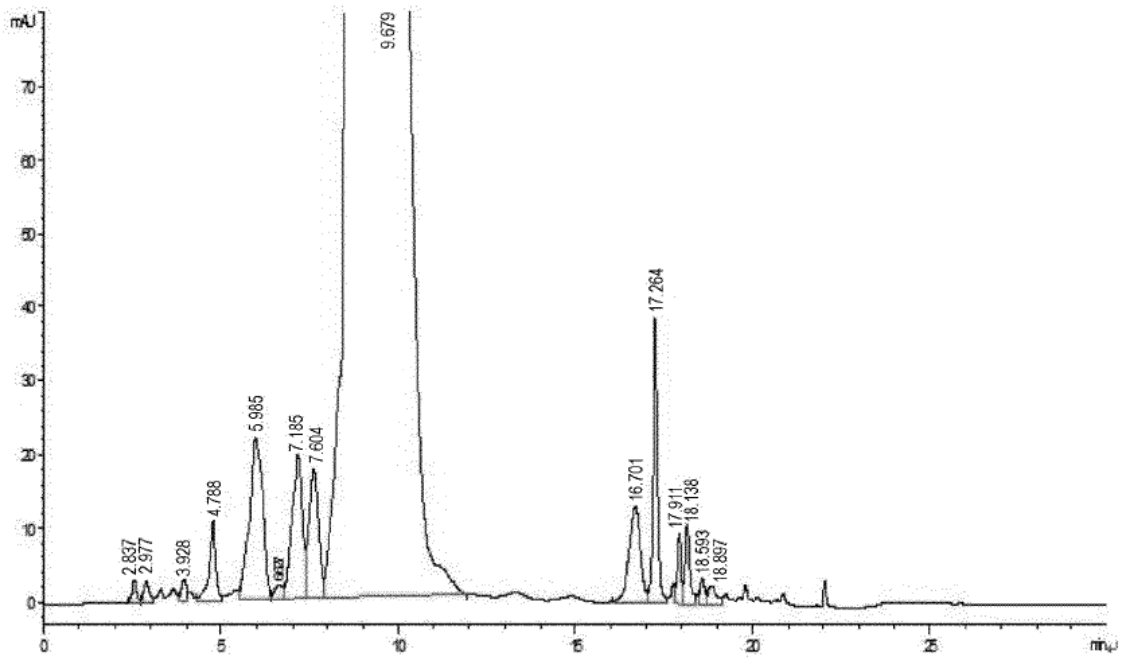


Figura 2

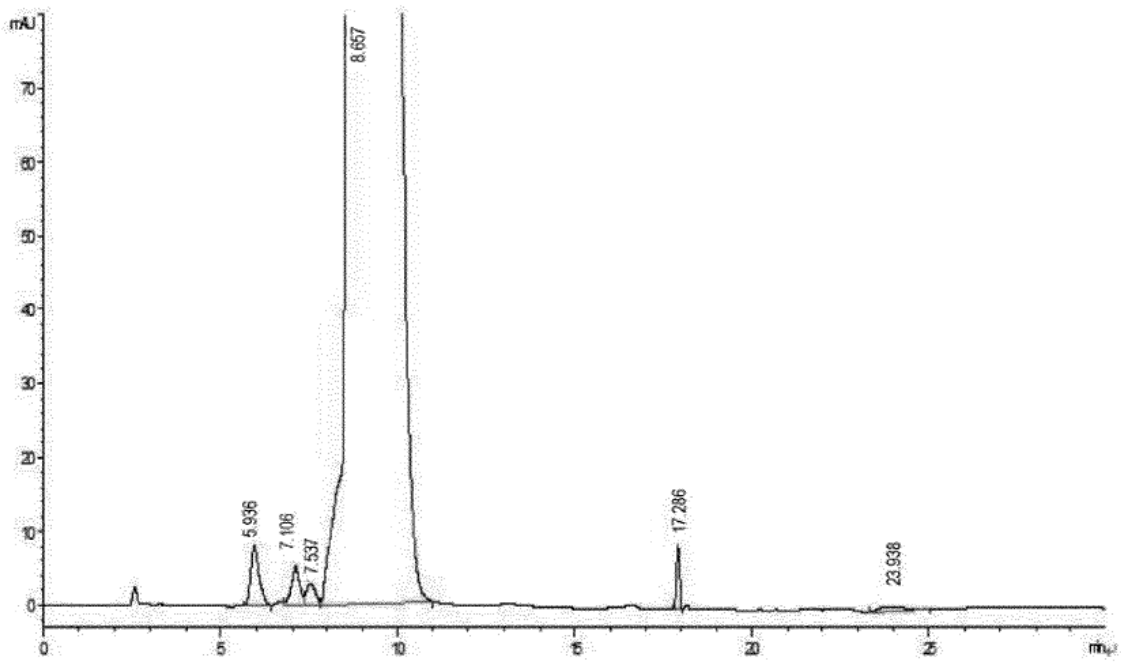


Figura 3

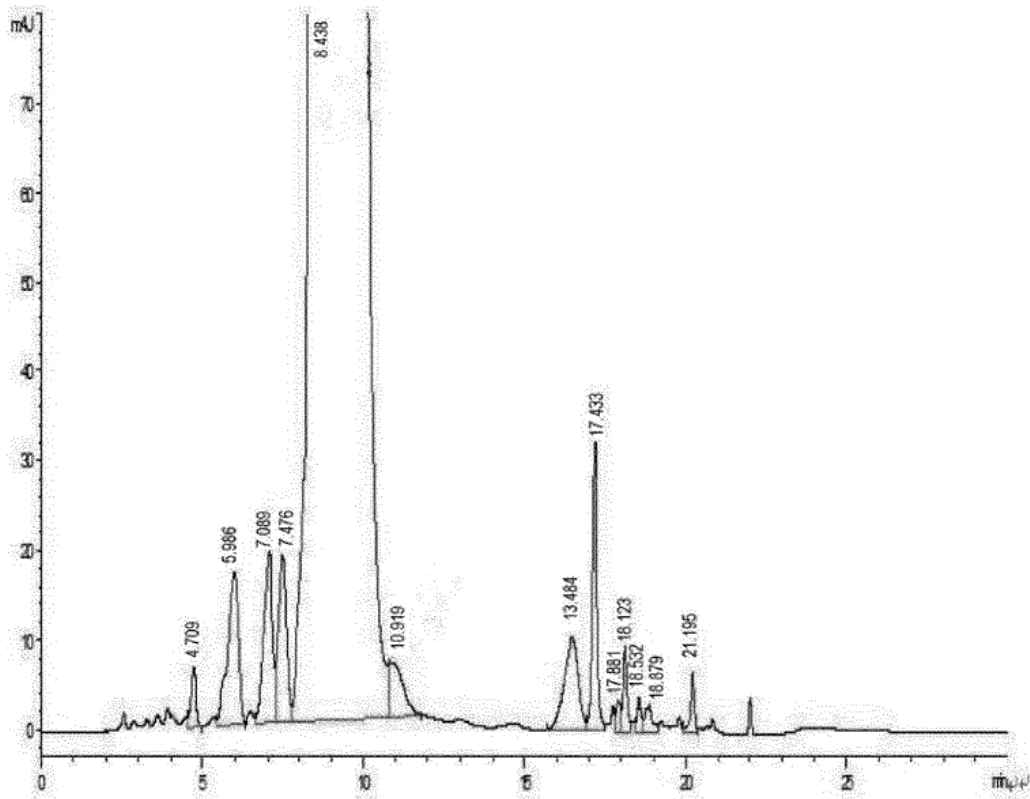


Figura 4

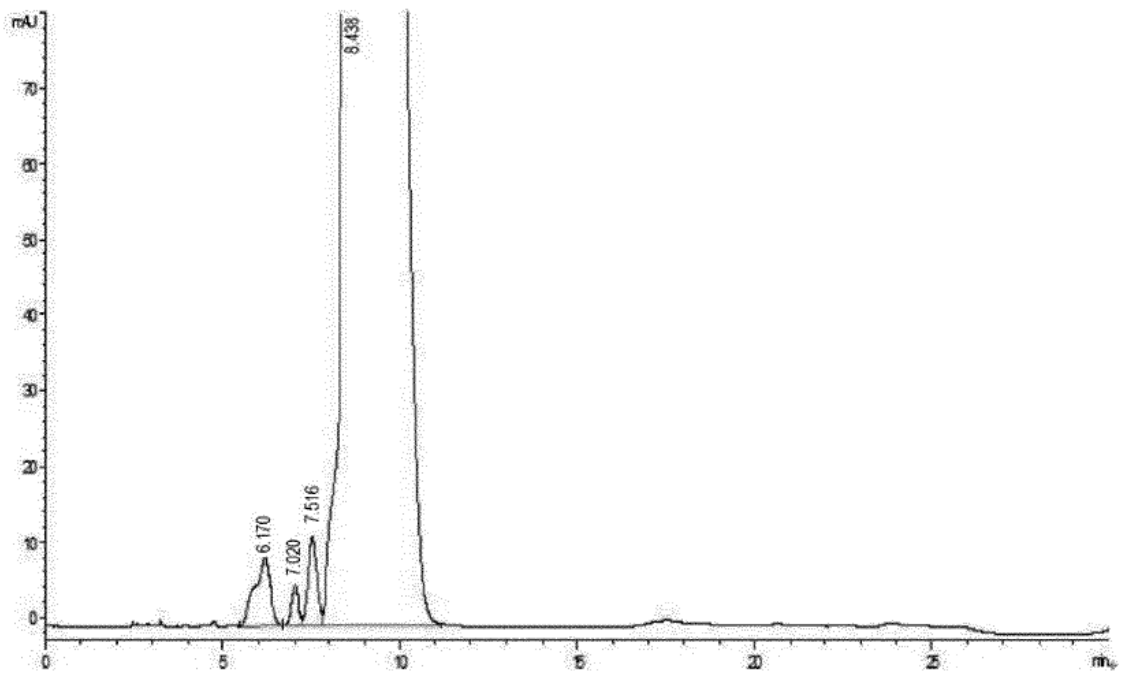


Figura 5

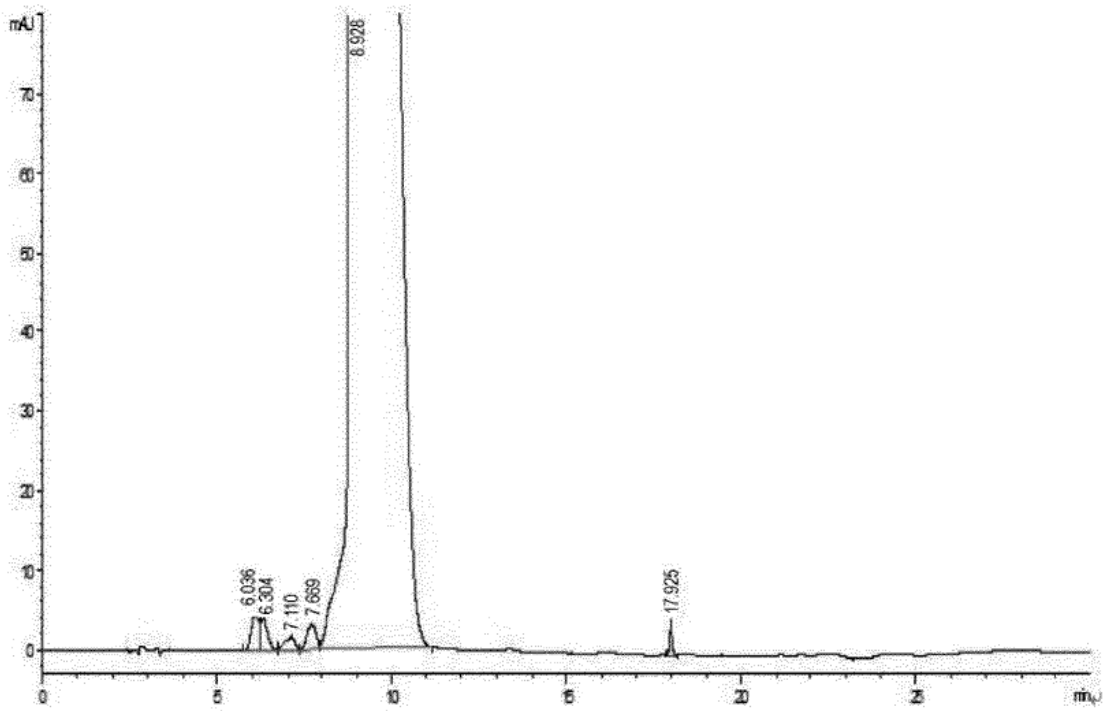


Figura 6

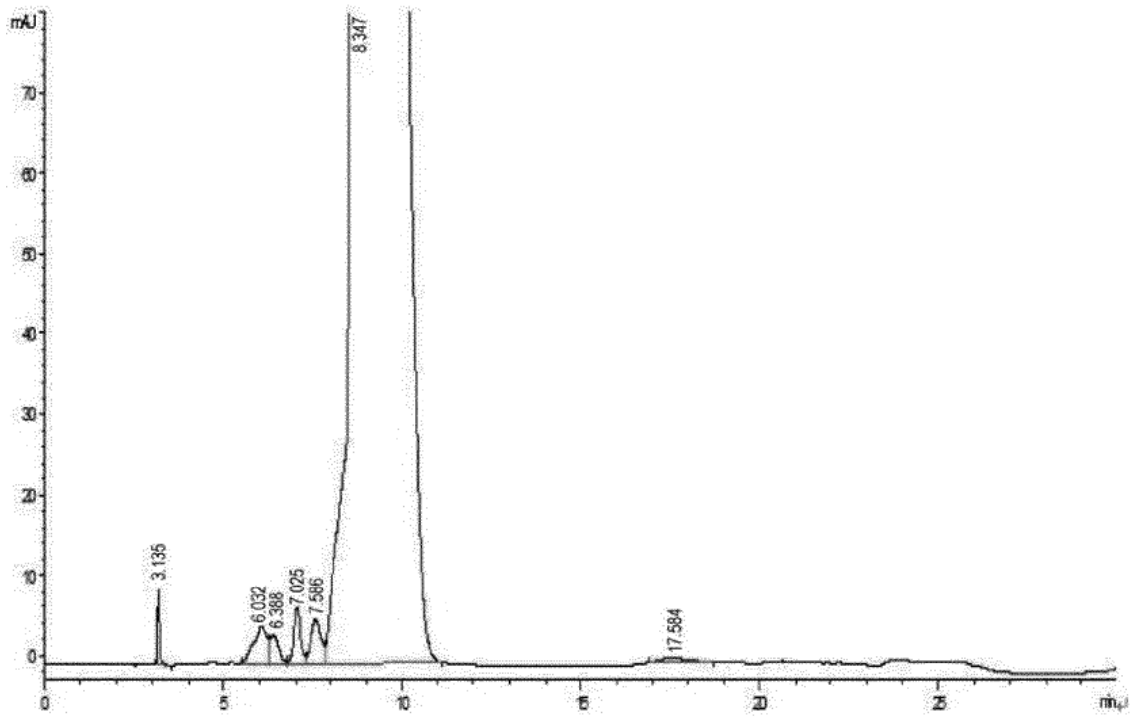


Figura 7

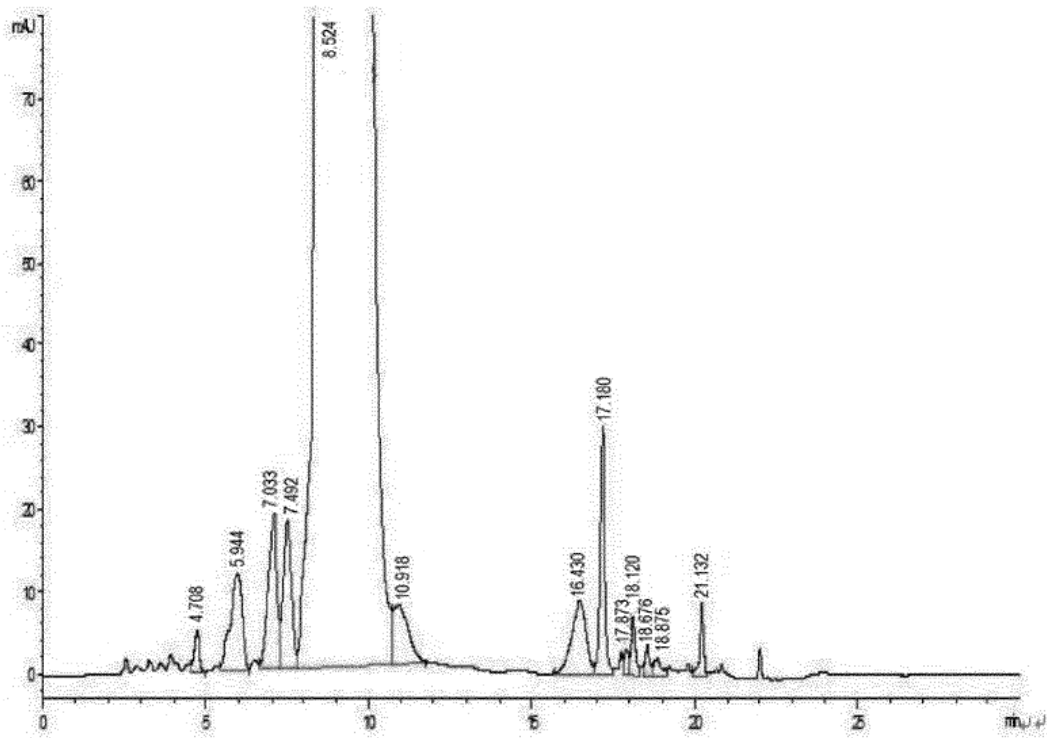


Figura 8

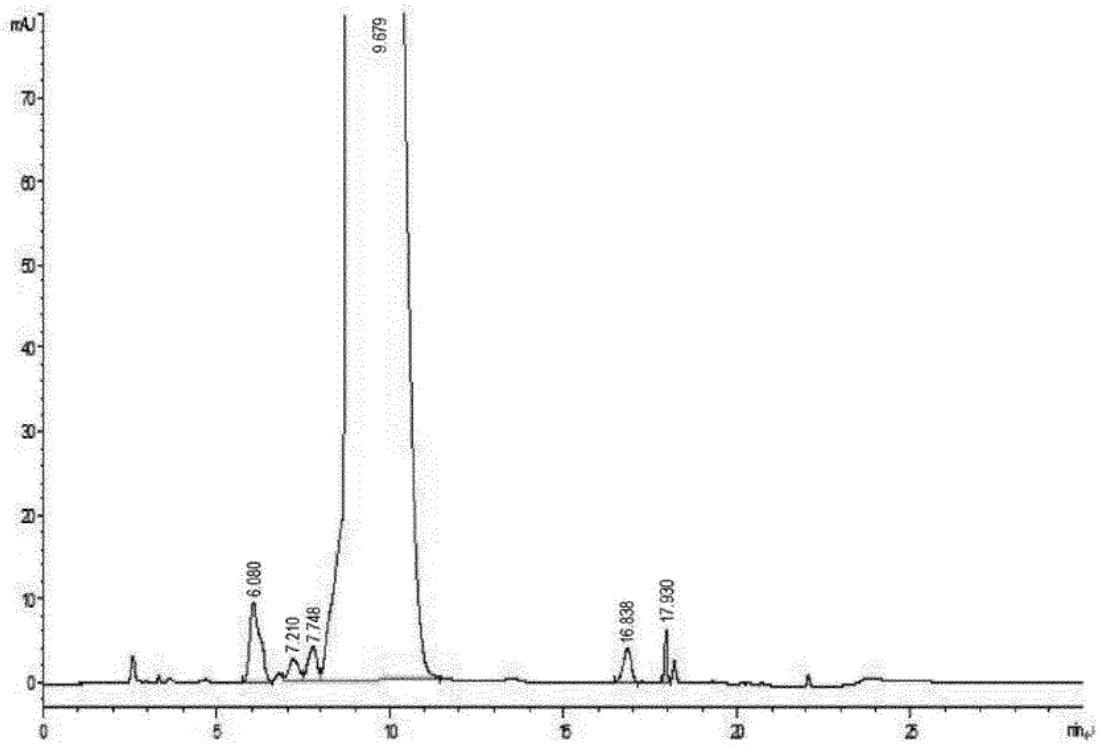


Figura 9

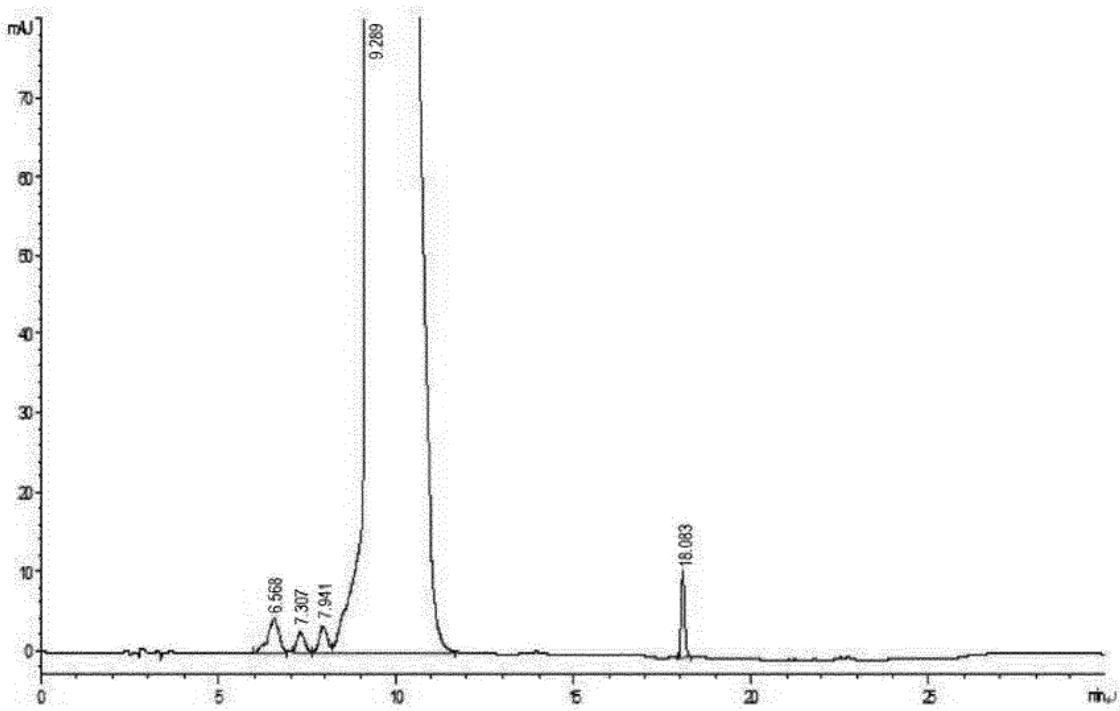


Figura 10

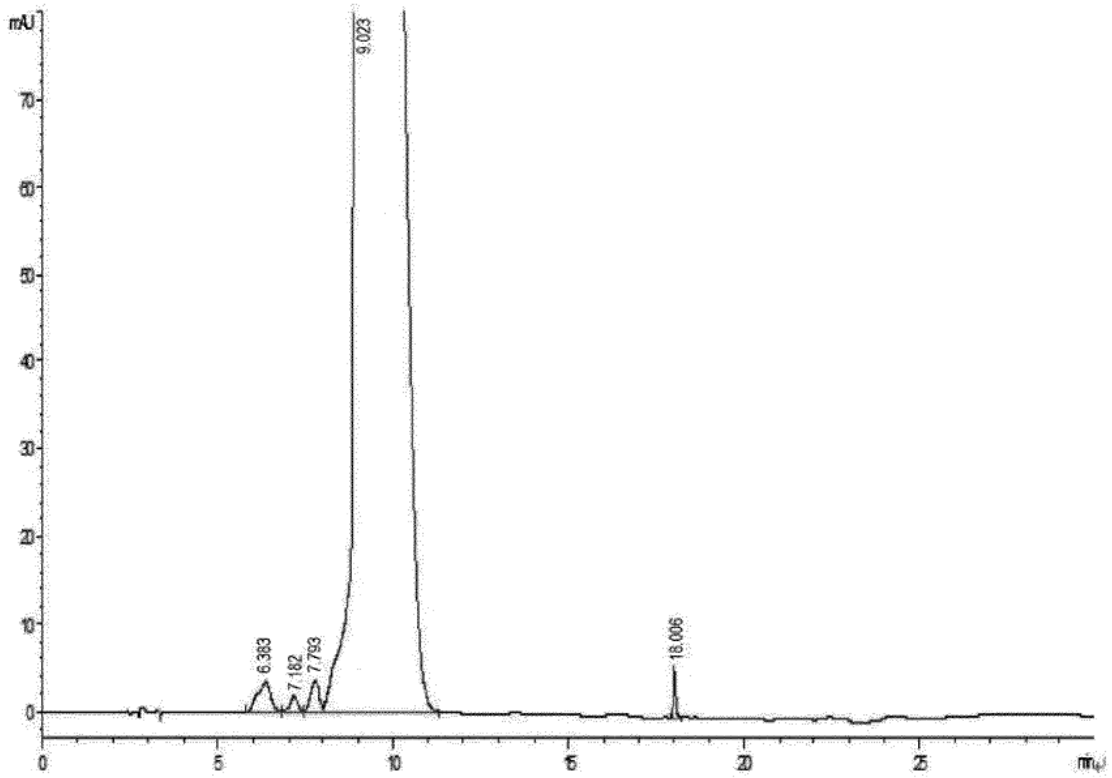


Figura 11