

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 928**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/14** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2008 E 08830916 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2195004**

54 Título: **Método para inhibir Clostridium difficile mediante la administración de oritavancina**

30 Prioridad:

**12.09.2007 US 971766 P**

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

**19.05.2015**

73 Titular/es:

**THE MEDICINES COMPANY (100.0%)  
8 Sylvan Way  
Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**WILCOX, MARK HARVEY;  
BAINES, SIMON;  
LEHOUX, DARIO y  
PARR, THOMAS R.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 535 928 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

Método para inhibir *Clostridium difficile* mediante la administración de oritavancina

**Antecedentes de la invención**

5 La infección por *Clostridium difficile* es una pesada carga en la asistencia sanitaria. Es una importante causa de morbilidad en las personas mayores hospitalizadas y está casi exclusivamente asociada con una terapia antimicrobiana. La gravedad de la infección por *C. difficile* (CDI; del inglés, *Clostridium difficile* infection) puede variar de una diarrea/colitis benignas asociadas con antibióticos a una colitis pseudomembranosa que pone en riesgo la vida [S. P. Borriello, 1998, *J. Antimicrob. Chemother.* 41 (Suppl. C), 13-19]. Las estrategias de tratamiento para la CDI han cambiado poco a lo largo de los dos últimos decenios: se emplea muy comúnmente metronidazol (250-500 mg, tres o cuatro veces al día) o vancomicina (125 mg, cuatro veces al día) orales para tratar la CDI [M. H. Wilcox, 1998, *J. Antimicrob. Chemother.* 41 (Suppl. C), 41-46; véase también la página web [postgradmed.com/issues/2002/11\\_02/joyce3.htm](http://postgradmed.com/issues/2002/11_02/joyce3.htm)].

10 La bacteria *C. difficile* esporula para formar esporas bacterianas que son resistentes a situaciones extremas de calor, radiación, agresión química, desecación y tiempo (A. I. Aronson y P. Fitz-James, 1976, *Bacteriol. Rev.* 40, 360-402). Se sabe que las esporas de *C. difficile* sobreviven en el entorno nosocomial y se cree que desempeñan un papel en la transmisión del organismo. Además, las esporas de *C. difficile* son resistentes a la terapia antimicrobiana [incluyendo los tratamientos con metronidazol (MET) y vancomicina (VAN)] y pueden desempeñar un papel en la CDI recurrente después de la cesación de la administración del antibiótico utilizado para tratar un episodio inicial (B. A. Walters, 1983, *Gut* 24, 206-212). Sin embargo, en pocos estudios se ha evaluado la actividad antimicrobiana contra esporas de *C. difficile*, y la necesidad de terapias que puedan ser empleadas para matar, o bloquear la germinación de, las esporas de *C. difficile* es grande.

**Breve resumen de la invención**

25 Como se describe en esta memoria, se ha descubierto que el antibiótico glicopeptídico oritavancina, también conocido en la técnica y citado en esta memoria como N<sup>DISACC</sup>-(4-(4-clorofenil)encil)A82846B y LY333328, presenta una significativa actividad tanto contra una forma vegetativa de *C. difficile* como contra esporas de *C. difficile*. Los resultados de los experimentos descritos en esta memoria demuestran que antibióticos glicopeptídicos, tal como oritavancina (o sus sales, hidratos o solvatos farmacéuticamente aceptables, o una mezcla de los mismos), serán eficaces en el tratamiento, la profilaxis y/o la prevención de una enfermedad causada por *C. difficile* en animales, incluyendo los seres humanos.

30 La invención es definida por las reivindicaciones.

**Inhibición del crecimiento de *C. difficile***

35 La descripción se dirige, en general, a métodos para inhibir el crecimiento de bacterias *C. difficile* *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*, que comprenden poner las bacterias *C. difficile* en contacto con un antibiótico glicopeptídico en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de las bacterias *C. difficile*. Las bacterias *C. difficile* pueden estar en forma de una célula vegetativa, una espora o una mezcla de ambas. El antibiótico glicopeptídico puede estar en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos.

40 La descripción también se dirige a un método para inhibir la activación de una espora de *C. difficile*, sea *in vitro*, *in vivo* o de ambas formas, que comprende poner una espora de *C. difficile* en contacto con un antibiótico glicopeptídico en una cantidad suficiente para inhibir la activación de una espora de *C. difficile*. El antibiótico glicopeptídico puede estar en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos.

45 La descripción se dirige además a un método para inhibir la germinación de una espora de *C. difficile*, sea *in vitro*, *in vivo* o de ambas formas, que comprende poner una espora de *C. difficile* en contacto con un antibiótico glicopeptídico en una cantidad suficiente para inhibir la germinación de una espora de *C. difficile*. El antibiótico glicopeptídico puede estar en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos.

50 La descripción se dirige además a un método para inhibir el desarrollo de una espora de *C. difficile*, sea *in vitro*, *in vivo* o de ambas formas, que comprende poner una espora de *C. difficile* en contacto con un antibiótico glicopeptídico en una cantidad suficiente para inhibir el desarrollo de una espora de *C. difficile*. El antibiótico glicopeptídico puede estar en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos.

vivo o de ambas formas, que comprende poner una espora de *C. difficile* en contacto con un antibiótico glicopeptídico en una cantidad suficiente para inhibir el desarrollo de una espora de *C. difficile*. El antibiótico glicopeptídico puede estar en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos.

Además, la descripción se dirige a un método para inhibir el crecimiento de una forma vegetativa de *C. difficile*, sea *in vitro*, *in vivo* o de ambas formas, que comprende poner una forma vegetativa de *C. difficile* en contacto con un antibiótico glicopeptídico en una cantidad suficiente para inhibir una forma vegetativa de *C. difficile*. El antibiótico glicopeptídico puede estar en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos.

La descripción se dirige a un método para inhibir la esporulación de *C. difficile*, sea *in vitro*, *in vivo* o de ambas formas, que comprende poner una forma vegetativa de *C. difficile* en contacto con un antibiótico glicopeptídico en una cantidad suficiente para inhibir la esporulación de *C. difficile*. El antibiótico glicopeptídico puede estar en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos.

#### Tratamiento de infecciones por *C. difficile*

La descripción se dirige, en general, a métodos para tratar una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico glicopeptídico a un sujeto que tiene una infección por *C. difficile*. Preferiblemente, la bacteria *C. difficile* está en forma de una célula vegetativa, una espora o una mezcla de ambas. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, la administración es por medio de administración intravenosa o administración oral.

La descripción también se dirige a un método para tratar una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico glicopeptídico a un sujeto que tiene una infección por *C. difficile*, en donde dicho tratamiento inhibe la activación de una espora de *C. difficile*. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, la administración es por medio de administración intravenosa o administración oral.

La descripción se dirige además a un método para tratar una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico glicopeptídico a un sujeto que tiene una infección por *C. difficile*, en donde dicho tratamiento inhibe la germinación de una espora de *C. difficile*. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, la administración es por medio de administración intravenosa o administración oral.

La descripción se dirige además a un método para tratar una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico glicopeptídico a un sujeto que tiene una infección por *C. difficile*, en donde dicho tratamiento inhibe el desarrollo de una espora de *C. difficile*. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, la administración es por medio de administración intravenosa o administración oral.

Además, la descripción se dirige a un método para tratar una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico glicopeptídico a un sujeto que tiene una infección por *C. difficile*, en donde dicho tratamiento inhibe el crecimiento de una forma vegetativa de *C. difficile*. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, la administración es por medio de administración intravenosa o

administración oral.

- Además, la descripción se dirige a un método para tratar una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico glicopeptídico a un sujeto que tiene una infección por *C. difficile*, en donde dicho tratamiento inhibe la esporulación de *C. difficile*. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, la administración es por medio de administración intravenosa o administración oral.

Prevención de infecciones por *C. difficile*

- La descripción se dirige, en general, a métodos para prevenir una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprenden administrar una cantidad de un antibiótico glicopeptídico suficiente para prevenir una infección por *C. difficile* a un sujeto que presenta riesgo de infección por *C. difficile*. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, la administración es por medio de administración intravenosa o administración oral.

Profilaxis de infecciones por *C. difficile*

- La descripción se dirige, en general, a métodos para proporcionar la profilaxis de una infección por *C. difficile* en un sujeto, que comprenden administrar una cantidad de un antibiótico glicopeptídico suficiente para alcanzar la profilaxis de una infección por *C. difficile* a un sujeto que tiene una infección por *C. difficile*. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, la administración es por medio de administración intravenosa o administración oral.

- La presente descripción incluye un antibiótico glicopeptídico, preferiblemente oritavancina o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso como un tratamiento médico en el tratamiento, la profilaxis y/o la prevención de una infección por *C. difficile* en un sujeto.

- La presente descripción también incluye el uso de un antibiótico glicopeptídico en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, la profilaxis y/o la prevención de una infección por *C. difficile* en un sujeto. Preferiblemente, dicho antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos.

La presente descripción incluye un kit que comprende la composición farmacéutica o un antibiótico glicopeptídico de la presente invención e instrucciones escritas para su uso en el tratamiento, la profilaxis y/o la prevención de una infección por *C. difficile*, en un recipiente adecuado.

### 35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de un análisis del punto final en gradiente en espiral para determinación de la MIC.

La Figura 2 muestra la media geométrica ( $\pm$  error estándar) de MICs de oritavancina (ORI) para cultivos vegetativos (V) y esporas (SP; del inglés, spores) de *C. difficile* mediante un análisis del punto final en gradiente en espiral.

- La Figura 3 muestra el porcentaje de recuperación ( $\pm$  intervalo) de esporas de *C. difficile* expuestas durante 1 o 30 minutos a concentraciones *in vivo* de metronidazol (MET), vancomicina (VAN), ORI, agua desionizada (C) o Tween 80 (P-80).

La Figura 4 muestra a) esporas claras en fase, b) esporas oscuras en fase, c) espora en desarrollo y d) célula vegetativa de *C. difficile* bajo microscopía de contraste de fases (aumento x100).

- La Figura 5 muestra el porcentaje de recuperación ( $\pm$  intervalo) de esporas claras en fase (PB; del inglés, phase-bright), esporas oscuras en fase (PD; del inglés, phase-dark) y células vegetativas (V) de *C. difficile* de ribotipo PCR 027 expuestas a 10 mg/l de oritavancina (ORI) frente a las no expuestas a agente antimicrobiano (C).

La Figura 6 muestra el porcentaje de recuperación de esporas de *C. difficile* expuestas a metronidazol (MET),

vancomicina (VAN) u oritavancina (ORI) durante un periodo muy corto de tiempo (1 min; gris claro) o 30 minutos (30 min; gris oscuro), frente a testigos expuestos a agua sola (C) o agua y Tween 80 (P80). Se examinaron tres cepas de esporas de *C. difficile* (ribotipos 001, 106 y 027 por PCR). Se añadió diluyente a las cúpulas de filtración después de la adición de las disoluciones de reacción.

5 La Figura 7 muestra el porcentaje de recuperación de esporas de *C. difficile* expuestas a metronidazol (MET), vancomicina (VAN) u oritavancina (ORI) durante un periodo muy corto de tiempo (1 min; gris claro) o 30 minutos (30 min; gris oscuro), frente a testigos expuestos a agua sola (C) o agua y Tween 80 (P80). Se examinaron tres cepas de esporas de *C. difficile* (ribotipos 001, 106 y 027 por PCR). Se añadió diluyente a las cúpulas de filtración antes de la adición de las disoluciones de reacción.

10 La Figura 8 muestra la media (+ error estándar) de las cuentas viables ( $\log_{10}$  cfu/ml) de microflora intestinal nativa cultivable en el recipiente 3 de modelos de intestino con (a) oritavancina y (b) vancomicina. Las líneas verticales indican el día final de cada período experimental. Las líneas horizontales discontinuas indican el límite de detección para el cultivo bacteriano.

15 La Figura 9 muestra la media (+ error estándar) de las cuentas totales ( $\log_{10}$  cfu/ml), las cuentas de esporas ( $\log_{10}$  cfu/ml) y los títulos de citotoxina (RU) de *C. difficile* de ribotipo PCR 027 y las concentraciones de agente antimicrobiano (mg/l) en experimentos con (a) oritavancina (ORI) y (b) vancomicina (VAN) en el recipiente 3 del modelo de intestino. Las líneas horizontales discontinuas indican el límite de detección para el cultivo bacteriano.

20 La Figura 10 muestra los resultados gráficos de una determinación de la eficacia de un régimen de múltiples dosis de oritavancina en comparación con vancomicina en el modelo de CDI en hámster. Se trataron intravenosamente hámsteres (n = 10/grupo) con oritavancina o vancomicina en diferentes regímenes de administración. Se inyectó intravenosamente un total de 1, 2 o 3 dosis cada 2 días a lo largo de 5 días.  $\blacklozenge$ , no tratado;  $\blacksquare$ , una dosis de 50 mg/kg de oritavancina (Día 1);  $\blacktriangle$ , dos dosis de 50 mg/kg de oritavancina cada dos días (Días 1 y 3);  $\blacklozenge$ , tres dosis de 50 mg/kg de oritavancina cada dos días (Días 1, 3 y 5);  $\blacksquare$ , tres dosis de 50 mg/kg de vancomicina cada dos días (Días 1, 3 y 5); CL, inyección de clindamicina (100 mg/kg, subcutánea); CD, infección con *C. difficile* por introducción oral en el estómago con un tubo; Tx, inyección de antibióticos; ORI, oritavancina; Vanco, vancomicina.

La Figura 11A muestra la validación del modelo de CDI en hámster.

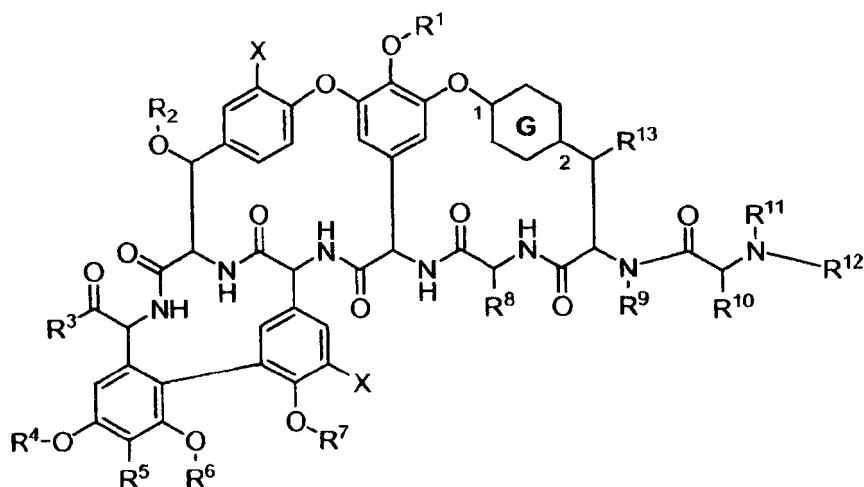
La Figura 11B muestra la eficacia de ORI formulada en HPCD en comparación con VA en el modelo de CDI en hámster.

30 La Figura 11C muestra la eficacia de ORI formulada en PEG400 en comparación con VA en el modelo de CDI en hámster.

La Figura 11D muestra las cuentas viables totales (TC; del inglés, total counts) y las cuentas de esporas de CD en contenidos cecales de hámster.

### Descripción detallada de la invención

Los antibióticos glicopeptídicos de la presente descripción incluyen aquellos de Fórmula I:



35

así como sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, y mezclas de los mismos, en donde:

- 5  $R^1$  es uno de entre hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo, compuesto heterocíclico y  $-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ; o  $R^1$  es un grupo sacárido opcionalmente sustituido con  $-R^a-R^b-(Z)_x$ ,  $-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ,  $R^f$ ,  $-C(O)R^f$ , o  $-C(O)-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ;
- $R^2$  es hidrógeno o un grupo sacárido opcionalmente sustituido con  $-R^a-R^b-(Z)_x$ ,  $-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ,  $R^f$ ,  $-C(O)R^f$ , o  $-C(O)-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ;
- 10  $R^3$  es  $-OR^c$ ,  $-NR^cR^c$ ,  $-O-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ,  $-NR^c-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ,  $-NR^cR^e$ , u  $-O-R^e$ ;
- $R^4$  es seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido,  $-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ,  $-C(O)R^d$  y un grupo sacárido opcionalmente sustituido con  $-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ,  $R^f$ , o  $-C(O)-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ , o  $R^4$  y  $R^5$  pueden estar unidos, junto con los átomos a los que están fijados, para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido con  $-NR^c-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ;
- 15  $R^5$  es seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, halo,  $-CH(R^c)-NR^cR^c$ ,  $-CH(R^c)-NR^cR^e$ ,  $-CH(R^c)-NR^c-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ,  $-CH(R^c)-R^x$ , y  $-CH(R^c)-NR^c-R^a-C(O)-R^x$ ;
- $R^6$  es seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido,  $-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ,  $-C(O)R^d$  y un grupo sacárido opcionalmente sustituido con  $-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ,  $R^f$ ,  $-C(O)R^f$ , o  $-C(O)-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ , o  $R^5$  y  $R^6$  pueden estar unidos, junto con los átomos a los que están fijados, para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido con  $-NR^c-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ;
- 20  $R^7$  es seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido,  $-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ , y  $-C(O)R^d$ ;
- $R^8$  es seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo, compuesto heterocíclico y  $-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ ;
- 25  $R^9$  es seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo y compuesto heterocíclico;
- $R^{10}$  es seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo y compuesto heterocíclico; o  $R^8$  y  $R^{10}$  están unidos para formar  $-Ar^1-O-Ar^2-$ , donde  $Ar^1$  y  $Ar^2$  son independientemente arileno o heteroarileno;
- 30  $R^{11}$  es seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo y compuesto heterocíclico, o  $R^{10}$  y  $R^{11}$  están unidos, junto con los átomos de carbono y nitrógeno a los que están fijados, para formar un anillo heterocíclico;
- 35  $R^{12}$  es seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo, compuesto heterocíclico,  $-C(O)R^d$ ,  $-C(NH)R^d$ ,  $-C(O)NR^cR^c$ ,  $-C(O)OR^d$ ,  $-C(NH)NR^cR^c$ ,  $-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ , y  $-C(O)-R^a-Y-R^b-(Z)_x$ , o  $R^{11}$  y  $R^{12}$  están unidos, junto con el átomo de nitrógeno al que están fijados, para formar un anillo heterocíclico;
- 40  $R^{13}$  es seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno y  $-OR^{14}$ ;
- $R^{14}$  es seleccionado de entre hidrógeno,  $-C(O)R^d$  y un grupo sacárido;
- 45 cada  $R^a$  es independientemente seleccionado del grupo que consiste en alquileno, alquileno sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, alquinileno y alquinileno sustituido;
- cada  $R^b$  es independientemente seleccionado del grupo que consiste en un enlace covalente, arileno, alquileno, alquileno sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, alquinileno y alquinileno sustituido;

cada R<sup>c</sup> es independientemente seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo, compuesto heterocíclico y -C(O)R<sup>d</sup>;

5 cada R<sup>d</sup> es independientemente seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo y compuesto heterocíclico;

cada R<sup>e</sup> es un grupo sacárido;

10 cada R<sup>f</sup> es independientemente alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo o compuesto heterocíclico;

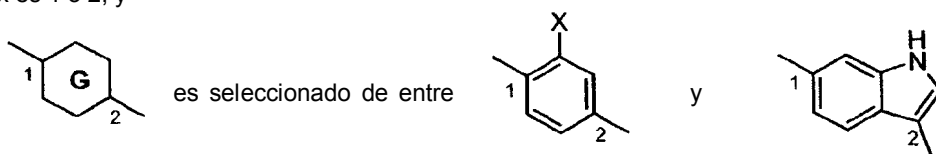
R<sup>x</sup> es un aminosacárido enlazado por N o un heterociclo enlazado por N;

cada X es independientemente seleccionado de entre hidrógeno, fluoro, cloro, bromo y yodo;

15 cada Y es independientemente seleccionado del grupo que consiste en -CH<sub>2</sub>-, oxígeno, azufre, -S-S-, -NR<sup>c</sup>-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -NR<sup>c</sup>C(O)-, -OSO<sub>2</sub>-, -OC(O)-, -N(R<sup>c</sup>)SO<sub>2</sub>-, -C(O)NR<sup>c</sup>-, -C(O)O-, -SO<sub>2</sub>NR<sup>c</sup>-, -SO<sub>2</sub>O-, -P(O)(OR<sup>c</sup>)O-, -P(O)(OR<sup>c</sup>)NR<sup>c</sup>-, -OP(O)(OR<sup>c</sup>)O-, -OP(O)(OR<sup>c</sup>)NR<sup>c</sup>-, -OC(O)O-, -NR<sup>c</sup>C(O)O-, -NR<sup>c</sup>C(O)NR<sup>c</sup>-, -OC(O)NR<sup>c</sup>-, -C(O)-, y -N(R<sup>c</sup>)SO<sub>2</sub>NR<sup>c</sup>-;

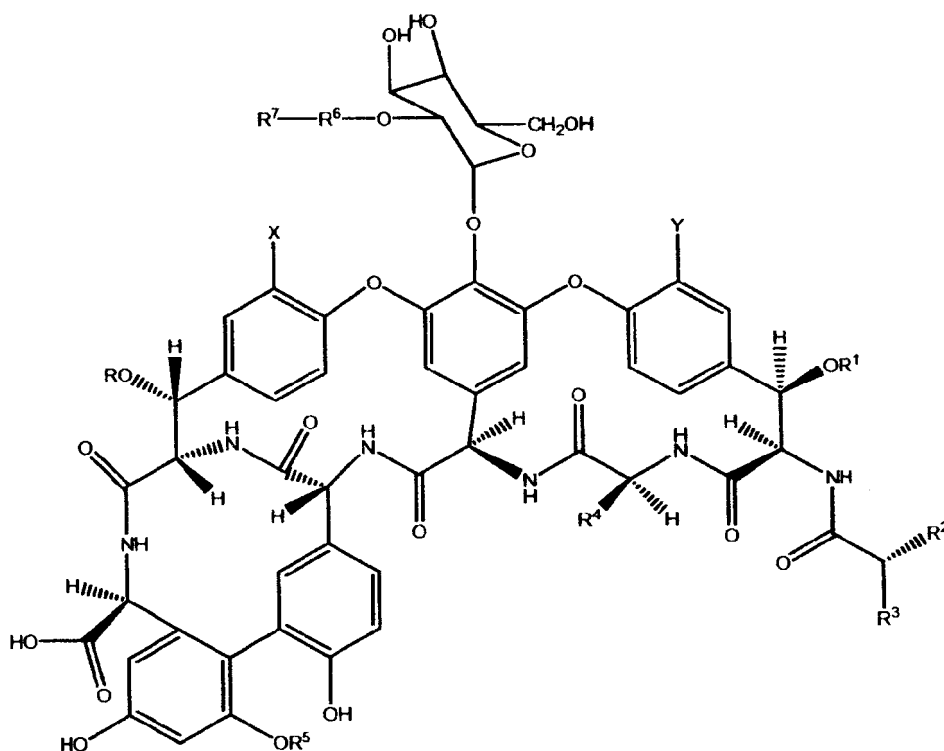
cada Z es independientemente seleccionado de entre hidrógeno, arilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heteroarilo, compuesto heterocíclico y un sacárido;

x es 1 o 2; y



En particular, los antibióticos glicopeptídicos de Fórmula I incluyen teicoplanina, dalbavancina y telavancina.

Los antibióticos glicopeptídicos de la presente descripción también incluyen aquellos de Fórmula II:



Fórmula II

así como sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, y mezclas de los mismos, en donde:

5 cada uno de X e Y es independientemente hidrógeno o cloro;

R es hidrógeno, 4-epi-vancosaminilo, actinosaminilo, ristosaminilo, o un grupo de fórmula  $-R^a-R^{7a}$ , en donde  $R^a$  es 4-epi-vancosaminilo, actinosaminilo o ristosaminilo, y  $R^{7a}$ , definido más adelante, está unido al grupo amino de  $R^a$ ;

$R^1$  es hidrógeno o manosa;

$R^2$  es  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{NHR}^{7b}$  o  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{R}^{7b}$ , en donde  $R^{7b}$  se define más adelante;

10  $R^3$  es  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , [p-OH, m-Cl]fenil, p-ramnosiloxifenil, p-(ramnosil-galactosiloxi)-fenil, [p-galactosa-galactosa]fenil, p-(metoxiramnosiloxi)fenil o p-metoxi-ramnosiloxifenil;

$R^4$  es  $-\text{CH}_2(\text{CO})\text{NH}_2$ , bencil, [p-OH]fenil o [p-OH, m-Cl]fenil;

$R^5$  es hidrógeno o manosa;

$R^6$  es 4-epi-vancosaminil, L-acosaminil, L-ristosaminil o L-actinosaminil;

15  $R^7$ , como se define más adelante, está unido al grupo amino de  $R^6$ ; y

cada uno de  $R^7$ ,  $R^{7a}$  y  $R^{7b}$  es independientemente seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>), alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-R<sup>8</sup>, (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-halo, (alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-R<sup>8</sup>, (alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-R<sup>8</sup> y (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-O-R<sup>8</sup>, con tal de que  $R^7$ ,  $R^{7a}$  y  $R^{7b}$  no sean todos hidrógeno, y R<sup>8</sup> es seleccionado del grupo que consiste en:

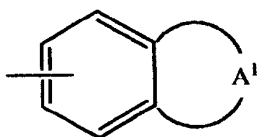
20 a) arilo multicíclico no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en:

(i) hidroxilo,

(ii) halo,



- (iii) nitro,
- (iv) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
- (v) alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),
- (vi) alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),
- 5 (vii) alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
- (viii) halo-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
- (ix) halo-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
- (x) carbo-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
- (xi) carbobenciloxilo,
- 10 (xii) carbobenciloxilo sustituido con alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), halo o nitro,
- (xiii) un grupo de fórmula -S(O)<sub>n</sub>-R<sup>9</sup>, en donde n' es 0-2 y R<sup>9</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilo o fenilo sustituido con alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), halo o nitro; y
- (xiv) un grupo de fórmula -C(O)N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub> en donde cada sustituyente R<sup>10</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilo o fenilo sustituido con alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), halo o nitro;
- 15 b) heteroarilo no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en:
  - (i) halo,
  - (ii) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
  - (iii) alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
  - 20 (iv) halo-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
  - (v) halo-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
  - (vi) fenilo,
  - (vii) tiofenilo,
  - (viii) fenilo sustituido con halo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o nitro,
  - 25 (ix) carbo-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),
  - (x) carbobenciloxilo,
  - (xi) carbobenciloxilo sustituido con alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), halo o nitro,
  - (xii) un grupo de fórmula -S(O)<sub>n</sub>-R<sup>9</sup>, como se definió anteriormente,
  - (xiii) un grupo de fórmula -C(O)N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, como se definió anteriormente, y
  - 30 (xiv) tienilo;
- c) un grupo de fórmula:



en donde A<sup>1</sup> es -OC(A<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-C(A<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-O-, -O-C(A<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-O-, -C(A<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-O-, o -C(A<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-C(A<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-C(A<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-C(A<sup>2</sup>)<sub>2</sub>-, y cada sustituyente A<sup>2</sup>

es independientemente seleccionado de entre hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y cicloalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>),  
d) un grupo de fórmula:

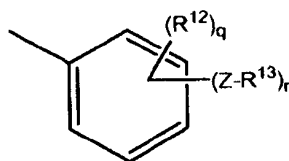


en donde p es de 1 a 5; y R<sup>11</sup> es independientemente seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (i) hidrógeno,  
(ii) nitro,  
(iii) hidroxilo,  
(iv) halo,  
(v) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>),  
10 (vi) alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>),  
(vii) alquilo (C<sub>9</sub>-C<sub>12</sub>),  
(viii) alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>),  
(ix) alcoxilo (C<sub>9</sub>-C<sub>12</sub>),  
(x) alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) sustituido con alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), hidroxilo, halo-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), o alquiltio (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),  
15 (xi) alqueniloxilo (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>),  
(xii) alquiniloxilo (C<sub>2</sub>-C<sub>13</sub>),  
(xiii) halo-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
(xiv) halo-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),  
(xv) alquiltio (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>),  
20 (xvi) alcanoiloxilo (C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>),  
(xvii) carboxi-alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>),  
(xviii) alquilsulfoniloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
(xix) carboxi-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
(xx) N-[di-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)]amino-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>),  
25 (xxi) ciano-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), y  
(xxii) difenil-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>),

con la condición de que, cuando R<sup>11</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) o halo, p debe ser superior o igual a 2, o, cuando R<sup>7</sup> es (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)-R<sup>8</sup>, R<sup>11</sup> no es entonces hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) ni halo;

e) un grupo de fórmula:



en donde q es de 0 a 4;  $R^{12}$  es independientemente seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) halo,
- (ii) nitro,
- 5 (iii) alquilo ( $C_1-C_6$ ),
- (iv) alcoxilo ( $C_1-C_6$ ),
- (v) halo-alquilo ( $C_1-C_6$ ),
- (vi) halo-alcoxilo ( $C_1-C_6$ ),
- (vii) hidroxilo, y
- 10 (viii) tioalquilo ( $C_1-C_6$ ),

r es de 1 a 5; con tal de que la suma q + r no sea superior a 5;

Z es seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un enlace sencillo,
- (ii) alquilo ( $C_1-C_6$ ) divalente no sustituido o sustituido con hidroxilo, alquilo ( $C_1-C_6$ ) o alcoxilo ( $C_1-C_6$ ),
- 15 (iii) alqueno ( $C_2-C_6$ ) divalente,
- (iv) alquino ( $C_2-C_6$ ) divalente, y
- (v) un grupo de fórmula  $-(C(R^{14})_2)_s-R^{15}$  o  $-R^{15}-(C(R^{14})_2)_s-$ , en donde s es 0-6; en donde cada sustituyente  $R^{14}$  es independientemente seleccionado de entre hidrógeno, alquilo ( $C_1-C_6$ ) o cicloalquilo ( $C_4-C_{10}$ ); y  $R^{15}$  es seleccionado de entre -O-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>-O-, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, -NH-, -N(alquilo  $C_1-C_6$ )-, y -C(O)NH-, -NHC(O)-, N=N;
- 20

$R^{13}$  es independientemente seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) heterocicilo ( $C_4-C_{10}$ ),
- (ii) heteroarilo,
- (iii) cicloalquilo ( $C_4-C_{10}$ ) no sustituido o sustituido con alquilo ( $C_1-C_6$ ), y
- 25 (iv) fenilo no sustituido o sustituido con de 1 a 5 sustituyentes independientemente seleccionados de entre: halo, hidroxilo, nitro, alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), alcoxilo ( $C_1-C_{10}$ ), halo-alcoxilo ( $C_1-C_3$ ), halo-alquilo ( $C_1-C_3$ ), alcoxi ( $C_1-C_3$ )-fenilo, fenilo, fenil-alquilo ( $C_1-C_3$ ), alcoxi ( $C_1-C_6$ )-fenilo, fenil-alquino ( $C_2-C_3$ ) y alquil ( $C_1-C_6$ )-fenilo;

f) cicloalquilo ( $C_4-C_{10}$ ) no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en:

- 30 (i) alquilo ( $C_1-C_6$ ),
- (ii) alcoxilo ( $C_1-C_6$ ),
- (iii) alqueno ( $C_2-C_6$ ),
- (iv) alquino ( $C_2-C_6$ ),

(v) cicloalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>),

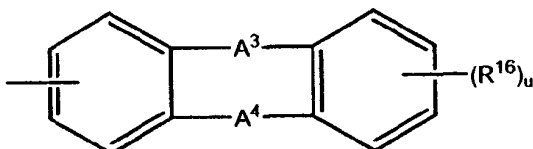
(vi) fenilo,

(vii) feniltio,

(viii) fenilo sustituido con nitro, halo, alcanoiloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o carbocicloalcoxilo, y

5 (ix) un grupo representado por la fórmula -Z-R<sup>13</sup>, en donde Z y R<sup>13</sup> son como se definieron anteriormente; y

g) un grupo de fórmula:



en donde cada uno de A<sup>3</sup> y A<sup>4</sup> es independientemente seleccionado de entre:

(i) un enlace,

10 (ii) -O-,

(iii) -S(O)<sub>t</sub>-, en donde t es de 0 a 2,

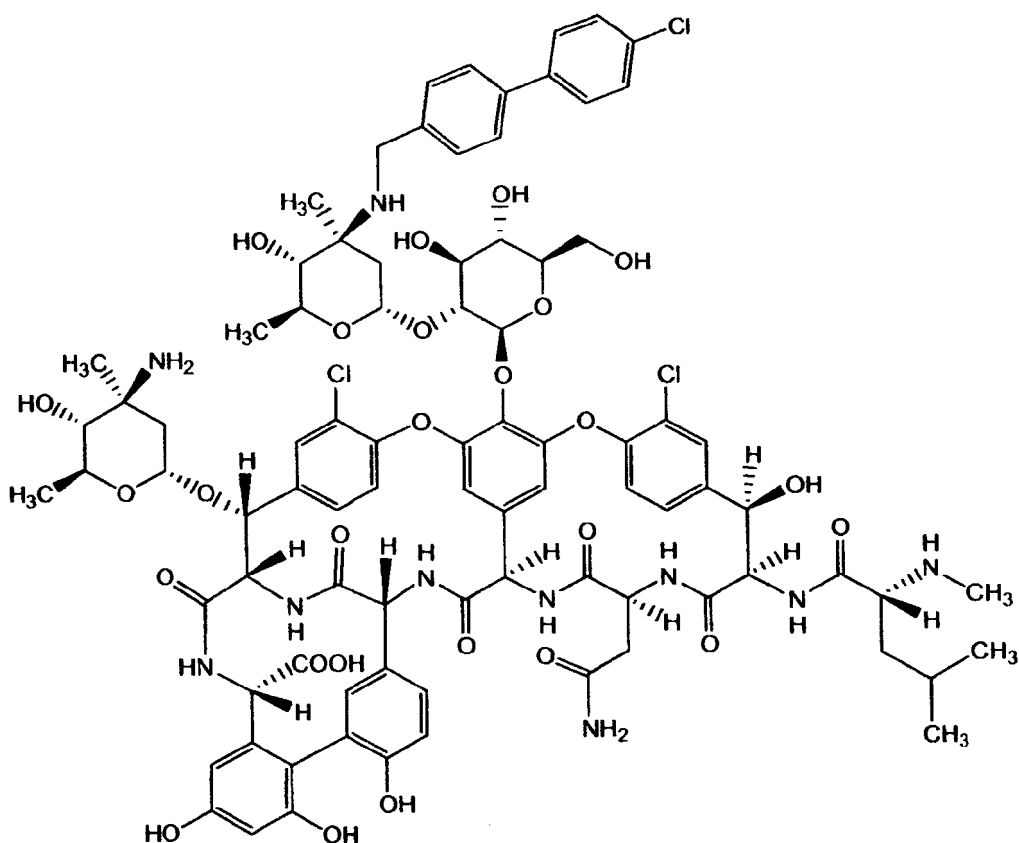
(iv) -C(R<sup>17</sup>)<sub>2</sub>-, en donde cada sustituyente R<sup>17</sup> es independientemente seleccionado de entre hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), o ambos sustituyentes R<sup>17</sup> conjuntamente tomados son O, y

15 (v) -N(R<sup>18</sup>)<sub>2</sub>-, en donde cada sustituyente R<sup>18</sup> es independientemente seleccionado de entre hidrógeno; alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>); alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>); cicloalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>); fenilo; fenilo sustituido con nitro, halo o alcanoiloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); o ambos sustituyentes R<sup>18</sup> conjuntamente tomados son cicloalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>);

R<sup>16</sup> es R<sup>12</sup> o R<sup>13</sup>, como se definieron anteriormente; y u es 0-4.

Los antibióticos glicopeptídicos de la presente descripción incluyen cada uno de los descritos en la Patente de EE.UU. n° 5.840.684.

20 La oritavancina [también denominada N-(4-(4-clorofenil)bencil)A82846B y LY333328] tiene la Fórmula III siguiente:



Fórmula III

5 Los sustituyentes alquilo citados en esta memoria significan hidrocarburos sustituidos o no sustituidos, de cadena lineal o ramificada con la longitud especificada. El término "alquenilo" se refiere a una cadena alquénica sustituida o no sustituida, lineal o ramificada, de la longitud especificada en esta memoria. El término "alquinilo" se refiere a una cadena alquínica sustituida o no sustituida, lineal o ramificada, de la longitud especificada en esta memoria.

Los sustituyentes alcoxilo citados en esta memoria representan un grupo alquilo fijado a través de un puente de oxígeno. El término "alquenoxilo" representa una cadena alquénica de la longitud especificada, fijada a un átomo de oxígeno.

10 La expresión "arilo multicíclico" significa un anillo bicíclico fusionado orgánico de 9 a 10 miembros, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido y estable; un anillo tricíclico fusionado orgánico de 12 a 14 miembros, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido y estable; o un anillo tetracíclico fusionado orgánico de 14 a 16 miembros, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido y estable. El anillo bicíclico puede tener de 0 a 4 sustituyentes, el anillo tricíclico puede tener de 0 a 6 sustituyentes, y el anillo tetracíclico puede tener de 0 a 8 sustituyentes. Los arilos multicíclicos típicos incluyen fluorenilo, naftilo, antranilo, fenantrenilo, bifenileno y pirenilo.

15 El término "heteroarilo" representa un anillo monocíclico orgánico de 4 a 7 miembros, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido y estable que tiene un heteroátomo seleccionado de entre S, O y N; un anillo bicíclico fusionado orgánico de 9 a 10 miembros, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido y estable que tiene de 1 a 2 heteroátomos seleccionados de entre S, O y N; o un anillo tricíclico fusionado orgánico de 12 a 14 miembros, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido y estable que tiene un heteroátomo seleccionado de entre S, O y N. Los átomos de nitrógeno y azufre de estos anillos están opcionalmente oxidados, y los heteroátomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. El anillo monocíclico puede tener de 0 a 5 sustituyentes. El anillo bicíclico puede tener de 0 a 7 sustituyentes, y el anillo tricíclico puede tener de 0 a 9 sustituyentes. Los heteroarilos típicos incluyen quinoleilo, piperidilo, tienilo, piperonilo, oxafluorenilo, piridilo y benzotienilo y similares.

25 La expresión "cicloalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>)" abarca sustituyentes que tienen de cuatro a diez átomos de carbono, tales como ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo que pueden estar no sustituidos o sustituidos con sustituyentes tales

como alquilo y fenilo. Esta expresión también abarca grupos cicloalqueno de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub> tales como ciclopentenilo y ciclohexenilo. La expresión "cicloalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>)" también abarca cicloalquilos bicíclicos y tricíclicos tales como biciclopentilo, biciclohexilo, bicicloheptilo y adamantilo.

5 El término "alcanoiloxilo" representa un grupo alcanoilo fijado a través de un puente de oxígeno. Estos sustituyentes pueden ser cadenas lineales o ramificadas de la longitud especificada, sustituidas o no sustituidas.

La expresión "ciano-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)" representa una cadena alcoxílica lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, que tiene de uno a seis átomos de carbono con un resto ciano fijado a ella.

10 La expresión "alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) divalente" representa una cadena alquímica divalente lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, que tiene de uno a seis átomos de carbono. Los grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) divalentes típicos incluyen metileno, etileno, propileno, isopropileno, butileno, isobutileno, sec-butileno, t-butileno, pentileno, neo-pentileno y hexileno. Dichos grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) divalentes pueden estar sustituidos con sustituyentes tales como alquilo, alcoxilo e hidroxilo.

15 La expresión "alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) divalente" representa una cadena alquénica divalente lineal o ramificada que tiene de dos a seis átomos de carbono. Los alquenos (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) divalentes típicos incluyen etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo y similares.

La expresión "alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) divalente" representa una cadena alquínica divalente lineal o ramificada que tiene de dos a seis átomos de carbono. Los alquinos (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) divalentes típicos incluyen etinileno, 1-propinileno, 2-propinileno, 1-butinileno, 2-butinileno y similares.

El término "halo" representa cloro, fluoro, bromo o yodo.

20 La expresión "halo-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)" representa una cadena alquímica lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono con de 0 a 3 átomos de halógeno fijados a cada carbono.

Los grupos halo-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) típicos incluyen clorometilo, 2-bromoetilo, 1-cloroisopropilo, 3-fluoropropilo, 2,3-dibromobutilo, 3-cloroisobutilo, yodo-t-butilo, trifluorometilo y similares.

25 La expresión "halo-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)" representa una cadena alcoxílica lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono con de 0 a 3 átomos de halógeno fijados a cada carbono.

Los grupos halo-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) típicos incluyen clorometoxilo, 2-bromoetoxilo, 1-cloroisopropoxilo, 3-fluoropropoxilo, 2,3-dibromobutoxilo, 3-cloroisobutoxilo, yodo-t-butoxilo, trifluorometoxilo y similares.

30 El término "heterocíclico" abarca grupos saturados que tienen de tres a diez miembros anulares y cuyo anillo heterocíclico contiene un heteroátomo seleccionado de entre oxígeno, azufre y nitrógeno, ejemplos de los cuales son piperazinilo, morfolino, piperidilo, metilpiperidilo, azetidino y aziridinilo.

Los antibióticos glicopeptídicos de la presente descripción, que incluyen la oritavancina, pueden ser empleados *per se* o en forma de una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable, o de mezclas de los mismos. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales atóxicas por adición de ácido, derivadas de ácidos inorgánicos y orgánicos.

35 Los ácidos comúnmente empleados para formar sales por adición de ácido son ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenilsulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y similares. Las sales por adición de base incluyen las derivadas de bases inorgánicas, tales como hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos y similares de amonio o de metales alcalinos o alcalinotérreos. Por lo tanto, tales bases útiles para preparar las sales de esta invención incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido amónico, carbonato potásico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, bicarbonato potásico, hidróxido cálcico, carbonato cálcico y similares. Son particularmente preferidas las formas salinas de potasio y sodio.

40 Se debería reconocer que el particular contraión que forma una parte de cualquier sal de esta descripción no es de naturaleza crítica con tal de que la sal sea farmacológicamente aceptable en su totalidad y con tal de que el contraión no contribuya a la sal en su totalidad con cualidades indeseadas.

45 En, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 5.840.684 se pueden hallar medios para la preparación de los antibióticos glicopeptídicos, incluyendo oritavancina y compuestos análogos a la misma.

Los antibióticos glicopeptídicos de la presente descripción, que incluyen oritavancina, pueden ser también utilizados en forma de profármacos, tales como antibióticos glicopeptídicos que poseen al menos un resto poli(etilenglicol), como se describe en la solicitud de patente internacional PCT/US2008/057841. La presencia de un grupo poli(etilenglicol) fijado a un glicopéptido se correlaciona con una mayor solubilidad de los antibióticos glicopeptídicos en medios acuosos. La consecución de mayores concentraciones de antibióticos glicopeptídicos en medios acuosos mejora la formulación y reduce el volumen de la inyección, infusión o administración. Además, la presencia del poli(etilenglicol) permite que el antibiótico quede enmascarado durante la inyección, infusión o administración. La combinación de estos dos factores y la relativa ausencia de toxicidad asociada con el poli(etilenglicol) permiten que los efectos secundarios observados durante la administración de los antibióticos glicopeptídicos resulten disminuidos. En una realización preferida, el poli(etilenglicol) de dichos profármacos tiene un peso molecular medio de 900 g·mol<sup>-1</sup> o mayor.

Como se emplea en esta memoria, un "sujeto" se refiere a un animal, tal como un mamífero o una especie aviar, incluyendo un ser humano, un simio, un caballo, una vaca, una oveja, una cabra, un perro y un gato. El sujeto puede tener una infección por *C. difficile*, puede presentar riesgo de desarrollar una infección por *C. difficile* o puede presentar un riesgo mayor que el de la población general para desarrollar una infección por *C. difficile*. Los ejemplos de sujetos que presentan un mayor riesgo de infección por *C. difficile* incluyen pacientes que están siendo sometidos a un tratamiento para infecciones bacterianas, por lo que la flora intestinal normal resulta inhibida por la terapia antimicrobiana, pacientes con función inmune deteriorada (por ejemplo, con deficiencia de inmunoglobulinas, disfunción esplénica, esplenectomía, infección por VIH, función leucocitaria deteriorada y hemoglobinopatías), personas mayores (Loo et al., 2005, NEJM 353: 2442), personas con ciertas malignidades (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y linfoma), personas con riesgo ocupacional aumentado (por ejemplo, trabajadores de servicios públicos, tales como bomberos, trabajadores de instalaciones de agua, trabajadores de servicios de limpieza, policías, médicos, trabajadores de laboratorios y trabajadores de hospitales), personas en poblaciones cerradas (por ejemplo, prisiones, recintos militares y residencias de ancianos) y otras personas que presentan deficiencias inmunológicas que podrían potenciar su susceptibilidad a una infección bacteriana.

Los métodos de la presente descripción incluyen aquellos llevados a cabo *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Los métodos *in vitro* se ejemplifican por, pero no se limitan a, métodos llevados a cabo en un escenario de laboratorio, tal como en un cultivo celular, así como métodos llevados a cabo sobre objetos inertes tales como equipos y dispositivos de laboratorio u hospital, y superficies tales como encimeras y superficies de trabajo. Los métodos *ex vivo* se ejemplifican por, pero no se limitan a, métodos llevados a cabo sobre la superficie del cuerpo humano, tal como sobre las manos.

Los métodos de la presente descripción incluyen tanto aquellos en que se emplean uno o más antibióticos glicopeptídicos como aquellos en que se emplean composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más antibióticos glicopeptídicos. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción comprenden uno o más antibióticos glicopeptídicos y uno o más de entre un vehículo, un diluyente y un excipiente. Los vehículos, diluyentes y excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa (por ejemplo, dextrosa al 5% en agua), agua, glicerol, etanol, propilenglicol, polisorbato 80 (Tween 80<sup>TM</sup>), poli(etilenglicoles) 300 y 400 (PEG 300 y 400), aceite de ricino PEGilado (por ejemplo, Cremophor EL), poloxámeros 407 y 188, una ciclodextrina o un derivado de ciclodextrina [incluyendo (2-hidroxiopropil)-ciclodextrina (HPCD) y (2-hidroxietil)-ciclodextrina; véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2006/0194717], vehículos hidrófilos e hidrófobos, y combinaciones de los mismos. Los vehículos hidrófobos incluyen, por ejemplo, emulsiones grasas, lípidos, fosfolípidos PEGilados, matrices de polímeros, polímeros biocompatibles, liposomas, vesículas, partículas y liposomas. Los términos excluyen específicamente el medio para cultivo celular.

Los excipientes incluidos en una formulación tienen distintas finalidades dependiendo, por ejemplo, de la naturaleza del fármaco y del modo de administración. Los ejemplos de excipientes habitualmente empleados incluyen, sin limitación: agentes estabilizantes, agentes solubilizantes y agentes tensioactivos, tampones, antioxidantes y conservantes, agentes para impartir tonicidad, agentes para dar cuerpo, agentes lubricantes, agentes emulsivos, agentes suspendedores o modificadores de la viscosidad, diluyentes inertes, cargas, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes humectantes, agentes lubricantes, agentes antibacterianos, agentes quelantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes saboreadores, agentes colorantes, agentes auxiliares de la administración, y combinaciones de los mismos.

Las composiciones pueden contener vehículos y excipientes comunes, tales como almidón de maíz o gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro sódico, ácido algínico, croscarmelosa sódica y almidón-glicolato de sodio.

El vehículo, diluyente o excipiente particular empleado dependerá de los medios y de la finalidad a la que se aplica

el ingrediente activo.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables también incluyen agentes para impartir tonicidad, que hacen que la composición sea compatible con la sangre. Los agentes para impartir tonicidad son particularmente deseables en las formulaciones inyectables.

- 5 Las composiciones farmacéuticas y los antibióticos glicopeptídicos de la presente descripción se pueden formular, por ejemplo, para administración oral, sublingual, intranasal, intraocular, rectal, transdérmica, mucosa, tópica o parenteral. Los modos parenterales de administración incluyen, sin limitación, los modos intradérmico, subcutáneo (s.c., s.q., sub-Q, Hypo), intramuscular (i.m.), intravenoso (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intraarterial, intramedular, intracardiaco, intraarticular (articulaciones), intrasinovial (zona de fluidos articulares), intracraneal, intraespinal, e intratecal (fluidos espinales). Para efectuar dicha administración se puede utilizar cualquier dispositivo conocido útil para la inyección o infusión parenterales de formulaciones de fármacos.

- 10 Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de disoluciones, suspensiones o emulsiones grasas para inyección, estériles, isotónicas y acuosas o no acuosas. La forma parenteral empleada para la inyección debe ser fluida hasta el punto en que pueda atravesar fácilmente una aguja hipodérmica. Estas disoluciones o suspensiones se pueden preparar a partir de líquidos concentrados, polvos o gránulos estériles.

- 15 Los excipientes utilizados en las preparaciones parenterales también incluyen, sin limitación, agentes estabilizantes (por ejemplo, carbohidratos, aminoácidos y polisorbatos, tal como dextrosa al 5%), agentes solubilizantes [por ejemplo, cetrimida, docusato sódico, monooleato de glicerilo, polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG)], agentes tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos, succinato de tocoferol y PEG, poloxámero y Cremophor™), tampones (por ejemplo, acetatos, citratos, fosfatos, tartratos, lactatos, succinatos, aminoácidos y similares), antioxidantes y conservantes (por ejemplo, BHA, BHT, ácidos gentísicos, vitamina E, ácido ascórbico, ascorbato sódico y agentes que contienen azufre tales como sulfitos, bisulfitos, metabisulfitos, tioglicerol, tioglicolatos y similares), agentes para impartir tonicidad (para ajustar la compatibilidad fisiológica), agentes suspendedores o modificadores de la viscosidad, agentes antibacterianos (por ejemplo, timerosal, cloruro de benzetonio, cloruro de benzalconio, fenol, cresol y clorobutanol), agentes quelantes, y agentes auxiliares de la administración (por ejemplo, anestésicos locales, agentes antiinflamatorios, agentes anticoagulantes, vasoconstrictores para prolongación y agentes que aumentan la permeabilidad tisular), y combinaciones de los mismos.

- 20 Las formulaciones parenterales en que se emplean vehículos hidrófobos incluyen, por ejemplo, emulsiones grasas y formulaciones que contienen lípidos, lipoesferas, vesículas, partículas y liposomas. Las emulsiones grasas incluyen, además de los excipientes anteriormente mencionados, un lípido y una fase acuosa, y aditivos tales como agentes emulsivos (por ejemplo, fosfolípidos, poloxámeros, polisorbatos y aceite de ricino polioxietileno), y agentes de acción osmótica (por ejemplo, cloruro sódico, glicerol, sorbitol, xilitol y glucosa). Los liposomas incluyen fosfolípidos naturales o derivados y, opcionalmente, agentes estabilizantes tales como el colesterol.

- 25 En otra realización, la forma parenteral de dosificación unitaria de antibióticos glicopeptídicos puede ser una disolución, lista para uso, del antibiótico glicopeptídico en un vehículo adecuado en ampollas estériles herméticamente selladas o en jeringas estériles precargadas. El vehículo adecuado comprende opcionalmente cualquiera de los excipientes anteriormente mencionados.

- 30 Alternativamente, la dosificación unitaria de los antibióticos glicopeptídicos de la presente descripción puede estar en forma de líquido concentrado, polvo o gránulos para su reconstitución *ex tempore* en el vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado, tal como agua estéril, en el momento de la administración. Además de los excipientes anteriormente mencionados, las formas pulverulentas incluyen opcionalmente agentes para dar cuerpo (por ejemplo, manitol, glicocola, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, hidroxietil-almidón, Ficoll y gelatina) y agentes crioprotectores (congelación) o lioprotectores (liofilización).

- 35 En el uso intravenoso (IV), se puede disolver o suspender una formulación estéril de las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, y opcionalmente uno o más aditivos, incluyendo agentes solubilizantes o agentes tensioactivos, en cualquiera de los fluidos intravenosos comúnmente empleados, y se puede administrar la disolución o suspensión por infusión. Los fluidos intravenosos incluyen, sin limitación, disolución salina fisiológica, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa al 5% en agua y disolución de Ringer™.

- 40 En las preparaciones intramusculares, se puede disolver y administrar una formulación estéril de las composiciones farmacéuticas de la presente descripción en un diluyente farmacéutico tal como agua para inyección (WFI; del inglés, Water-for-Injection), disolución salina fisiológica o dextrosa al 5% en agua. Se puede preparar y administrar una forma insoluble adecuada de las composiciones farmacéuticas como una suspensión en una base acuosa o una base oleosa farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un éster de un ácido graso de cadena larga, tal como oleato



de etilo.

Para uso oral, la composición farmacéutica oral puede estar hecha en forma de una dosificación unitaria que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones farmacéuticas. Son particularmente útiles las formulaciones sólidas tales como tabletas y cápsulas. También se pueden idear preparaciones de liberación ininterrumpida o entéricamente revestidas. Para aplicaciones pediátricas y geriátricas, son especialmente adecuadas las suspensiones, los jarabes y las tabletas masticables. Para administración oral, las composiciones farmacéuticas están en forma de, por ejemplo, tabletas, cápsulas, suspensiones o jarabes o elixires líquidos, sellos y similares. Para una administración oral general, los excipientes o aditivos incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, cargas, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes humectantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saboreadores, agentes colorantes y conservantes inertes.

Para fines terapéuticos, las tabletas y las cápsulas pueden contener, además de los antibióticos glicopeptídicos, vehículos convencionales tales como: diluyentes (por ejemplo, carbonatos sódico y cálcico, fosfatos sódico y cálcico, y lactosa), agentes aglutinantes [por ejemplo, goma arábiga, almidón, gelatina, sacarosa, polivinilpirrolidona (Povidone), sorbitol, goma tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropil-metilcelulosa y etilcelulosa], cargas (por ejemplo, fosfato cálcico, glicocola, lactosa, almidón de maíz, sorbitol y sacarosa), agentes humectantes, agentes lubricantes (por ejemplo, estearatos metálicos, ácido esteárico, polietilenglicol, ceras, aceites, sílice y sílice coloidal, fluido de silicio, y talco), agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de patata, almidón de maíz y ácido alginico), agente saboreadores (por ejemplo, menta, aceite de gaulteria, agente con sabor a fruta, cereza, uva, chicle y similares) y agentes colorantes inertes. Los vehículos también pueden incluir excipientes de revestimiento tales como monoestearato de glicerilo y diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal.

En una formulación oral particular, los antibióticos glicopeptídicos de la presente descripción pueden estar en forma de una cápsula que contiene el antibiótico glicopeptídico, gelatina, óxido de hierro, polietilenglicol, dióxido de titanio, y uno o más ingredientes inactivos diferentes. Las cantidades adecuadas del antibiótico glicopeptídico en la cápsula pueden variar de aproximadamente 10 a aproximadamente 3000 mg, incluyendo las cantidades preferidas aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450 y 1500 mg del antibiótico glicopeptídico. Las formulaciones orales también pueden incluir polietilenglicol (PEG), en donde el PEG es de aproximadamente PEG200 a aproximadamente PEG8000, preferiblemente de aproximadamente PEG400 a aproximadamente PEG6000.

Las preparaciones líquidas orales, generalmente en forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones o elixires acuosos u oleosos, pueden contener aditivos convencionales tales como agentes suspendedores, agentes emulsivos, agentes no acuosos, conservantes, agentes colorantes y agentes saboreadores. Los ejemplos de aditivos para preparaciones líquidas incluyen goma arábiga, aceite de almendra, alcohol etílico, aceite de coco fraccionado, gelatina, jarabe de glucosa, glicerol, grasas comestibles hidrogenadas, lecitina, metilcelulosa, celulosa microcristalina, para-hidroxibenzoato de metilo o propilo, propilenglicol, sorbitol y ácido sórbico.

Para uso tópico, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden también preparar en formas adecuadas para ser aplicadas a la piel, o a membranas mucosas de la nariz y la garganta, y pueden tener la forma de cremas, ungüentos, gotas nasales, composiciones líquidas para pulverización o inhalación, pastillas o tinturas para la garganta. Dichas formulaciones tópicas pueden incluir además compuestos químicos, tal como dimetilsulfóxido (DMSO), para facilitar la penetración del ingrediente activo en la superficie. Para la aplicación a los ojos o los oídos, las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en una forma líquida o semilíquida formulada en bases hidrófobas o hidrófilas como ungüentos, cremas, lociones, tinturas o polvos. Para administración rectal, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de supositorios mezcladas con vehículos convencionales tales como manteca de cacao, cera u otro glicérido.

En una formulación intravenosa (IV) preferida para uso en los métodos de la presente descripción, se administra oritavancina en una dosificación de entre aproximadamente 100 mg y 2000 mg, preferiblemente de aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 o más mg, por infusión IV a lo largo de aproximadamente 60, 90, 120 o más minutos, cada 6, 12, 18 o 24 horas, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días. En esta realización, la oritavancina puede ser reconstituida en agua estéril para inyección (WFI). Además, en esta realización, la oritavancina puede ser diluida en dextrosa al 5% en agua (D5W) hasta un volumen total de al menos 250 ml. Preferiblemente, la concentración resultante no es superior a 0,8 mg/ml para una dosis de 200 mg, 1,0 mg/ml para una dosis de 250 mg, y 1,2 mg/ml para una dosis de 300 mg.

En una formulación oral preferida para uso en los métodos de la presente descripción, se administra oritavancina en

una dosificación oral de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal del sujeto al que se administra la formulación oral, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg por kg de peso corporal, incluyendo aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg por kg de peso corporal. El curso del tratamiento por administración oral puede ser una sola dosis o múltiples dosis. Cuando se administran oralmente múltiples dosis, la administración puede ser una, dos, tres o más veces al día. Un curso de tratamiento oral puede ser durante uno o más días, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más días. En una realización, se puede formular la oritavancina en hidroxipropil-beta-ciclodextrina al 10%. En otra realización, se puede formular la oritavancina en polietilenglicol 400 (PEG400) al 85% en agua estéril. La formulación oral puede estar en forma de un líquido para ser bebido por el sujeto, en forma de una cápsula que contiene la formulación de oritavancina, o en cualquier otra forma conocida por el técnico experto para administrar una formulación oral.

Cada uno de los métodos de la presente descripción puede ser llevado también a la práctica incluyendo un agente antibacteriano adicional con el antibiótico glicopeptídico o en la composición farmacéutica. Dichos agentes antibacterianos son además del uno o más antibióticos glicopeptídicos que se pueden utilizar en cada uno de los métodos. Los agentes antibacterianos adicionales incluyen una rifamicina, una sulfonamida, una beta-lactama, una tetraciclina, un cloranfenicol, un aminoglicósido, un macrólido, una estreptogramina, una quinolona, una fluoroquinolona, una oxazolidinona y un lipopéptido. En particular, se prefieren tetraciclina, agentes antibacterianos derivados de tetraciclina, glicilciclina, agentes antibacterianos derivados de glicilciclina, minociclina, agentes antibacterianos derivados de minociclina, agentes antibacterianos de oxazolidinona, agentes antibacterianos de aminoglicósido, agentes antibacterianos de quinolona, vancomicina, agentes antibacterianos derivados de vancomicina, teicoplanina, agentes antibacterianos derivados de teicoplanina, eremomicina, agentes antibacterianos derivados de eremomicina, cloroeremomicina, agentes antibacterianos derivados de cloroeremomicina, daptomicina y agentes antibacterianos derivados de daptomicina.

Los términos y expresiones "dosis", "dosis unitaria", "dosificación unitaria" y "dosis eficaz" se refieren a unidades físicamente discretas que contienen una cantidad predeterminada de ingrediente activo, calculada para producir un efecto terapéutico deseado. Estos términos y expresiones son sinónimos de las cantidades terapéuticamente eficaces y las cantidades suficientes para alcanzar los objetivos expuestos de los métodos descritos en esta memoria.

La cantidad terapéuticamente eficaz de los antibióticos glicopeptídicos de la presente descripción y las cantidades suficientes para alcanzar los objetivos expuestos de los métodos descritos en esta memoria varían dependiendo de las características físicas del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, la formulación y los medios empleados para administrar el fármaco, y el método que se lleva a la práctica. La dosis específica para un sujeto dado viene normalmente dictada por el juicio del médico responsable. Sin embargo, una cantidad terapéuticamente eficaz y/o suficiente de los antibióticos glicopeptídicos de la presente descripción, incluyendo la oritavancina, está típicamente entre aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal y 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 1 a 50 mg/kg, más preferiblemente de 5 a 30 mg/kg, independientemente de la formulación. En realizaciones igualmente preferidas, una cantidad terapéuticamente eficaz empleada para una sola administración o una administración infrecuente es aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 mg/kg de peso corporal, independientemente de la formulación. En algunas situaciones puede ser eficaz una dosis inferior a 0,5 mg/kg de peso corporal o superior a 100 mg/kg de peso corporal.

Las frecuencias de administración adecuadas pueden variar basándose en si la administración es con fines de tratamiento, profilaxis o prevención. Las frecuencias de administración de las dosis para el tratamiento de un sujeto que tiene una infección por *C. difficile* o para la profilaxis o prevención de una infección por *C. difficile* incluyen 4, 3 o 2 veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, una vez a la semana, cada ocho días, cada nueve días, cada diez días, cada dos semanas, una vez al mes y cada dos meses. En ciertos métodos y realizaciones de la presente descripción, puede ser suficiente una sola dosis o una dosis infrecuente (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 dosis) para alcanzar los objetivos expuestos de los métodos reivindicados en esta memoria. En otras realizaciones, el curso del tratamiento puede requerir la administración de muchas dosis a lo largo de muchos días, tal como la administración de una dosis 4, 3 o 2 veces al día o una vez al día a lo largo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más días.

Dependiendo del medio de administración, la dosificación puede ser administrada toda de una vez, tal como con una formulación oral en una cápsula, o lentamente a lo largo de un periodo de tiempo, tal como con una administración intravenosa. Para medios de administración más lentos, el periodo de administración puede ser una cuestión de minutos, tal como aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120 o más minutos, o un periodo de horas, tal como aproximadamente 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5 o más horas.

Como se emplean en esta memoria, los términos "inhibir" e "inhibición" tienen sus significados ordinarios y habituales e incluyen una o más de las acciones siguientes: inhibir el crecimiento de una forma vegetativa de *C. difficile*, inhibir una función de una forma vegetativa de *C. difficile*, inhibir la propagación de una forma vegetativa de *C. difficile*, inhibir la esporulación de *C. difficile*, inhibir la activación de una espora de *C. difficile*, inhibir la germinación de una espora de *C. difficile*, e inhibir el desarrollo de una espora de *C. difficile*. Dicha inhibición es una inhibición de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 100% de la actividad particular frente a la actividad en un sujeto al que no se ha administrado una composición farmacéutica ni un antibiótico glicopeptídico de la presente descripción. Preferiblemente, la inhibición es una inhibición de aproximadamente el 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% de la actividad frente a la actividad en un sujeto al que no se ha administrado una composición farmacéutica ni un antibiótico glicopeptídico de la presente descripción. Como se emplea en esta memoria, "espora" se refiere a los dos términos convencionalmente utilizados: "espora" y "endospora".

Como se emplean en esta memoria, los términos "tratar" y "tratamiento" tienen sus significados ordinarios y habituales e incluyen una o más de las acciones siguientes: mejorar un síntoma de una infección por *C. difficile* en un sujeto, bloquear o mejorar una recurrencia de un síntoma de una infección por *C. difficile* en un sujeto, disminuir la gravedad y/o la frecuencia de un síntoma de una infección por *C. difficile* en un sujeto, detener, disminuir o inhibir el crecimiento de una forma vegetativa de *C. difficile* en un sujeto, inhibir la esporulación de *C. difficile*, inhibir la activación de una espora de *C. difficile* en un sujeto, inhibir la germinación de una espora de *C. difficile* en un sujeto, e inhibir el desarrollo de una espora de *C. difficile* en un sujeto. "Tratamiento" significa mejorar, bloquear, reducir, disminuir o inhibir en de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% con respecto a un sujeto al que no se ha administrado una composición farmacéutica ni un antibiótico glicopeptídico de la presente descripción. Preferiblemente, la mejoría, el bloqueo, la reducción, la disminución o la inhibición es aproximadamente 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% con respecto a un sujeto al que no se ha administrado una composición farmacéutica ni un antibiótico glicopeptídico de la presente descripción.

Como se emplean en esta memoria, los términos "prevenir" y "prevención" tienen sus significados ordinarios y habituales e incluyen una o más de las acciones siguientes: prevenir la colonización de *C. difficile* en un sujeto, prevenir un aumento del crecimiento de una población de *C. difficile* en un sujeto, prevenir la activación, la germinación o el desarrollo de esporas de *C. difficile* en un sujeto, prevenir la esporulación de *C. difficile* en un sujeto, prevenir el desarrollo de una enfermedad causada por *C. difficile* en un sujeto, y prevenir los síntomas de una enfermedad causada por *C. difficile* en un sujeto. Como se emplea en esta memoria, la prevención dura al menos aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más días después de la administración de una composición farmacéutica o un antibiótico glicopeptídico de la presente descripción.

Como se emplea en esta memoria, "profilaxis" incluye inhibir el desarrollo de una infección productiva o progresiva por *C. difficile* en un sujeto, donde la profilaxis dura al menos aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más días después de la administración de una composición farmacéutica o un antibiótico glicopeptídico de la presente descripción. La inhibición del desarrollo de una infección productiva o progresiva por *C. difficile* significa que la gravedad de una infección por *C. difficile* en un sujeto resulta reducida en de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% con respecto a un sujeto al que no se ha administrado una composición farmacéutica ni un antibiótico glicopeptídico de la presente descripción. Preferiblemente, la reducción de la gravedad es aproximadamente 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1%. La gravedad de una infección se puede basar, entre otros factores, en la cantidad de bacterias *C. difficile* presentes en un sujeto, el período de tiempo que se pueden detectar bacterias *C. difficile* en un sujeto, y/o la gravedad de un síntoma de una infección por *C. difficile*.

Como se emplean en esta memoria, la expresión "cada dos semanas" se refiere a una frecuencia de cada 13-15 días, la expresión "una vez al mes" se refiere a una frecuencia de cada 28-31 días, y "cada dos meses" se refiere a una frecuencia de cada 58-62 días.

Como se emplea en esta memoria, con la expresión "poner en contacto" se quiere hacer referencia en términos generales a poner una célula bacteriana y una molécula de un antibiótico glicopeptídico de la presente descripción en una proximidad suficiente para que el antibiótico glicopeptídico pueda ejercer un efecto sobre la célula bacteriana. Se puede transportar el antibiótico glicopeptídico al lugar de la célula bacteriana o se puede situar el antibiótico glicopeptídico en un lugar al que se dirige la célula bacteriana o con el que entra en contacto. El técnico experto entenderá que la expresión "poner en contacto" incluye la interacción física entre un antibiótico glicopeptídico y una célula bacteriana, así como interacciones que no requieren interacción física.

Como se emplea en esta memoria, *C. difficile* se refiere a todas las cepas, especies y subespecies de *C. difficile*. Se puede usar el ribotipaje por PCR para distinguir entre las diferentes cepas, especies y subespecies de *C. difficile*. Sólo como un ejemplo, la cepa de *C. difficile* comprendida en el alcance de esta invención incluye los ribotipos PCR

001, 106 y 027 de *C. difficile*.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

5 En estos estudios, se evaluó la actividad del metronidazol (MET), la vancomicina (VAN) y la oritavancina (ORI) sobre esporas de *C. difficile* usando tres métodos experimentales: análisis del punto final en gradiente en espiral, cultivo basado en agar, y microscopía de contraste de fases.

#### Preparación de esporas de *C. difficile*

10 Se inocularon bacterias *C. difficile* de los ribotipos PCR 001, 106 y 027 en agar sangre Columbia y se incubaron anaeróticamente (37°C) durante 10 días. El producto de crecimiento fue recogido en disolución salina estéril y fue sometido a tratamiento alcohólico en un volumen igual de etanol al 100% durante 1 hora. Las suspensiones de esporas alcohólicamente tratadas fueron mezcladas con formación de remolinos y fueron sonicadas durante 5 minutos a temperatura ambiental. Las esporas claras en fase de *C. difficile* (no germinadas) fueron separadas de las esporas oscuras en fase (germinadas) y los fragmentos celulares mediante centrifugación en gradiente de densidades (4000 rpm, 15 minutos) después de poner una capa sobre Urografin 370 (Schering, Alemania) al 50% (volumen/volumen, en disolución salina tamponada con fosfato). La operación de centrifugación en gradiente de densidades se llevó a cabo dos veces. Los sedimentos de esporas purificadas fueron resuspendidos en disolución salina estéril (1 ml por 10 placas de agar sangre Columbia recogidas). Se registraron los porcentajes de esporas claras en fase, esporas oscuras en fase y células vegetativas usando microscopía de contraste de fases (aumento x 100).

#### 20 Análisis del punto final en gradiente en espiral

25 Se prepararon disoluciones madre de agente antimicrobiano en agua desionizada (metronidazol, vancomicina) ± polisorbato 80 al 0,002% (oritavancina). Se utilizó un sembrador de placas en espiral (WASP2, Don Whitley Scientific, Reino Unido) para aplicar un gradiente logarítmico de antibiótico sobre la superficie de agar de Brazier (pH de 7) previamente secado (37 °C, 20 minutos). El agar con gradientes logarítmicos de agente antimicrobiano aplicados a su superficie permaneció a temperatura ambiental durante 1 hora para permitir que el agar adsorbiera el agente antimicrobiano. Se inocularon cultivos vegetativos y esporas (~10<sup>7</sup> cfu/ml) de *C. difficile* en la superficie del agar (Figura 1) con una torunda de algodón estéril y se incubó anaeróticamente (37 °C, 24 horas). Se midieron los valores D (en mm) y se convirtieron en MICs (J. H. Paton, 1990, *Int. J. Exp. Clin. Chemother.* 9, 31-38).

30 Las MICs de ORI para las esporas de *C. difficile* fueron 5-13 veces menores que para las células vegetativas (Figura 2). Las MICs de MET y VAN no difirieron sustancialmente en cuanto a células vegetativas y esporas de *C. difficile* (datos no mostrados).

#### Cultivo basado en agar

35 Se expuso un inóculo estándar de esporas de *C. difficile* (~300 cfu) a (concentraciones *in vivo* esperadas de metronidazol (9,3 mg/l), vancomicina (350 mg/l) u oritavancina (350 mg/l) durante 1 minuto y 30 minutos por triplicado. Las disoluciones de agente antimicrobiano-esporas fueron mezcladas, diluidas (hasta sub-MIC) en agua desionizada estéril, filtradas a través de filtros de acetato de celulosa [CAF (del inglés, cellulose acetate filters); 0,45 µm] y lavadas. Se transfirieron los CAF a agar de Brazier (pH de 7) + 5 mg/l de lisozima y, después de una incubación anaeróbica (37 °C, 48 horas), se determinó el porcentaje de esporas de *C. difficile* (frente al testigo). No se recuperaron esporas de *C. difficile* después de la exposición a oritavancina (Figura 3). Se observó evidencia de unión de oritavancina a esporas de *C. difficile* y CAF (datos no mostrados).

#### 40 Microscopía de contraste de fases

45 Se suspendió un inóculo estándar de esporas de *C. difficile* de ribotipo PCR 027 (~10<sup>7</sup> cfu/ml) en 30 ml de caldo de Brazier (pH de 7) que llevaba incorporados 0,1, 1 o 10 mg/l de metronidazol, vancomicina u oritavancina. Las esporas de *C. difficile* fueron también expuestas a 10 mg/l de agente antimicrobiano durante 2 horas, lavadas 3 veces en PBS estéril, resuspendidas e inoculadas en caldo de Brazier (pH de 7). Se extrajeron muestras a las 2, 4, 6, 24, 32 y 48 horas. Se observaron los portaobjetos por microscopía de contraste de fases y se registraron los porcentajes de esporas claras en fase, esporas oscuras en fase y células vegetativas (Figura 4).

50 Se llevaron a cabo análisis estadísticos por transformación de los datos porcentuales utilizando una transformación arco seno y se estudiaron utilizando una prueba de intervalos con signo de Wilcoxon. Un valor P < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Las concentraciones supra-MIC de todos los agentes antimicrobianos

evitaron el desarrollo pero no la germinación de las esporas de *C. difficile*. El desarrollo de las esporas de *C. difficile* previamente expuestas a oritavancina fue mucho menor que el del testigo ( $P = 0,058$ ) y significativamente menor que el de las esporas previamente expuestas a MET o VAN ( $P < 0,05$ ) (Figura 5).

#### Observaciones

- 5 La magnitud de la diferencia de las MICs de oritavancina para bacterias *C. difficile* vegetativas y para esporas de *C. difficile* fue acusada y reproducible (se determinaron las MICs en seis ocasiones). No se cree que dicho fenómeno haya sido comunicado previamente. *In vivo*, esto podría proporcionar a la oritavancina una ventaja con respecto a las terapias antimicrobianas existentes para la CDI al permitir potencialmente una mayor recuperación de la microflora intestinal (de la que se puede esperar que sea inhibitoria para *C. difficile*) antes de que las concentraciones de oritavancina se vuelvan subinhibitorias para el desarrollo de las esporas de *C. difficile*.

10 Los experimentos de germinación/desarrollo de esporas usando microscopía de contraste de fases demostraron que todos los agentes antimicrobianos evaluados en niveles supra-MIC inhibían el desarrollo de esporas de *C. difficile* pero no la propia germinación. Resulta interesante que el desarrollo de esporas de *C. difficile* de ribotipo PCR 027 previamente expuestas a 10 mg/l de oritavancina resultó significativamente inhibido a pesar del lavado a fondo. Este fenómeno no se observó para esporas previamente expuestas a metronidazol o vancomicina en una idéntica concentración de agente antimicrobiano. Se demostró previamente que el agente antimicrobiano peptídico nisina era inhibitorio para el desarrollo de esporas de *Bacillus subtilis* y *Clostridium sporogenes* (Chan et al., 1996, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2966-2969; Rayman et al., 1981, *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 375-380). La oritavancina está funcionalmente relacionada con agentes antimicrobianos ligantes de lípido II, tal como la nisina, y recientes estudios indican que el fármaco puede también inhibir enzimas transglicosilasas implicadas en la polimerización de peptidoglicano (Wang et al., 2007, 47th ICAAC Chicago, Póster CI-1474). El mecanismo de la actividad inhibitoria sobre esporas de *C. difficile* en desarrollo sigue sin estar elucidado, pero posiblemente puede ser una consecuencia de la unión directa de la oritavancina a las esporas.

#### Ejemplo 2

- 25 Se llevaron a cabo estudios adicionales relativos a la actividad de la oritavancina (ORI) frente a la del metronidazol (MET) y la vancomicina (VAN) sobre cepas de *C. difficile* genotípicamente distintas, usando los métodos de incorporación a agar y microdilución en caldo.

#### Materiales y métodos

##### Cepas bacterianas

- 30 Se seleccionaron treinta y tres productos de aislamiento de bacterias *C. difficile* genotípicamente distintas (mediante ribotipaje por PCR) de un banco de cepas en el Leeds General Infirmary (Leeds, Reino Unido). Se incluyeron en el grupo productos de aislamiento representativos de los ribotipos epidémicos PCR 001, 106 y 027 de *C. difficile*. Para asegurar la exactitud del procedimiento se incluyeron productos de aislamiento testigo de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 en todas las determinaciones de MIC.

##### Determinación de la MIC

- 40 Se determinaron las MICs por incorporación a agar (AI; del inglés, agar incorporation) basándose en el método de Freeman y Wilcox (*J. Antimicrob. Chemother.* 2001, 47: 244-6). En resumen, se cultivaron bacterias en caldo anaeróbico de Schaedler (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a 37 °C durante 24 horas en una cámara anaeróbica (Don Whitley Scientific, Shipley). Se prepararon disoluciones madre de metronidazol y vancomicina (Sigma-Aldrich Co., Poole, Reino Unido) en agua desionizada. Se preparó oritavancina en P80 al 0,002%. Todas las disoluciones de agentes antimicrobianos fueron esterilizadas por filtración a través de filtros de jeringa de 0,22 µm. La oritavancina fue filtrada a 1280 mg/l ya que la filtración a concentraciones menores conduce a pérdidas proporcionales significativas de fármaco a causa de la unión saturable. Se preparó agar Wilkins Chalgren (Oxoid) que llevaba incorporado diluciones de agentes antimicrobianos al doble (0,03-16 mg/l), con y sin P80 al 0,002% y con y sin sangre de caballo lisada (LHB; del inglés, lysed horse blood) al 2% (E&O Labs, Bonneybridge, Reino Unido). Todos los medios y los diluyentes fueron pre-reducidos durante la noche en la cámara anaeróbica. Se diluyeron los cultivos bacterianos en disolución salina estéril y se inocularon en la superficie de las placas de agar para incorporación a agar usando un inoculador multipuntual (~10<sup>4</sup> cfu). Las placas para incorporación a agar fueron incubadas anaeróbicamente durante 48 horas. Los puntos finales de MIC se leyeron como la concentración mínima de agente antimicrobiano donde no hay crecimiento aparente (ignorando una neblina visible de crecimiento o una sola colonia).

Se determinaron las MICs por macrodilución en caldo (BM; del inglés, *broth macrodilution*) siguiendo el método de Jousimies-Somer et al. ("Introduction to anaerobic bacteriology" en Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual, 6ª edición, Belmont, California, EE.UU.: Star Publishing Company, 2002, 1-22). En resumen, se prepararon disoluciones madre de agente antimicrobiano de doble fuerza en caldo Brucella (Sigma) complementado con hemina (5 mg/l, Sigma), NaHCO<sub>3</sub> (1 mg/l, Sigma) y vitamina K<sub>1</sub> (10 µl/l, Sigma). Todos los caldos para las MICs de oritavancina contenían P80 al 0,002% (Arhin et al., Abstracts of the Seventeenth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich, Alemania, 2007, Resumen P-827, página 102; Eur. Soc. Clin. Micro. Infect. Dis., Basilea, Suiza). Las cepas bacterianas fueron inicialmente cultivadas durante la noche en caldo anaeróbico de Schaedler y fueron posteriormente diluidas 1:200 (~3 x 10<sup>5</sup> cfu/ml) en caldo Brucella complementado, pre-reducido y estéril. Las disoluciones madre de agente antimicrobiano fueron diluidas 1:2, lo que fue seguido de la adición del inóculo de cada cepa. Se incubaron anaeróticamente los caldos a 37 °C durante 48 horas. Los puntos finales de MIC se leyeron como la concentración de agente antimicrobiano donde no se observó crecimiento en comparación con el testigo. Las MICs se determinaron por duplicado para todos los agentes antimicrobianos.

#### Resultados

Se evaluó la actividad de la oritavancina sobre 33 productos de aislamiento de bacterias *C. difficile* genótipicamente distintas usando tanto el método de incorporación a agar como el método de macrodilución en caldo. El grupo de cepas de *C. difficile* empleadas en este estudio incluía un producto de aislamiento representativo del ribotipo PCR 027, la cepa vinculada a recientes epidemias de CDI en Europa, Canadá y EE.UU. (Kuijper et al., *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2007, 20: 376-83). En la Tabla 1 se muestran las MICs para bacterias *C. difficile* genótipicamente distintas.

Tabla 1 – Susceptibilidades (mg/l) de bacterias *C. difficile* genótipicamente distintas (n = 33) a oritavancina, metronidazol y vancomicina.

		MIC <sub>90</sub> (intervalo) MIC geo		
		oritavancina	metronidazol	vancomicina
BM		1 (0,06-1) 0,31	2 (0,125-2) 0,56	2 (0,5-2) 1,58
Al	P80 con LHB	4 (1-4) 1,58	2 (0,125-2) 0,55	1 (0,5-2) 1,00
Al	P80 sin LHB	4 (2-4) 2,70	2 (0,25-2) 0,55	2 (1-4) 1,30
Al	sin P80 con LHB	2 (0,5-4) 1,72	2 (0,5-4) 0,69	2 (1-4) 1,35
Al	sin P80 sin LHB	4 (2-4) 2,33	2 (0,25-4) 0,53	2 (0,5-2) 1,51

P80, polisorbato 80 al 0,002%; LHB, sangre de caballo lisada al 2%; BM, macrodilución en caldo; Al; incorporación a agar; MIC geo, MIC media geométrica.

Las MICS medias geométricas del metronidazol mediante incorporación a agar fueron de 2 a 5 veces menores que las MICs de la oritavancina y de 2 a 3 veces menores que las MICs de la vancomicina. La oritavancina y la vancomicina fueron similarmente activas contra *C. difficile* en todas las condiciones de agar. La complementación del agar Wilkins Chalgren con P80 al 0,002% y con sangre de caballo lisada al 2% no influyó mucho en las MICs de la oritavancina (ni en las de la vancomicina ni el metronidazol) para *C. difficile* o los organismos testigo. Además, la incorporación de P80 con o sin sangre de caballo lisada no afectó al crecimiento de *C. difficile* ni de los organismos testigo en el agar que no contenía agente antimicrobiano (testigo). Las MICs por macrodilución en caldo fueron de 2 a 4 veces menores que las MICs por incorporación a agar para la oritavancina, pero no para el metronidazol ni la vancomicina. Las MICs medias geométricas de la oritavancina por macrodilución en caldo fueron ~2 y 5 veces menores que las del metronidazol y la vancomicina, respectivamente. Cuando se comparan MICs por macrodilución en caldo para cepas de *C. difficile* individuales, el 76% (25/33) de los productos de aislamiento examinados fue más susceptible a la oritavancina (≥ 2 diluciones al doble) que a la vancomicina.

Arhin et al. (*Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52: 1597-603) comunicaron recientemente que la oritavancina se perdía rápidamente de la disolución en las placas de prueba para el ensayo de susceptibilidad por microdilución en caldo en ausencia de P80 o sangre de caballo lisada al 2%. Estudios previos han sugerido que la incorporación de P80 o sangre de caballo lisada puede reducir significativamente las MICs de oritavancina para estafilococos y enterococos (pero no para productos de aislamiento estreptocócicos clínicos) al utilizar los métodos de microdilución

en caldo (*Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52: 1597-603; Arhin et al., Abstracts of the Seventeenth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich, Alemania, 2007, Resumen P-827, página 102; Eur. Soc. Clin. Micro. Infect. Dis., Basilea, Suiza). Los autores propusieron que la presencia de sangre lisada en los medios de cultivo empleados para evaluar productos de aislamiento estreptocócicos clínicos puede haber suprimido la unión de la oritavancina a superficies; por lo tanto, la incorporación de P80 no facilitaría ninguna reducción adicional de las MICs de oritavancina. Además, la inclusión de P80 en los métodos de incorporación a agar no reduce las MICs de oritavancina para *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *E. faecalis* o *Enterococcus faecium*. En el presente estudio se evaluó el efecto de P80 y la sangre de caballo lisada sobre las MICs de oritavancina, vancomicina y metronidazol usando la incorporación a agar. La presencia de P80 + sangre de caballo lisada en los métodos de incorporación a agar no redujo sustancialmente las MICs de oritavancina, lo que refleja los estudios previos de MIC basados en agar con anaerobios facultativos y resalta la variabilidad de MICs entre los métodos. Además, la incorporación de P80 + sangre de caballo lisada al presente estudio no afectó a las MICs de vancomicina (ni de metronidazol), lo que también refleja los estudios previos de susceptibilidad *in vitro* que no mostraron un desplazamiento de las MICs de estos agentes antimicrobianos en presencia de P80 o de sangre de caballo lisada (Blosser et al., Abstracts of the 103rd Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, DC, 2003, Resumen C-70, American Society for Microbiology, Washington, DC, EE.UU.).

Ensayos de concentraciones de oritavancina en muestras recogidas de un modelo de intestino humano *in vitro* con quimiostato de triple fase usando un bioensayo en placa grande indican que la difusión del fármaco en agar es lenta; se requiere una operación de difusión con preincubación para potenciar los diámetros de las zonas. Se sabe que los glicopéptidos se unen a superficies de polímeros (Wilcox et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 1994, 33: 431-41), una propiedad que está influida por la carga superficial tanto del agente antimicrobiano como del polímero. Por ejemplo, la unión de la teicoplanina a las superficies de recipientes de muestras fue, por término medio, cuatro veces mayor que la de la vancomicina. La exposición previa de una superficie de polímero a fluidos corporales humanos reduce acusadamente la unión de la teicoplanina. La oritavancina es un lipoglicopéptido semisintético que posee una carga positiva simple o doble en un pH neutro. Por lo tanto, la complejación de oritavancina con componentes del agar, a causa de las propiedades fisicoquímicas del antibiótico, puede explicar las elevadas MICs (en comparación con las medidas mediante microdilución en caldo) para *C. difficile* y otras bacterias. De hecho, se ha comunicado previamente la adsorción de péptidos antimicrobianos por superficies de agar (Boman et al., *FEBS Lett.* 1989, 259: 103-6). El presente estudio incluyó todas las permutaciones de P80 y sangre de caballo lisada en las MICs por incorporación a agar y mostró que ninguno de los dos complementos incidía significativamente en la evaluación de la susceptibilidad a oritavancina. Se han observado elevadas MICs de oritavancina por incorporación a agar en comparación con las MICs por microdilución y macrodilución en caldo en otras instituciones, pero el mecanismo definitivo que hay tras este fenómeno sigue sin ser explicado (Blosser et al., Abstracts of the 103rd Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, DC, 2003, Resumen C-70, American Society for Microbiology, Washington, DC, EE.UU.).

Ejemplo 3 – Efectos comparativos de la exposición a antibióticos sobre la viabilidad de las esporas de *Clostridium difficile*

Utilizando diferentes métodos experimentales se demostró que la oritavancina altera la transición de spora de *C. difficile* latente a célula vegetativa en mayor grado que los existentes agentes antimicrobianos terapéuticos para la CDI.

Se llevaron a cabo experimentos para determinar los efectos independientes del metronidazol, la vancomicina y la oritavancina sobre la viabilidad de esporas de *C. difficile* expuestas a estos antibióticos. En general, los experimentos se llevaron a cabo mezclando esporas de *C. difficile* con un antibiótico, filtrando la disolución a través de filtros de acetato de celulosa para recoger las esporas, aplicando los filtros que contienen las esporas a agar nutriente, y determinando el número de esporas que quedan en los filtros después de un período seleccionado de tiempo.

Experimentos previos han sugerido que los agentes antimicrobianos pueden ser capaces de unirse a los filtros de acetato de celulosa a pesar del lavado, por lo que el agente antimicrobiano residual puede reducir la recuperación de esporas de *C. difficile*. Por lo tanto, el experimento inicial incluía la dilución de las suspensiones de esporas que contenían agente antimicrobiano antes de la filtración y el lavado. Los volúmenes de reacción fueron 1 ml para todas las disoluciones de agente antimicrobiano/testigo. Se diluyeron la vancomicina y la oritavancina 1:250 y se diluyó el metronidazol 1:50 con objeto de reducir eficazmente la concentración de agente antimicrobiano hasta niveles sub-MIC antes de la filtración.

Ejemplo 3A

Se inoculó 1 ml de disoluciones testigo (agua desionizada ± Tween 80) y de ensayo (que contenían agente

antimicrobiano) con 10 µl de esporas de *C. difficile* (3 cepas; ribotipos 001, 106 y 027 por PCR). Se transfirieron las suspensiones de esporas (tiempo = 1 minuto o 30 minutos) a cúpulas de filtración y se añadió el volumen apropiado de diluyente (agua desionizada estéril ± Tween 80) para alcanzar los factores de dilución anteriormente indicados. Se filtraron las muestras a través de filtros de acetato de celulosa y se lavó con 50 ml más del diluyente apropiado.

- 5 Se transfirieron asépticamente los filtros a agar CCEY de Brazier que contenía 5 mg/l de lisozima y sangre de caballo lisada al 2%. Este procedimiento se completó por duplicado. Se incubaron los medios de cultivo en una atmósfera anaeróbica a 37 °C durante 48 horas y se registraron los números de colonias de *C. difficile*.

- 10 Los resultados se muestran en la Figura 6. No se observó una diferencia sustancial en la recuperación de esporas de *C. difficile* entre 1 minuto y 30 minutos para cualquier testigo/tratamiento dado. La presencia de Tween 80 (P80) no afectó a la recuperación de esporas de *C. difficile*. La recuperación de esporas de *C. difficile* tanto 1 minuto como 30 minutos después de la exposición a metronidazol varió del 90% al 110% de los testigos. La recuperación de esporas de *C. difficile* tanto 1 minuto como 30 minutos después de la exposición a vancomicina (VAN) varió del 25% al 60% de los testigos. La recuperación de esporas de *C. difficile* tanto 1 minuto como 30 minutos después de la exposición a oritavancina (ORI) fue 0%.

- 15 Estos resultados sugerían: 1) los agentes antimicrobianos glicopeptídicos pueden poseer actividad anti-esporas de *C. difficile*, y/o 2) a pesar de la dilución de las disoluciones antes de la filtración y del lavado de las muestras de esporas separadas por filtración, en los filtros de acetato de celulosa estaba presente agente antimicrobiano residual que resultaba inhibitorio para la germinación y/o el desarrollo de las esporas de *C. difficile*.

#### Ejemplo 3B

- 20 Con objeto de evaluar si los agentes antimicrobianos glicopeptídicos se unían potencialmente a los filtros de acetato de celulosa antes de, o durante, la adición del diluyente, se modificó el procedimiento experimental.

- 25 Se añadió primero diluyente a las cúpulas de filtración. Luego se añadieron mezclas de reacción de 1 ml al diluyente apropiado (1 minuto y 30 minutos después de la formación de las mezclas de reacción) y se filtró a través de los filtros de acetato de celulosa. Los filtros fueron lavados con 50 ml del diluyente apropiado. Los filtros fueron luego asépticamente transferidos a agar CCEY de Brazier que contenía 5 mg/l de lisozima y sangre de caballo lisada al 2%. Este procedimiento se completó por duplicado. Se incubaron los medios de cultivo en una atmósfera anaeróbica a 37 °C durante 48 horas y se registraron los números de colonias de *C. difficile*.

- 30 Los resultados se muestran en la Figura 7. No se observó una diferencia sustancial en la recuperación de esporas de *C. difficile* entre 1 minuto y 30 minutos para cualquier testigo/tratamiento dado. La presencia de Tween 80 (P80) no afectó a la recuperación de esporas de *C. difficile*. La recuperación de esporas de *C. difficile* después de la exposición a metronidazol fue el 95-110% de los testigos. La recuperación de esporas de *C. difficile* después de la exposición a vancomicina aumentó al 70-80% de los testigos. La recuperación de esporas de *C. difficile* tanto 1 minuto como 30 minutos después de la exposición a oritavancina (ORI) fue 0%.

- 35 Estos resultados sugerían: 1) el diseño del Experimento 2B facilitó la recuperación de esporas de *C. difficile* de las disoluciones que contenían vancomicina pero no afectó a la recuperación de las disoluciones que contenían oritavancina; 2) por lo tanto, o la oritavancina posee actividad anti-esporas o en los filtros quedaba agente antimicrobiano residual a pesar de la modificación del procedimiento experimental.

#### Ejemplo 3C

Se incluyeron testigos adicionales para vancomicina y oritavancina siguiendo el Experimento 2B.

- 40 Se procesaron disoluciones de 1 ml (que no contenían esporas de *C. difficile*) como en el Experimento 2B y se colocaron los filtros sobre agar CCEY de Brazier. Se inocularon en los filtros 2 x 20 µl de:

- a) bacterias *C. difficile* vegetativas (un cultivo nocturno del ribotipo 001 por PCR)
- b) esporas de *C. difficile* (ribotipo 001 por PCR), o
- c) bacterias *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 (cepa Oxford, cultivo nocturno).

- 45 Se registró el crecimiento/no crecimiento después de la incubación anaeróbica.

Los resultados mostraron que todos los organismos crecían en los filtros a través de los cuales se había filtrado vancomicina. Crecían bacterias *S. aureus* NCTC 6571 en los filtros a través de los cuales se había filtrado oritavancina (la MIC sobre esta cepa es ~4 mg/l por medio de la metodología de incorporación a agar). Se



recuperaron números muy reducidos de bacterias *C. difficile* vegetativas (1 cfu en una placa) en los filtros expuestos a oritavancina en comparación con el crecimiento en los filtros expuestos a vancomicina. Las esporas de *C. difficile* fueron irrecuperables de los filtros expuestos a oritavancina a pesar del buen crecimiento en los filtros expuestos a vancomicina.

- 5 Por lo tanto, estos resultados sugerían que persistían niveles inhibitorios de oritavancina en los filtros de acetato de celulosa a pesar de las precauciones anteriormente subrayadas. La presencia de una cantidad muy pequeña de crecimiento de cultivos de bacterias *C. difficile* vegetativas en comparación con la falta de recuperación de esporas puede sugerir una diferencia en la concentración de oritavancina capaz de inhibir estas formas de *C. difficile*.

#### Ejemplo 3D

- 10 Otra posible explicación de la falta de recuperación de esporas de *C. difficile* tratadas con oritavancina en los experimentos anteriores (además de la presencia del fármaco en los filtros de acetato de celulosa) es que la oritavancina pueda ser capaz de unirse a esporas de *C. difficile* y dañar directamente las esporas o inhibir la germinación y/o el desarrollo de las esporas. Se llevó a cabo un sencillo experimento para evaluar la unión agente antimicrobiano-espora:

- 15 Se prepararon dos disoluciones:

1) esporas de *C. difficile* (ribotipo 001 por PCR, testigo), y

2) esporas de *C. difficile* suspendidas en 350 mg/l de oritavancina (diluyente: Tween 80-H<sub>2</sub>O).

- 20 Se inoculó un tapiz de las bacterias *S. aureus* Oxford en agar sangre fresco. En un duplicado, se centrifugaron las esporas de *C. difficile* (16.000xg, 5 minutos), se separaron los sobrenadantes y se resuspendieron los sedimentos en 500 µl de Tween 80-H<sub>2</sub>O. Se inocularon 10 µl de la suspensión de esporas resuspendidas en la superficie del tapiz de *S. aureus*.

En otro duplicado, las suspensiones de esporas de *C. difficile* fueron lavadas un total de 10 veces usando este procedimiento y fueron inoculadas en la superficie del tapiz de *S. aureus*.

- 25 En ambos duplicados, se incubó aeróbicamente el agar a 37 °C durante la noche y luego se registró la presencia o ausencia de zonas de inhibición.

- 30 El Tween 80 no fue inhibitorio del crecimiento de las bacterias *S. aureus* Oxford. Las esporas de *C. difficile* (testigo) no fueron inhibitorias del crecimiento de las bacterias *S. aureus* Oxford. Las esporas de *C. difficile* expuestas a oritavancina fueron inhibitorias del crecimiento de las bacterias *S. aureus* Oxford después de 0, 1, 2, 4, 5, 6, 9 y 10 lavados. Por lo tanto, el lavado de las suspensiones de esporas no eliminó el efecto antimicrobiano. Estos resultados sugerían que la oritavancina se puede unir directamente a las esporas de *C. difficile*.

Ejemplo 4 – Comparación de la oritavancina con la vancomicina como tratamientos para una infección por bacterias *C. difficile* de ribotipo PCR 027, inducida por clindamicina, en un modelo de intestino humano

Se usó un modelo de intestino humano *in vitro* para comparar la eficacia de la oritavancina con la de la vancomicina para el tratamiento de una CDI inducida por clindamicina y causada por el ribotipo epidémico PCR 027 de *C. difficile*.

- 35 Materiales y métodos

Cepas de *C. difficile*

- 40 Se investigó un único producto de aislamiento de *C. difficile* de ribotipo PCR 027. Este producto de aislamiento era una cepa clínica recuperada durante una epidemia de CDI en el Maine Medical Centre (Portland, EE.UU.) en 2005. Se obtuvo por cortesía del Dr. Rob Owens y fue sometida a ribotipaje en el Anaerobe Reference Laboratory (Cardiff, Gales, Reino Unido) por el Dr. Jon Brazier.

Modelo de intestino humano con quimiostato de triple fase

- 45 Se diseñó el modelo de intestino para permitir el estudio de la microflora intestinal en las condiciones de bajo pH y exceso de carbohidratos del colon proximal y las condiciones no ácidas y con carbohidratos agotados del colon distal (Macfarlane et al., *Microb. Ecol.* 1998, 35: 180-7). Las mediciones microbiológicas y fisicoquímicas en los recipientes del modelo de intestino se validaron frente a los contenidos intestinales de víctimas por muerte repentina (Macfarlane et al., *Microb. Ecol.* 1998, 35: 180-7). Cada modelo de intestino consiste en tres recipientes de fermentación conectados en un sistema de cascadas de presa alimentado por la parte superior con medio de

crecimiento a ritmo controlado ( $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ ). Se hizo burbujear nitrógeno exento de oxígeno en los recipientes para asegurar la anaerobiosis, se calentaron los recipientes por medio de un sistema de camisa exterior con agua ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y se mantuvo el pH en un valor específico usando las unidades de control del fermentador (Biosolo 3, Brighton Systems, Reino Unido) que proporcionaban HCl/NaOH 0,5 M. El recipiente 1 (280 ml) se hizo funcionar en un pH de 5,5 y con elevada disponibilidad de sustrato, lo que reflejaba las condiciones en el colon proximal, mientras que los recipientes 2 y 3 (300 ml) se hicieron funcionar en unos pHs de 6,2 y 6,8, respectivamente, con baja disponibilidad de sustrato, lo que reflejaba las condiciones en el colon distal. Se cebó el modelo de intestino con ~10% de suspensión fecal (peso/volumen) y se dejó que se equilibrara con respecto a las poblaciones bacterianas durante 14 días.

#### 10 Preparación de los modelos de intestino

Se recogieron muestras fecales de cinco voluntarios sanos de edad avanzada ( $> 65$  años) y se transportaron inmediatamente al laboratorio bajo condiciones anaeróbicas (GasPak, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Se confirmó que las heces eran negativas para cultivo de *C. difficile* en agar CCEY de Brazier que llevaba incorporados 5 mg/l de lisozima (Sigma-Aldrich, Reino Unido), como se comunicó previamente (Baines et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 55: 974-82; Freeman et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, 52: 96-102). Se reunieron las heces negativas para *C. difficile* y se preparó una suspensión (~10%, peso/volumen), filtrada a través de filtros de poro grueso, en disolución salina tamponada con fosfato, estéril y pre-reducida. Se llenaron los recipientes de los modelos de intestino hasta aproximadamente dos tercios de su volumen y se pusieron en marcha las bombas de medio de crecimiento.

#### 20 Enumeración de microflora intestinal y *C. difficile*

Se enumeraron los principales componentes cultivables de la microflora intestinal nativa y de *C. difficile* mediante el recuento de organismos viables ( $\log_{10}$  cfu/ml) en agares selectivos y no selectivos, como se comunicó previamente (Freeman et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 56: 717-25). Los grupos bacterianos enumerados fueron: anaerobios facultativos totales, fermentadores de lactosa facultativamente anaeróbicos, anaerobios totales, bifidobacterias, grupo de *Bacteroides fragilis*, clostridios totales, lactobacilos, enterococos, bacterias *C. difficile* totales y esporas de *C. difficile*. Se cuantificó la producción de citotoxina de *C. difficile* usando un ensayo de citotoxicidad sobre células Vero, como se describió previamente (Freeman et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, 52: 96-102). Los títulos de citotoxina se expresaron en  $\log_{10}$  de unidades relativas (RU; del inglés, *relative units*). En el recipiente 1 del modelo de intestino sólo se enumeraron las cuentas bacterianas totales, las cuentas de esporas y los títulos de citotoxina de *C. difficile*.

#### Diseño experimental del modelo de intestino

Se ha descrito previamente el uso del modelo de intestino para evaluar las intervenciones terapéuticas para una CDI (Freeman et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 60: 83-91; Freeman et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 56: 717-25). En resumen, después de la inoculación de la suspensión fecal en cada modelo de intestino no se realizaron más intervenciones durante 13 días (periodo A). Durante el periodo A, se enumeraron las poblaciones bacterianas cada 2 días. A continuación (día 14), se inoculó un solo inóculo de  $\sim 10^7$  cfu de esporas de *C. difficile* de ribotipo PCR 027 (Freeman et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, 52: 96-102) en el recipiente 1 de cada modelo de intestino, sin más intervenciones durante 7 días (periodo B). De aquí en adelante, se enumeraron las poblaciones bacterianas diariamente. Se instiló otro inóculo simple de esporas de *C. difficile* de ribotipo PCR 027 en el recipiente 1 de cada modelo de intestino (día 21) además de 33,9 mg/l de clindamicina (Pfizer, EE.UU.) cuatro veces al día durante 7 días (periodo C). Con este régimen de instilaciones se pretendía mantener los niveles de clindamicina en el modelo de intestino aproximadamente equivalentes a los observados *in vivo* después de una sola dosis de 600 mg (Brown et al., *Ann. Intern. Med.* 1976, 84: 168-70). Después de la cesación de la instilación de clindamicina, no se realizaron más intervenciones (periodo D) hasta que se observó una producción de alto nivel de citotoxina ( $\geq 4$  RU) durante al menos 2 días consecutivos. El día 39 se inició la instilación de vancomicina (experimento individual, 125 mg/l cuatro veces al día) y oritavancina (experimento individual, 64 mg/l dos veces al día) en cada experimento durante 7 días (periodo E). La vancomicina (Sigma-Aldrich) se preparó en agua destilada, y la oritavancina (Targanta Therapeutics, Cambridge, EE.UU.) se preparó en polisorbato 80 (Sigma-Aldrich) al 0,002% (volumen/volumen en agua destilada), y ambas disoluciones de agente antimicrobiano se esterizaron por filtración ( $0,22 \mu\text{m}$ ) antes de la instilación en el modelo de intestino. Con el régimen de instilaciones de vancomicina se pretendía alcanzar concentraciones de antibiótico que reflejaran las observadas *in vivo* después de un curso estándar de terapia en seres humanos (Young et al., *Gastroenterology* 1985, 89: 1038-45). En el régimen de instilaciones de agente antimicrobiano para la oritavancina se tuvieron en cuenta los límites de solubilidad del fármaco en los medios de cultivo tamponados. Después de la cesación de la instilación terapéutica de agente antimicrobiano se siguieron las poblaciones bacterianas y los títulos de citotoxina durante 15 días más (periodo F).

## Bioensayo de concentraciones activas de antibiótico

No se determinaron las concentraciones de clindamicina en los presentes estudios. Se determinaron las concentraciones de vancomicina y oritavancina en los recipientes de cada modelo de intestino usando un bioensayo interno en placa grande. En resumen, se centrifugaron (16.000xg) muestras (1 ml) de todos los recipientes de cada modelo de intestino y se almacenaron a -20 °C antes del bioensayo. Cien mililitros de agar Mueller-Hinton (Oxoid, Reino Unido) complementado con ácido para-aminobenzoico 1 M fueron esterilizados por tratamiento en autoclave, enfriados a 50 °C e inoculados con 1 ml del organismo indicador *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (con una turbiedad equivalente a la de un patrón 0,5 de McFarland). Se transfirió asépticamente agar fundido a placas Petri de 245 mm<sup>2</sup> (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) y se dejó que solidificara. Se evaluaron las diferencias de los diámetros de las zonas con calibradores diluidos en agua destilada o fluido estéril de modelo de intestino con pH ajustado (5,5, 6,2, 6,8). Puesto que no hubo diferencia apreciable alguna en cuanto al diámetro de la zona en los diferentes diluyentes, se utilizó agua desionizada que contenía polisorbato 80 al 0,002% para todos los calibradores de oritavancina. Los calibradores de vancomicina se prepararon en agua desionizada estéril. Las muestras del modelo de intestino se esterilizaron por filtración (0,22 µm). Se extrajeron veinticinco pocillos (9 mm de diámetro) del agar usando una barrena número 5 para corcho. Se asignaron aleatoriamente a cada pocillo, por triplicado, veinte microlitros de cada dilución al doble del calibrador de vancomicina (1-512 mg/l), el calibrador de oritavancina (1-128 mg/l) o la muestra del modelo de intestino. La oritavancina fue filtrada a 1280 mg/l ya que la filtración en concentraciones menores conduce a pérdidas proporcionales significativas de fármaco a causa de una unión superficial saturable. Se refrigeraron las placas de agar (4 °C) durante 5 horas para permitir la difusión del agente antimicrobiano mientras se minimizaba el crecimiento bacteriano, después de lo cual se incubaron aeróbicamente las placas del bioensayo a 37 °C durante 48 horas. Se midieron los diámetros de las zonas usando calibres precisos hasta 0,01 mm y se produjeron líneas de calibración representando gráficamente el diámetro al cuadrado frente al log<sub>2</sub> de la concentración de agente antimicrobiano. Las concentraciones de agente antimicrobiano desconocidas se leyeron de la línea de calibración para cada placa y se convirtieron en concentraciones reales utilizando una función log<sub>2</sub> inversa. Se promediaron las concentraciones medias de agente antimicrobiano (mg/l) procedentes de los tres duplicados. Los límites de detección para los bioensayos de oritavancina y vancomicina fueron 2 y 8 mg/l, respectivamente.

## Resultados

Las variaciones inter-experimentales en las cuentas viables de bacterias intestinales nativas y bacterias *C. difficile* de ribotipo PCR 027 son muy pequeñas entre los recipientes 2 y 3. Por lo tanto, sólo se presentan los resultados del recipiente 3. Cuando es apropiado se resaltan las diferencias significativas en las observaciones entre los recipientes 2 y 3 de los modelos de intestino. Las cuentas viables de los componentes enumerados de la microflora intestinal nativa fueron estables durante todo el periodo A tanto en el experimento con oritavancina (Figura 8A) como en el experimento con vancomicina (Figura 8B). La instilación de esporas de *C. difficile* de ribotipo PCR 027 (día 14, periodo B) no afectó sustancialmente a las cuentas viables de los componentes enumerados de la microflora intestinal en ningún experimento.

## Efectos de la exposición a clindamicina sobre la microflora intestinal

La instilación de clindamicina (periodo C) provocó acusadas disminuciones de las poblaciones de bifidobacterias (~6 log<sub>10</sub> cfu/ml), que estaban por debajo de los límites de detección (~2 log<sub>10</sub> cfu/ml) al final del periodo C en ambos experimentos (Figuras 8A y 8B). Las cuentas viables de *Bacteroides* y lactobacilos disminuyeron en ~1-2 log<sub>10</sub> cfu/ml en ambos experimentos, mientras que las cuentas viables de enterococos aumentaron en ~2 log<sub>10</sub> cfu/ml. Después de la cesación de la instilación de clindamicina (periodo D), las poblaciones bifidobacterianas permanecieron por debajo de los límites de detección antes de la instilación de oritavancina y vancomicina. Todos los demás componentes de la microflora intestinal nativa recuperaron o sobrepasaron sus concentraciones en el estado estacionario (periodo A).

## Efectos de la instilación de oritavancina y vancomicina sobre la microflora intestinal

La instilación de oritavancina (periodo E) fue seguida de efectos deletéreos menores sobre la microflora intestinal nativa, que fueron enumerados. Las poblaciones de *Bacteroides* y enterococos fueron los únicos grupos bacterianos negativamente afectados por la instilación de oritavancina, disminuyendo en ~1 y 2 log<sub>10</sub> cfu/ml, respectivamente (Figura 8A). Las disminuciones de las poblaciones de *Bacteroides* y enterococos después de la instilación de vancomicina fueron ~6 y 1 log<sub>10</sub> cfu/ml, respectivamente (Figura 8B). Las poblaciones bifidobacterianas permanecieron por debajo de los límites de detección durante el periodo E en ambos experimentos. Después de la cesación de la instilación de oritavancina (periodo F), todas las poblaciones bacterianas recuperaron sus concentraciones en el estado estacionario (periodo A) excepto las bifidobacterias, que permanecieron por debajo de los límites de detección (Figura 8A). Después de la cesación de la instilación de vancomicina, todas las poblaciones

bacterianas intestinales nativas recuperaron sus concentraciones en el estado estacionario (periodo A) salvo las bifidobacterias, que fueron  $\sim 2 \log_{10}$  cfu/ml menores (Figura 8B). No se recuperaron bacterias *C. difficile* durante el periodo estacionario (periodo A) en ningún experimento. En ausencia de instilación de clindamicina (periodo B), las bacterias *C. difficile* de ribotipo PCR 027 permanecieron como esporas en todos los recipientes del modelo de intestino (datos para los recipientes 1 y 2 no mostrados) en ambos experimentos (Figuras 9A y 9B). Los números de *C. difficile* disminuyeron en  $\sim 1 \log_{10}$  cfu/ml en el recipiente 3 y a un ritmo similar durante el periodo B en ambos experimentos, y no se detectó producción de citotoxina.

#### Efectos de la exposición a clindamicina sobre *C. difficile*

Las bacterias *C. difficile* permanecieron como esporas durante la instilación de clindamicina (periodo C) en ambos experimentos con oritavancina y vancomicina (Figuras 9A y 9B). Además, no se detectó producción de citotoxina durante este periodo. Después de la cesación de la instilación de clindamicina (periodo D), las bacterias *C. difficile* permanecieron como esporas, las cuales estaban en los límites de detección 5 días después de la cesación de la instilación de clindamicina en el experimento con oritavancina (Figura 9A). En el mismo periodo durante el experimento con vancomicina, los números de esporas de *C. difficile* disminuyeron durante los 2 primeros días del periodo D, después de los cuales los números de esporas de *C. difficile* aumentaron en  $\sim 1 \log_{10}$  cfu/ml (Figura 9B). Se detectó germinación de esporas de *C. difficile* 6 y 7 días después de la cesación de la instilación de clindamicina en los experimentos con oritavancina y vancomicina, respectivamente. Los números de bacterias *C. difficile* vegetativas aumentaron acusadamente hasta unas cuentas viables máximas de  $\sim 6 \log_{10}$  cfu/ml en ambos experimentos. Se detectó producción de citotoxina el día 35 en ambos experimentos, producción que alcanzó unos títulos máximos de 5 RU en ambos experimentos. La instilación de agentes antimicrobianos de tratamiento comenzó el día 39 en ambos experimentos. No se observaron germinación de esporas, proliferación ni producción de alto nivel de citotoxina de *C. difficile* en el recipiente 1 del modelo de intestino en ninguno de los experimentos con oritavancina y vancomicina durante el periodo D (datos no mostrados).

#### Efectos de la instilación de oritavancina sobre *C. difficile*

Las cuentas totales de *C. difficile* estaban  $\sim 2 \log_{10}$  cfu/ml por encima de las cuentas de esporas ( $6 \log_{10}$  cfu/ml) cuando comenzó la instilación de oritavancina (periodo E, Figura 9A). El día 2 de la instilación de oritavancina, tanto las cuentas totales como las cuentas de esporas de *C. difficile* disminuyeron en  $\sim 2 \log_{10}$  cfu/ml, y quedaron por debajo de los límites de detección ( $\sim 1,22 \log_{10}$  cfu/ml) 1 día más tarde, permaneciendo así durante el resto del periodo E. Los títulos de citotoxina disminuyeron en 3 RU durante la instilación de oritavancina (periodo E). Las concentraciones de oritavancina alcanzaron unos valores máximos de 128, 109 y 52 mg/l en los recipientes 1, 2 y 3, respectivamente, es decir,  $\sim 8$  veces menores que las alcanzadas en el modelo de intestino con vancomicina. Es posible que la concentración de oritavancina demostrada en muestras de cultivo del modelo de intestino pueda estar infrarrepresentada a causa de una potencial pérdida después de la filtración ya que las concentraciones eran  $< 1280$  mg/l. Todos los valores  $R^2$  de la línea de calibración fueron  $> 0,95$ .

#### Efectos de la instilación de vancomicina sobre *C. difficile*

Las cuentas totales de *C. difficile* disminuyeron en  $\sim 1,5 \log_{10}$  cfu/ml después de 1 día de instilación de vancomicina (periodo E, Figura 9B). Las cuentas de esporas de *C. difficile* resultaron inafectadas por la instilación de vancomicina, y las bacterias *C. difficile* permanecieron predominantemente como esporas durante el resto del periodo E. Los títulos de citotoxina disminuyeron en 3 RU durante la instilación de vancomicina. Las concentraciones de vancomicina alcanzaron unos valores máximos de 957, 800 y 423 mg/l en los recipientes 1, 2 y 3 del modelo de intestino, respectivamente. Todos los valores  $R^2$  de la línea de calibración fueron  $> 0,99$ .

#### Eventos después de la cesación de la instilación de oritavancina

Se aisló esporádicamente *C. difficile* en los límites de detección durante el resto del experimento (periodo F, Figura 9A). La centrifugación y el lavado de las muestras de cultivo, además de la exposición a carbón vegetal activado (20-40 g/l) en un esfuerzo para minimizar la retención de oritavancina, no potenciaron la recuperación de *C. difficile* (datos no mostrados). Los títulos de citotoxina continuaron disminuyendo y quedaron por debajo de los límites de detección en 10 días. Las concentraciones de oritavancina estaban por debajo de los límites de detección 11 días después de la cesación de la instilación de oritavancina.

#### Eventos después de la cesación de la instilación de vancomicina

Las bacterias *C. difficile* permanecieron como esporas hasta 12 y 13 días después de la cesación de la instilación de vancomicina en los recipientes 2 (datos no mostrados) y 3, respectivamente (periodo F, Figura 9B), después de lo cual se observaron germinación, proliferación y producción de alto nivel de citotoxina recurrentes. Las cuentas

totales de *C. difficile* fueron  $\sim 6 \log_{10}$  cfu/ml y los títulos de citotoxina fueron 5 RU al final del experimento.

Estos resultados demuestran que tanto la oritavancina como la vancomicina eran eficaces en cuanto a inhibir bacterias *C. difficile* vegetativas. La instilación de vancomicina facilitó la inhibición de las bacterias *C. difficile* vegetativas de modo que sólo quedaron esporas de *C. difficile* en los recipientes del modelo de intestino 1 día después del inicio de la instilación de vancomicina. Las esporas de *C. difficile* resultaron inafectadas por la presencia de concentraciones de vancomicina que estaban  $> 500$  veces por encima de la MIC para formas vegetativas de *C. difficile* de ribotipo PCR 027 (O'Connor et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; doi: 10.1093/jac/dkn276). La incapacidad de la vancomicina para generar actividad inhibitoria contra esporas de *C. difficile* en las concentraciones observadas en heces ha sido previamente comunicada y respalda los datos presentados en este estudio (Freeman et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 56: 717-25; Levett, *J. Antimicrob. Chemother.* 1991, 27: 55-62; Walters et al., *Gut* 1983, 24: 206-12). Además, después de una disminución de las concentraciones de vancomicina por debajo de los límites de detección en los recipientes 2 y 3 del modelo de intestino durante el periodo F, se observó otro episodio de germinación de esporas, proliferación y producción de alto nivel de citotoxina de *C. difficile*.

La oritavancina redujo rápidamente los números tanto de la forma vegetativa como de la forma de esporas de *C. difficile* a pesar de concentraciones máximas activas de agente antimicrobiano  $\sim 8$  veces menores que las de la vancomicina. Estas concentraciones activas de oritavancina fueron 25 y 200 veces mayores que la MIC para *C. difficile* de ribotipo PCR 027 cuando se midieron mediante los métodos de incorporación a agar y macrodilución en caldo, respectivamente (O'Connor et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; doi: 10.1093/jac/dkn276). A pesar de los esfuerzos para eliminar la oritavancina activa de las muestras de cultivo mediante lavado y adsorción por carbón vegetal, no se pudieron recuperar otras bacterias *C. difficile* que las colonias individuales esporádicamente aisladas en los límites de detección. Por lo tanto, en los presentes estudios se observó una acusada diferencia en el efecto de la oritavancina contra esporas de *C. difficile* en comparación con la vancomicina. De hecho, se observó recientemente que la inhibición del desarrollo de esporas de *C. difficile* de ribotipo PCR 027 expuestas a oritavancina (10 mg/l) persistía después de que el fármaco hubiera sido eliminado por lavado, no observándose este efecto en las esporas expuestas a metronidazol ni a vancomicina. Ningún agente antimicrobiano examinado demostró actividad inhibitoria alguna de la germinación de esporas en concentraciones supra-MIC; por lo tanto, parece que la oritavancina posee actividad contra el desarrollo de esporas de *C. difficile*. No se observó recrudescimiento de la germinación de esporas, la proliferación ni la producción de alto nivel de citotoxina de *C. difficile* en el presente estudio durante el periodo F después de la instilación de oritavancina, en contraste directo con la vancomicina, ni siquiera después de que las concentraciones de agente antimicrobiano disminuyeran por debajo de los límites de detección.

Se ha demostrado previamente que la oritavancina se une a superficies, un efecto suprimido por polisorbato 80 al 0,002% (Arhin et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52: 1597-603). Se incorporó polisorbato 80 al medio de crecimiento del modelo de intestino (0,2%, volumen/volumen) y, por lo tanto, la unión a superficies en el modelo de intestino con resultante actividad antimicrobiana continuada por debajo de los límites de detección del bioensayo es una explicación improbable de la incapacidad para aislar esporas de *C. difficile* durante grandes tramos del periodo F en el presente estudio. Aunque la disminución de los títulos de citotoxina de *C. difficile* fue similar durante el periodo E (3 RU) tanto en el experimento con oritavancina como en el experimento con vancomicina, llevó más tiempo (5 días) que los títulos de citotoxina disminuyeran hasta niveles indetectables en el experimento con oritavancina.

En conclusión, tanto la oritavancina como la vancomicina eliminaron eficazmente bacterias *C. difficile* vegetativas del modelo de intestino, pero sólo la oritavancina demostró una actividad potencial contra las esporas. Con la vancomicina se observó recrudescimiento de esporas de *C. difficile* de ribotipo PCR 027 después de la disminución de los niveles de antibiótico hasta por debajo de los límites de detección, pero este fenómeno no se vio con la oritavancina. Estos hallazgos sugieren que la oritavancina puede tener una ventaja terapéutica sobre la vancomicina en términos de actividad anti-esporas.

Ejemplo 5 – Evaluación de la eficacia de la administración intravenosa de oritavancina en el modelo de CDI en hámster

Métodos

50 Cepa bacteriana

Se utilizó *C. difficile* ATCC 43255 en todos los experimentos. Esta cepa fue originalmente aislada de una herida abdominal y es toxina A+/B+ y toxina binaria negativa. Se prepararon esporas de *C. difficile* para la infección incubando anaeróticamente células de *C. difficile* en una placa de agar sangre a 37 °C durante 7 días para promover la formación de esporas. Las colonias de *C. difficile* fueron resuspendidas en disolución salina tamponada

con fosfato (PBS; del inglés, *phosphate buffered saline*) y mezcladas con un volumen igual de etanol al 100% durante una hora. Las esporas fueron centrifugadas, resuspendidas en PBS, divididas en partes alícuotas y congeladas a -20 °C. Las esporas fueron diluidas en PBS para su inoculación oral en hámsteres.

Modelo de infección por *C. difficile* (CDI) en hámster

5 Todos los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos que fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee. Se pretrataron machos de hámster dorado sirio (65-80 g; Harlan, Indianápolis, Indiana, EE.UU.) con una sola dosis subcutánea de clindamicina (100 mg/kg) un día antes de la infección (Día -1). Un día más tarde (Día 0), los animales fueron infectados oralmente con  $10^5$  esporas de *C. difficile* mediante introducción oral en el estómago con un tubo.

10 Antibioterapia

Comenzando el Día 1 después de la infección, se administró intravenosamente (sublingual) vehículo, vancomicina (50 mg/kg), u oritavancina (50 mg/kg) formulada en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HPCD) al 10% a los hámsteres (n = 10/grupo). Se inyectó un total de 1, 2 o 3 dosis de oritavancina los Días 1, 3 y 5, respectivamente (cada dos días). En el grupo de comparación, los hámsteres recibieron un total de 3 dosis de vancomicina administradas los Días 1, 3 y 5. Se observaron los animales en cuanto a cualquier signo de enfermedad hasta el punto final experimental y se registró la supervivencia.

Resultados

Se indujo una CDI en hámsteres (n = 10/grupo) preparando con clindamicina el Día -1 e infectando luego con *C. difficile* 24 horas más tarde (Día 0). Los hámsteres infectados recibieron la primera dosis de antibiótico el Día 1 y se repitió el tratamiento cada dos días durante hasta cinco días; se empleó un grupo no tratado como testigo.

25 Todos los animales no tratados desarrollaron una CDI, según se evaluó por los signos clínicos, y murieron o fueron sacrificados en estado moribundo el Día 5 (Figura 10). Tres dosis intravenosas de 50 mg/kg de vancomicina cada dos días prolongaron la supervivencia en 8 días en comparación con los animales no tratados (Figura 10). Sin embargo, el 70% de los animales tratados con vancomicina murieron entre las inyecciones segunda y tercera los Días 3 y 5, respectivamente. Como resultado, el Día 5, los índices de supervivencia proporcional fueron 0% para los animales no tratados y 30% para los animales tratados con vancomicina. Por contraste, los animales que habían recibido intravenosamente oritavancina en una cantidad de 50 mg/kg una, dos o tres veces cada dos días durante 5 días presentaban una supervivencia proporcional aumentada con respecto a los animales no tratados, con una supervivencia prolongada en 4, 5 y 7 días más con respecto a los animales no tratados, respectivamente (Figura 10). Este hallazgo indicaba la eficacia de la oritavancina, dependiente de la dosis. Los animales que habían recibido 2 dosis de oritavancina sobrevivieron 5 días más que aquellos que habían recibido unas dosis y un régimen de administración equivalentes (2x, cada dos días) con vancomicina (Figura 10).

Ejemplo 6 – Evaluación de la eficacia de la administración oral de oritavancina en el modelo de CDI en hámster

Métodos

35 Cepa bacteriana

Se empleó *C. difficile* (CD) ATCC 43255 en todos los experimentos. Se prepararon esporas de CD para la infección incubando anaeróbicamente células de CD en una placa de agar sangre a 37 °C durante 7 días para promover la formación de esporas. Las colonias de CD fueron resuspendidas en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y mezcladas con un volumen igual de etanol al 100% durante una hora. Las esporas fueron centrifugadas, resuspendidas en PBS, divididas en partes alícuotas y congeladas a -20 °C. Las esporas fueron diluidas en PBS para su inoculación oral en hámsteres.

Modelo de infección por CD (CDI) en hámster

45 Todos los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos que fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee. Se pretrataron machos de hámster dorado sirio (65-80 g) con una sola dosis subcutánea de clindamicina (CL; 100 mg/kg) un día antes de la infección (Día -1). Un día más tarde (Día 0), los animales fueron infectados oralmente con  $10^5$  esporas de CD.

Antibioterapia

1) Comenzando el Día 1 después de la infección (PI; del inglés, *post-infection*), se administró una sola dosis de

vehículo, vancomicina (VA; 50 mg/kg/día) u oritavancina (ORI; 10, 50 o 100 mg/kg/día) formulada en hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPCD) al 10% a los hámsteres (n = 10/grupo) durante 5 días mediante introducción oral en el estómago con un tubo. 2) Se administró oralmente ORI formulado en polietilenglicol 400 (PEG400) a los hámsteres (n = 5/grupo) el Día 2 durante 5 días. Se observaron los animales en cuanto a cualquier signo de enfermedad hasta el punto final experimental (Día 20) y se registró la supervivencia.

#### Detección de CD en contenidos cecales

Se llevó a cabo la detección de células y toxinas de CD en los contenidos cecales de los animales en los puntos finales tanto experimental como clínico. Se detectó la presencia de toxinas de CD (toxinas A y B) usando el kit CD TOX A/B II™ (Techlab) del modo descrito por el fabricante. Los límites de detección eran  $\geq 0,8$  ng/ml para la toxina A y  $\geq 2,5$  ng/ml para la toxina B. Se enumeraron las células viables totales (TC; del inglés, total cells) (formas tanto vegetativas como de esporas) diluyendo sucesivamente el contenido cecal por un factor de 10 en PBS que contenía Oxyrase al 2% (Oxyrase Inc.). Las diluciones del contenido cecal se sembraron en agar CCEY de Brazier-lisozima (Lab160) sin yema de huevo. Se contaron las esporas de CD tratando las muestras del intestino ciego con un volumen igual de etanol puro. Los límites de detección (LOD; del inglés, limits of detection) fueron 1,47 y 1,77  $\log_{10}$  cfu/g de contenido cecal para las TC y las esporas, respectivamente.

#### Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante el análisis de supervivencia por las pruebas de Kaplan-Meier, Wilcoxon y logaritmo de intervalos usando GraphPad Prism (versión 5.00). Se consideró que un valor p inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) indica significación estadística.

#### Resultados

Como se muestra gráficamente en la Figura 11A, después del tratamiento con CL sola, sólo el 50% de los hámsteres sobrevivió hasta el día 20, produciéndose todas las muertes entre los Días 6 y 8 PI. La estimulación con esporas de CD de los hámsteres preparados con CL condujo a un 0% de supervivencia el Día 4 PI.

Como se muestra gráficamente en la Figura 11B, la eficacia de ORI era dependiente de la dosis. La ORI inyectada en cantidades de 10, 50 y 100 mg/kg una vez al día (formulada en HPCD) durante 5 días prolongó la supervivencia en 9, 13 y  $\geq 17$  días más, respectivamente, en relación a los animales no tratados ( $p < 0,0001$  para cada grupo). La ORI en una cantidad de 100 mg/kg presentaba una eficacia superior a la de VA el Día 12 PI. El tiempo medio de supervivencia de los hámsteres tratados con ORI en una cantidad de 100 mg/kg fue 17 días en comparación con los 12 días para los tratados con VA ( $p < 0,0001$ ). Los contenidos cecales de todos los hámsteres muertos fueron positivos para las toxinas A y B de CD.

En la Figura 11C se muestran gráficamente los resultados de los tratamientos orales iniciados el Día 1 o el Día 2 durante 5 días con VA en una cantidad de 50 mg/kg una vez al día o con ORI en una cantidad de 100 mg/kg una vez al día, respectivamente. Todos los animales tratados con ORI sobrevivieron y ninguno de ellos mostró signo alguno de enfermedad hasta 20 días PI. Se detectaron altos niveles de toxinas A y B en los contenidos cecales de los animales no tratados y los animales tratados con VA, mientras que las toxinas A y B resultaron indetectables en el contenido cecal de los animales tratados con ORI el Día 20 PI.

Como se muestra en la Figura 11D, a los 20 días PI las células vegetativas y esporas de CD eran indetectables en el contenido cecal de todos los hámsteres tratados con ORI formulada en PEG400. Los límites de detección (LOD) fueron 1,47 y 1,77  $\log_{10}$  cfu/g de contenido cecal para las TC y las esporas, respectivamente.

La invención de esta solicitud ha sido anteriormente descrita tanto genéricamente como en relación con realizaciones específicas. La invención no está por lo demás limitada, salvo en la relación de las reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para inhibir el desarrollo de una espora de *C. difficile*, que comprende poner una espora de *C. difficile* en contacto con un antibiótico glicopeptídico en una cantidad suficiente para inhibir el desarrollo de una espora de *C. difficile*, inhibiéndose por ello el desarrollo de una espora de *C. difficile*, en donde dicho antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos.
- 10 2. El método de la Reivindicación 1, que comprende inhibir el desarrollo de una espora de *C. difficile* y el crecimiento de una forma vegetativa de *C. difficile*, método que comprende poner una espora de *C. difficile* y una forma vegetativa de *C. difficile* en contacto con un antibiótico glicopeptídico como el definido en la Reivindicación 1 en una cantidad suficiente para inhibir tanto el desarrollo de una espora de *C. difficile* como el crecimiento de una forma vegetativa de *C. difficile*, inhibiéndose por ello tanto el desarrollo de una espora de *C. difficile* como el crecimiento de una forma vegetativa de *C. difficile*.
- 15 3. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico glicopeptídico para uso en el tratamiento de una infección por *C. difficile* en un sujeto, en donde dicho antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos, y en donde dicho antibiótico es para la administración a un sujeto que tiene una infección por *C. difficile* en forma de una espora de *C. difficile* o una mezcla de una espora de *C. difficile* y una célula vegetativa de *C. difficile*.
- 20 4. La composición para uso de la Reivindicación 3, en donde dicho antibiótico inhibe:  
(i) el desarrollo de una espora de *C. difficile*; o  
(ii) el desarrollo de una espora de *C. difficile* y el crecimiento de una forma vegetativa de *C. difficile*.
- 25 5. La composición para uso de la Reivindicación 3 o 4, en donde dicho antibiótico glicopeptídico es para administración intravenosa o administración oral.
6. La composición para uso de la Reivindicación 3 o 4, en donde dicho antibiótico glicopeptídico es para administración oral.
- 30 7. La composición para uso de cualquiera de las Reivindicaciones 3 a 6, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del antibiótico glicopeptídico es entre 5 y 30 mg/kg de peso corporal.
8. El método de la Reivindicación 1 o 2 o la composición para uso de cualquiera de las Reivindicaciones 3 a 5, en donde dicho antibiótico glicopeptídico está en forma de una composición farmacéutica que comprende el antibiótico glicopeptídico y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 35 9. El uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico glicopeptídico, en donde dicho antibiótico glicopeptídico es oritavancina, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o una mezcla de los mismos, en la fabricación de un medicamento para tratar una infección por *C. difficile* en un sujeto, en donde dicho antibiótico es para la administración a un sujeto que tiene una infección por *C. difficile* en forma de una espora de *C. difficile* o una mezcla de una espora de *C. difficile* y una célula vegetativa de *C. difficile*.
10. El uso de la Reivindicación 9, en donde dicho antibiótico glicopeptídico es como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 8.



Figura 1

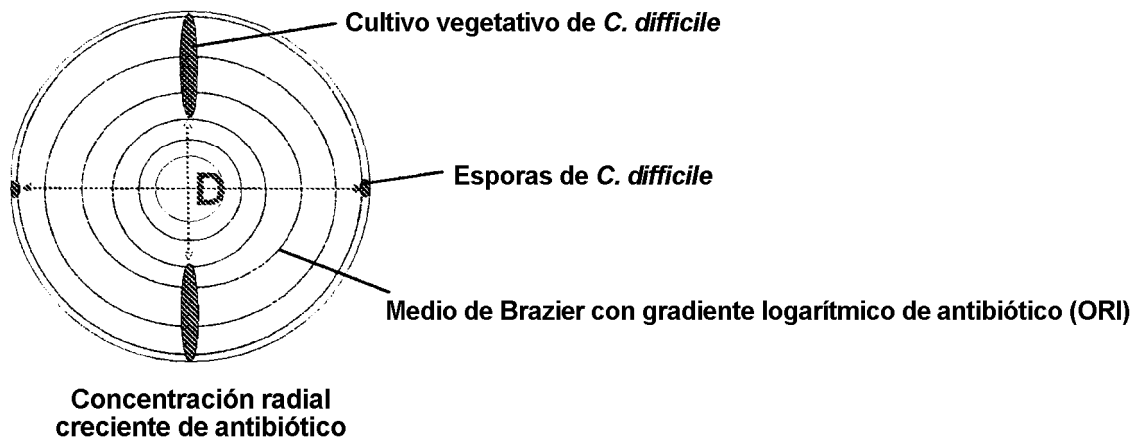


Figura 2

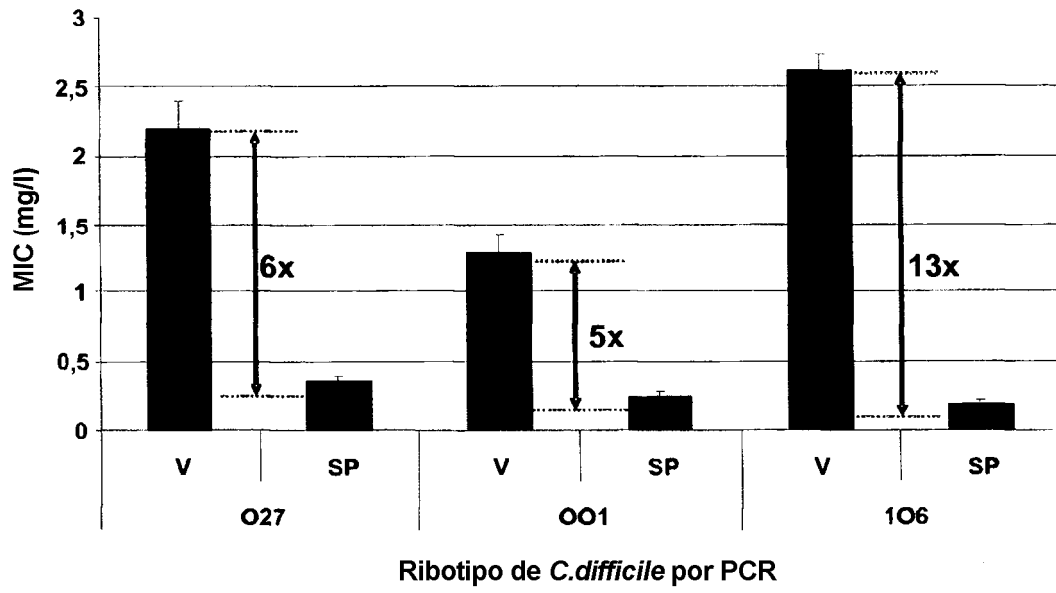


Figura 3

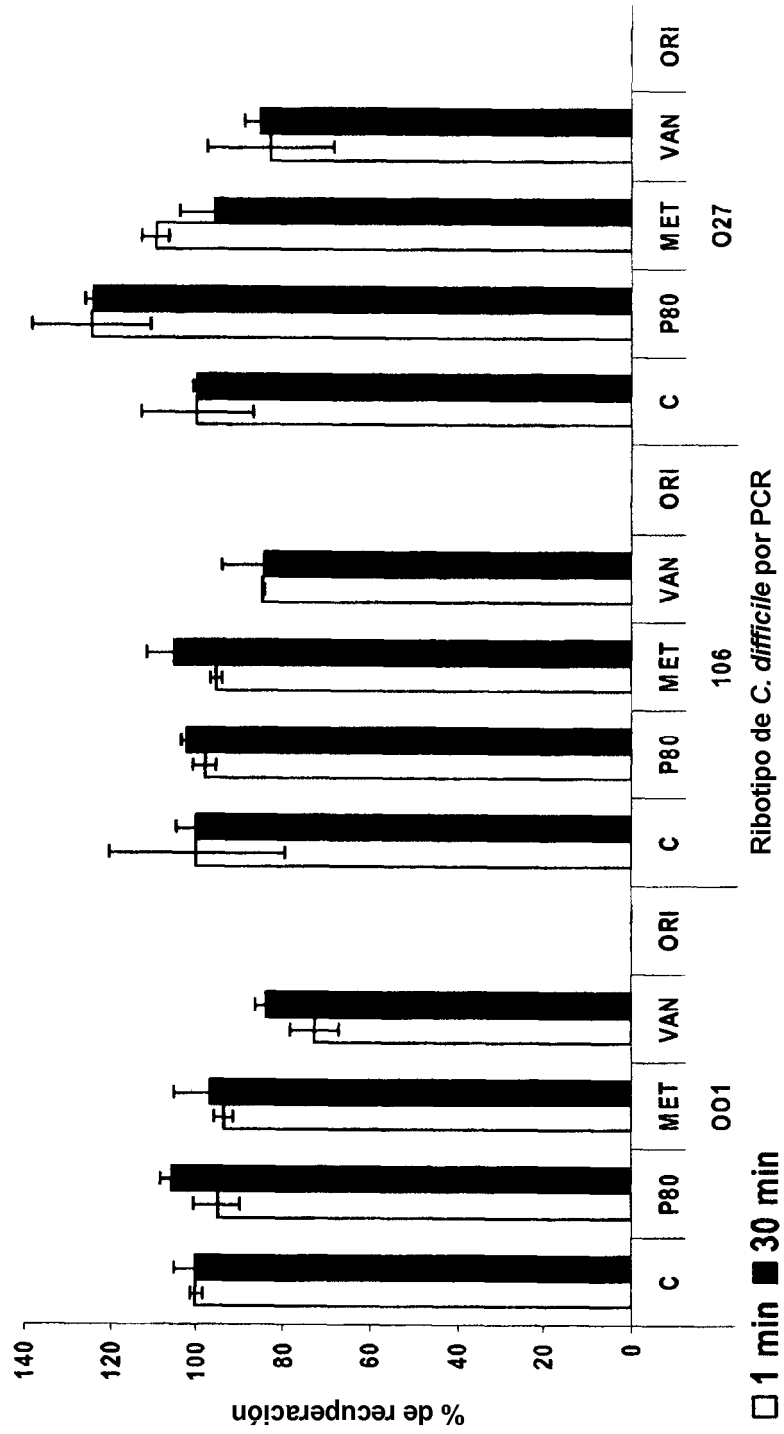


Figura 4

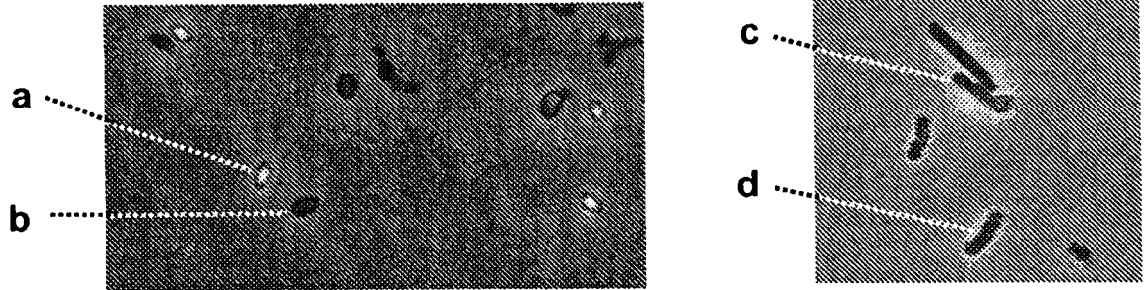


Figura 5

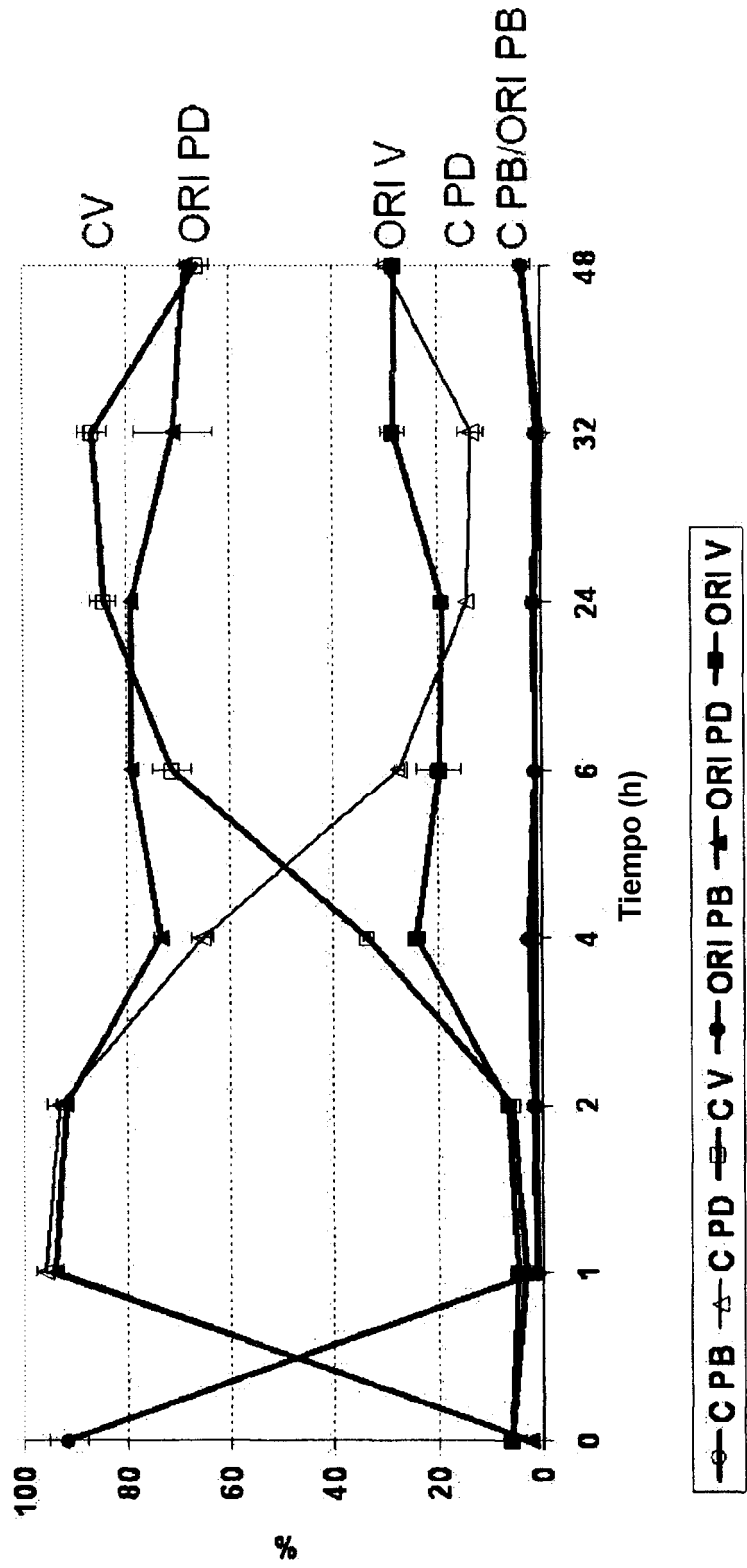


Figura 6

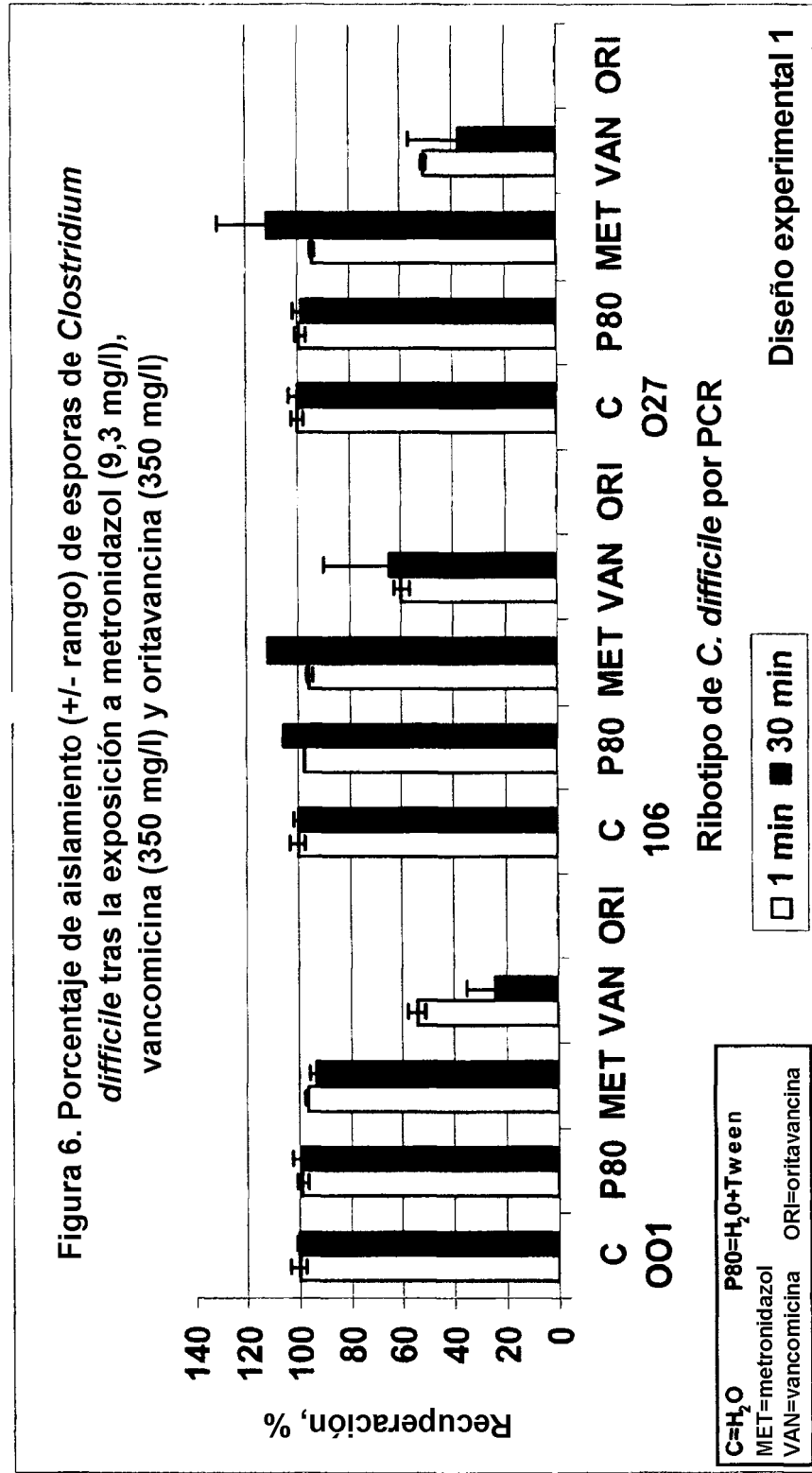


Figura 7

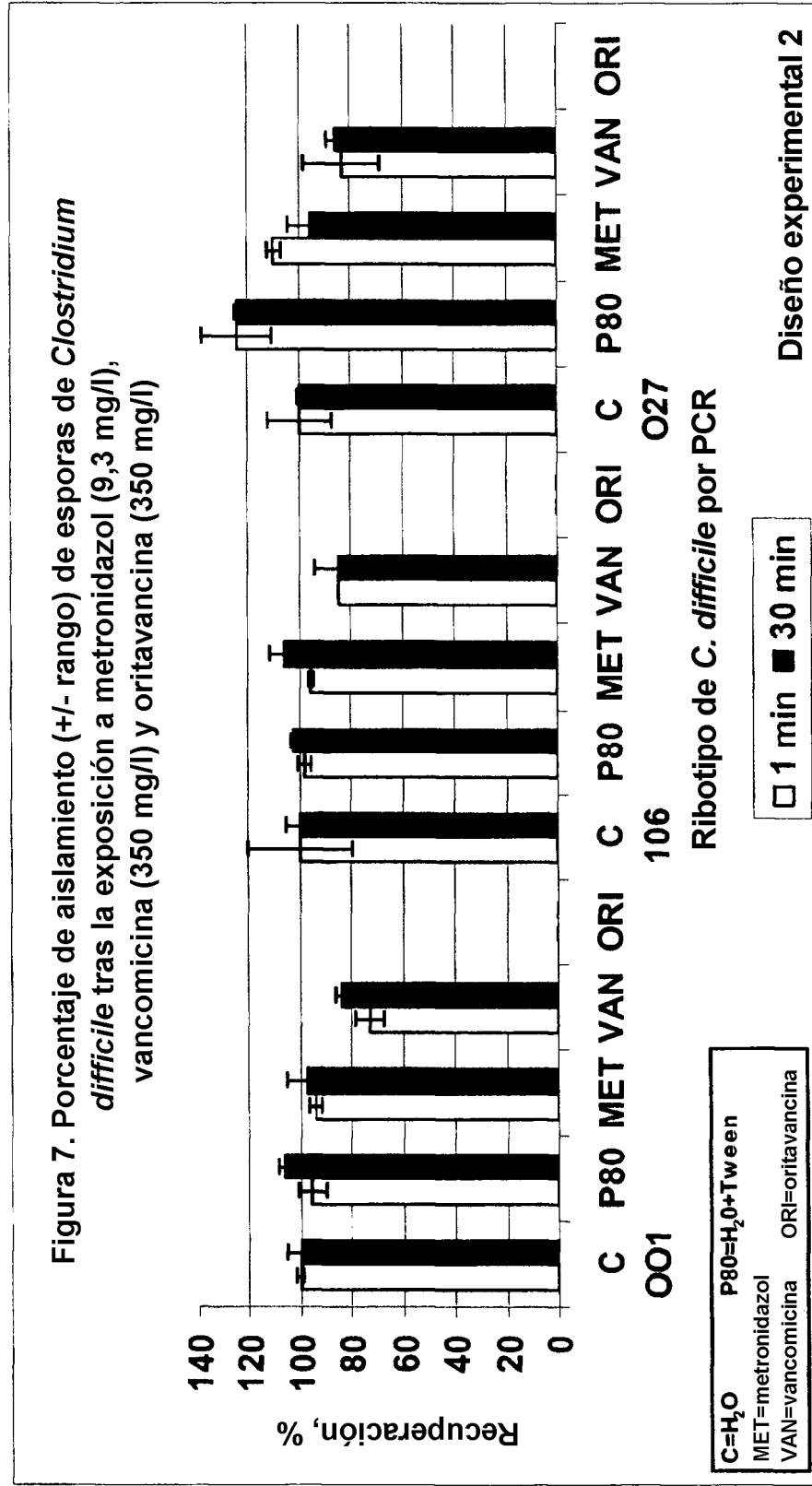


Figura 8A

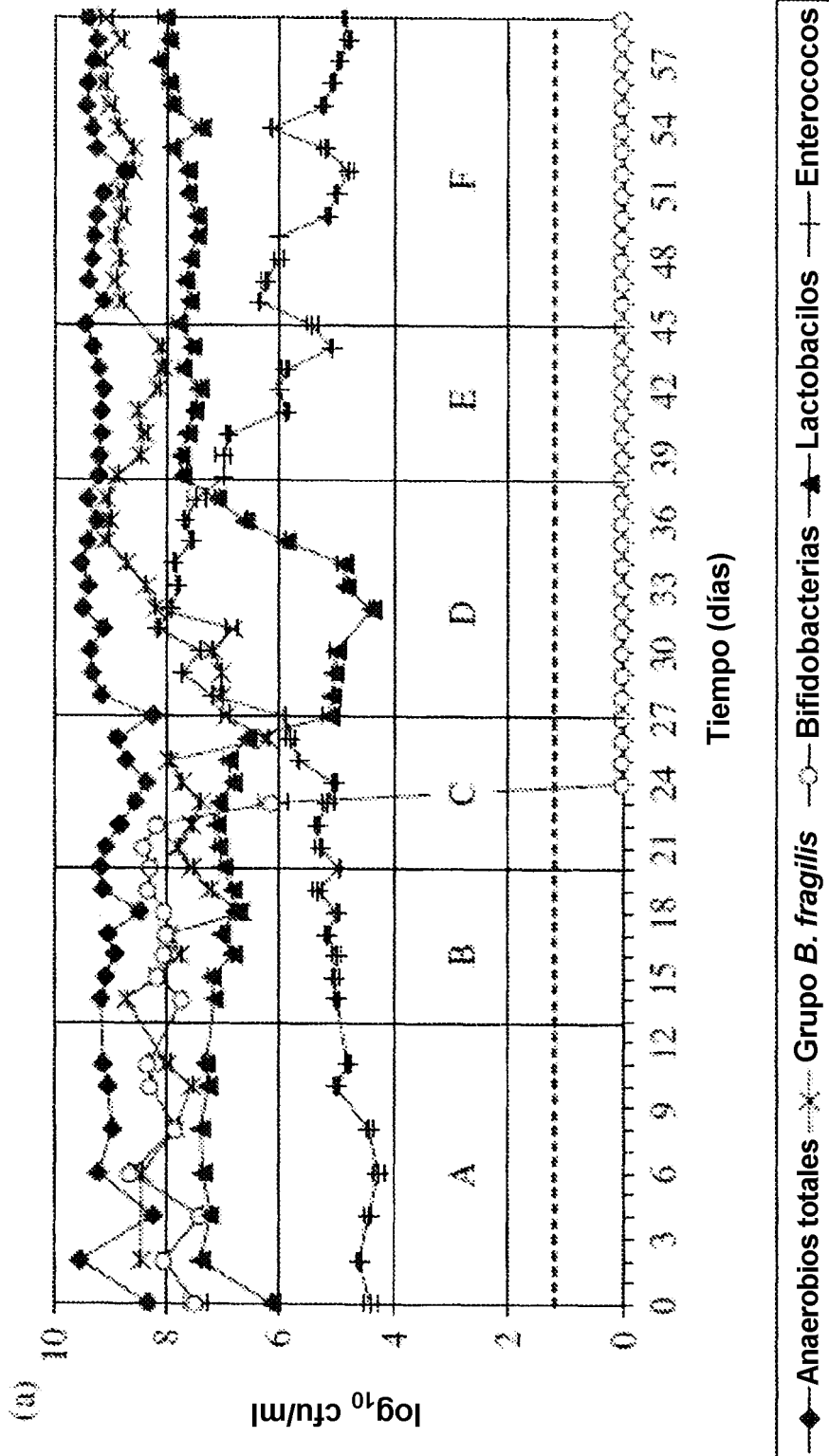




Figura 8B

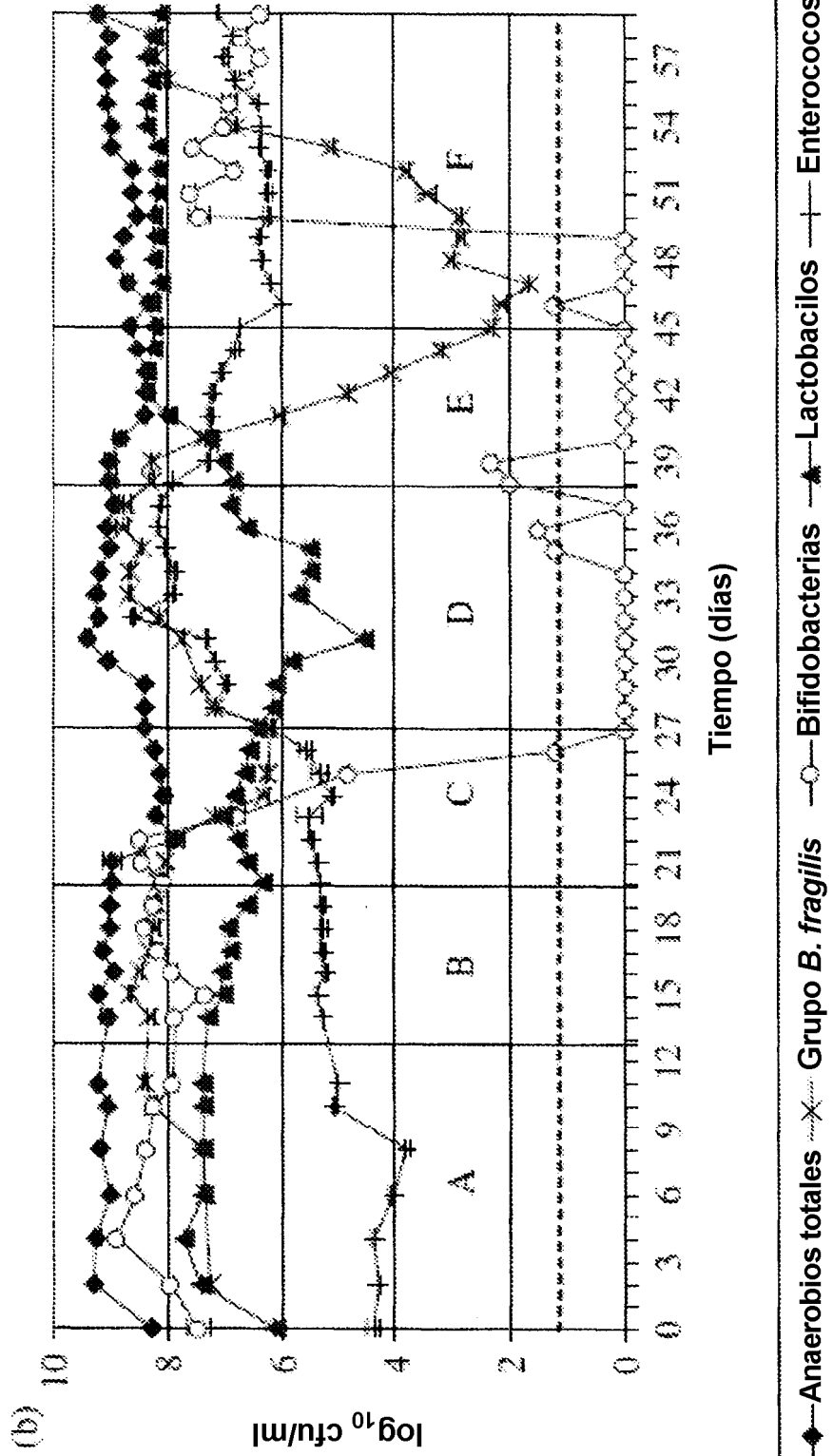


Figura 9A

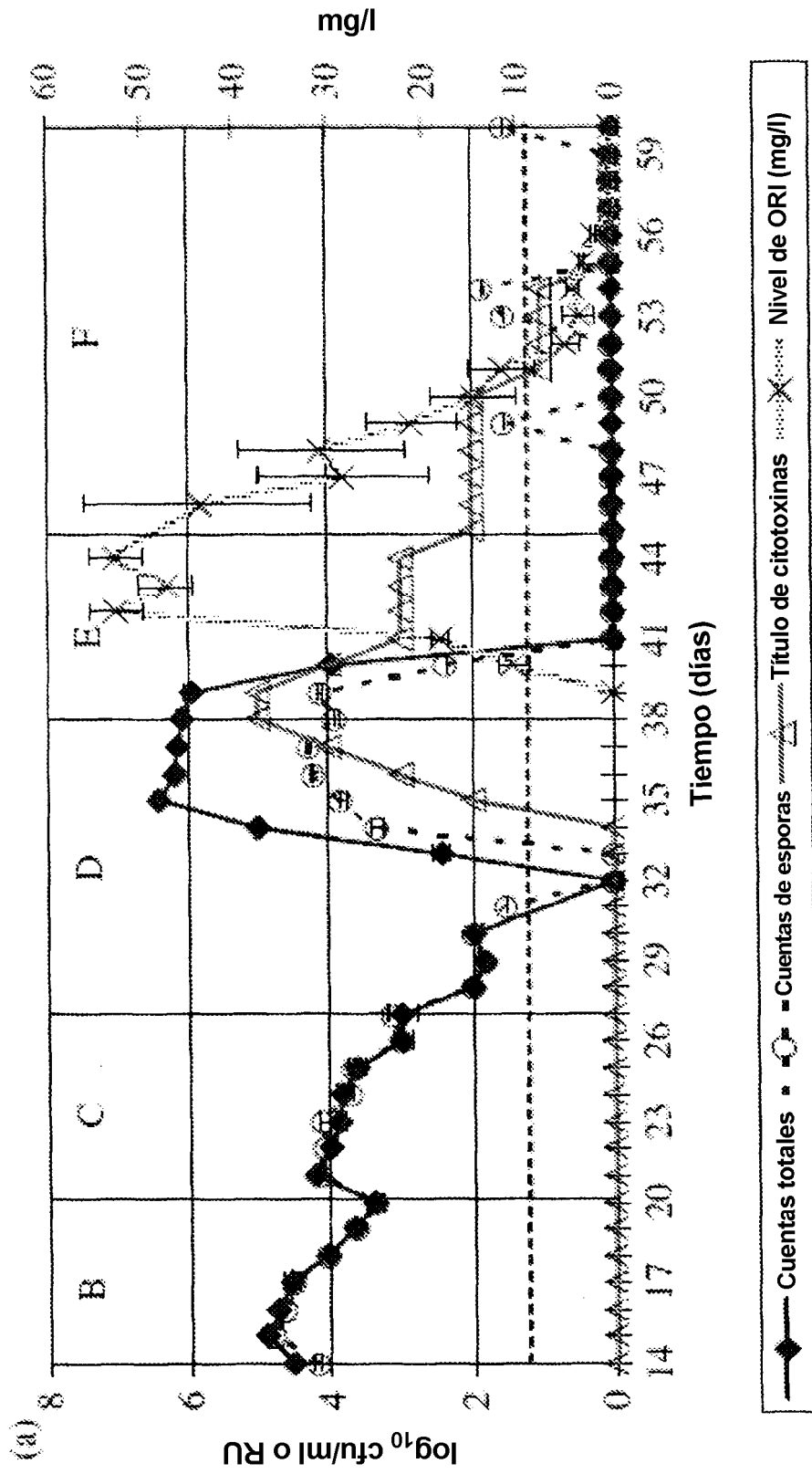
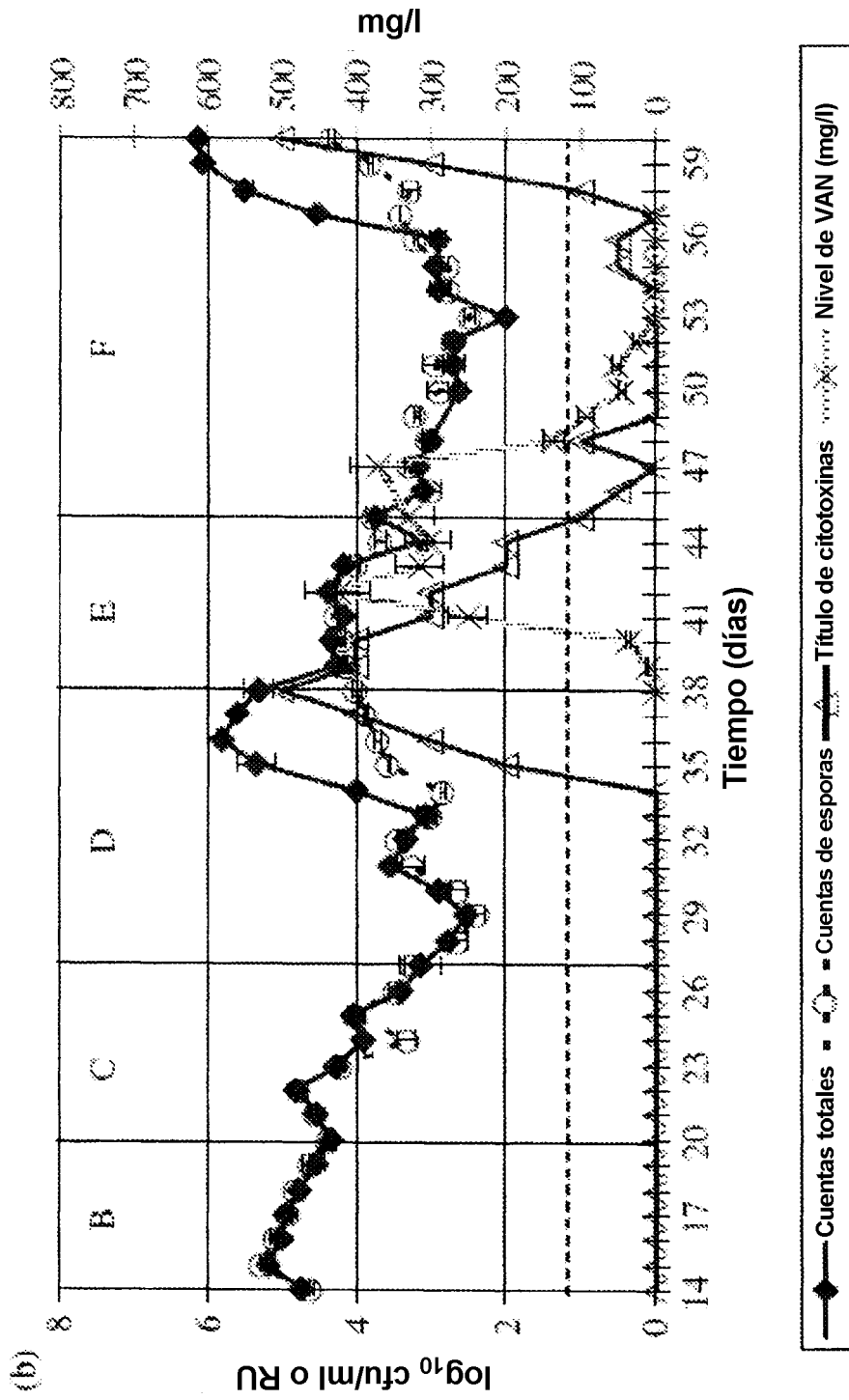


Figura 9B



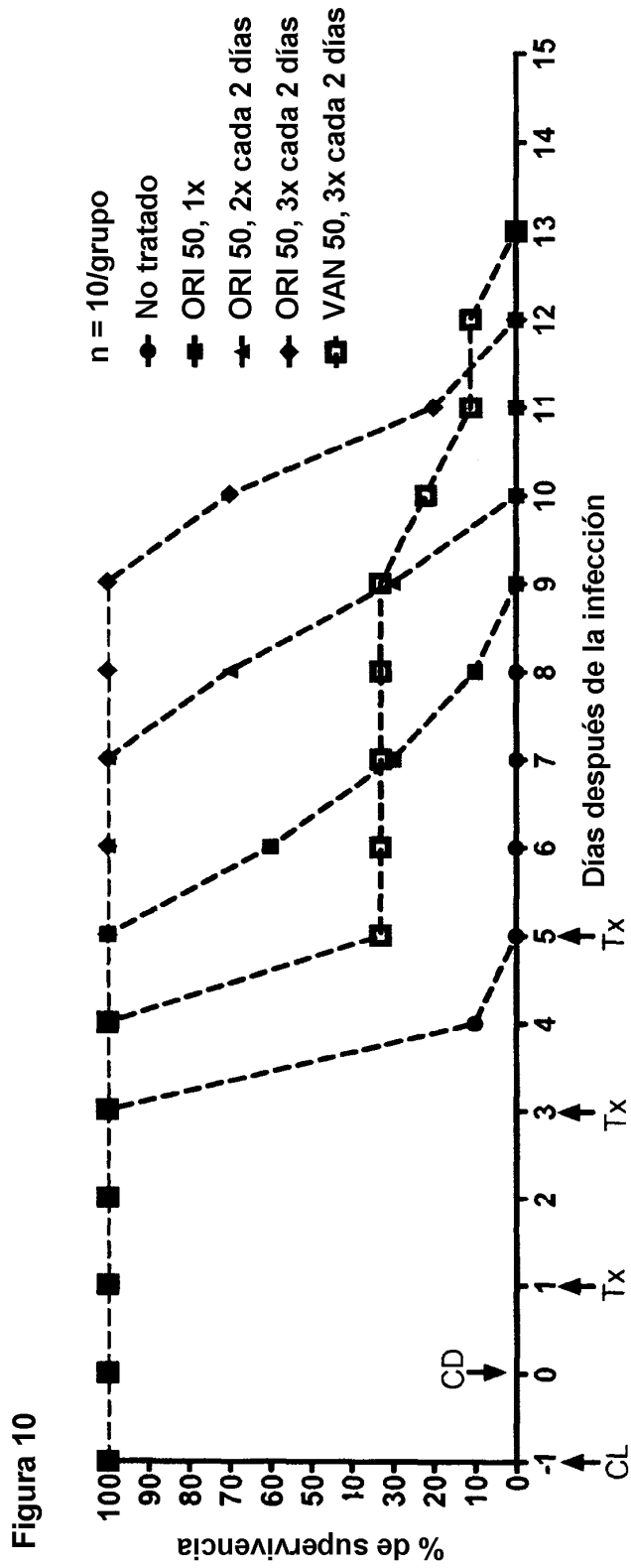


Figura 11A

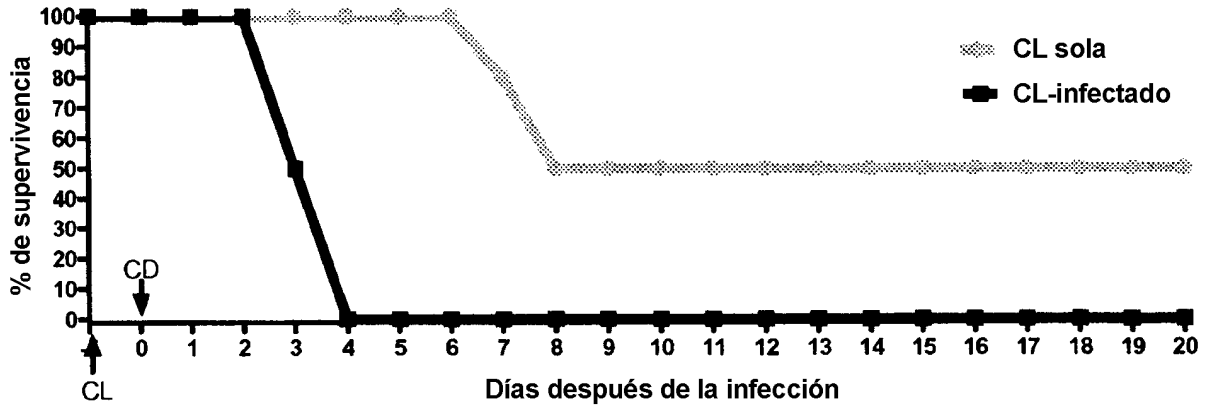


Figura 11B

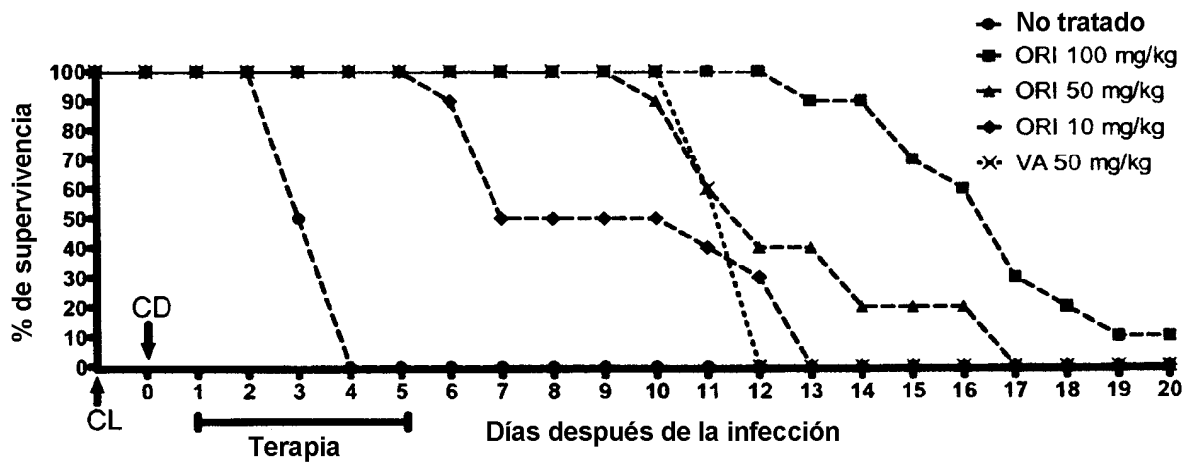


Figura 11C

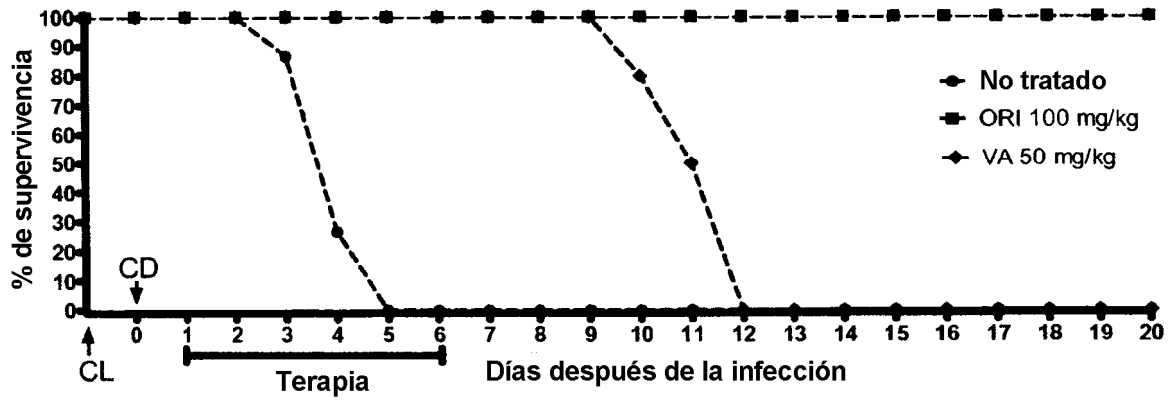


Figura 11D

