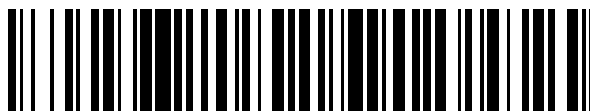


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 281**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 5/097** (2006.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2001 E 10174862 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2264047**

54 Título: **Lipopéptidos de alta pureza, micelas de lipopéptidos y procesos para preparar los mismos**

30 Prioridad:

**20.01.2000 US 177170 P**

**28.11.2000 US 735191**

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

**02.10.2015**

73 Titular/es:

**CUBIST PHARMACEUTICALS LLC (100.0%)**

**65 Hayden Avenue**

**Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**KELLEHER, THOMAS J.;**

**LAI, JAN-JI;**

**DECOURCEY, JOSEPH P.;**

**ZENONI, MAURIZIO y**

**TAGLIANI, AURO R.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 547 281 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

**Lipopéptidos de alta pureza, micelas de lipopéptidos y procesos para preparar los mismos**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente divulgación se refiere a una forma altamente purificada de lipopéptidos, incluyendo daptomicina, un antibiótico de lipopéptidos con actividad bactericida potente contra bacterias gram  
positivas, incluyendo cepas que son resistentes a antibióticos convencionales. La presente invención se  
refiere a un proceso para preparar la forma altamente purificada de la daptomicina de lipopéptidos. La  
10 presente divulgación se refiere además a micelas de lipopéptidos. La presente divulgación también se  
refiere a composiciones farmacéuticas de las micelas de lipopéptidos y métodos para usar estas  
composiciones. La presente invención también se refiere a métodos de hacer micelas de daptomicina a  
partir de monómeros no asociados de daptomicina, y para convertir micelas de daptomicina a monómeros  
no asociados. La presente invención también se refiere a un proceso para preparar daptomicina usando  
15 micelas que es fácilmente ajustado a escala para la producción comercial.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El rápido aumento en la incidencia de infecciones provocadas por bacterias gram-positivas,  
20 incluyendo aquellas provocadas por bacterias resistentes a los antibióticos, ha suscitado intereses  
renovados en el desarrollo de novedosas clases de antibióticos. Una clase de este tipo son los  
antibióticos lipopeptídicos, que incluye la daptomicina. La daptomicina tiene una potente actividad  
bactericida *in vitro* frente a bacterias gram-positivas clínicamente relevantes que provocan enfermedades  
graves y potencialmente mortales. Estas bacterias incluyen patógenos resistentes, tales como  
25 enterococos resistentes a la vancomicina (ERV), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina  
(SARM), *Staphylococcus aureus* de sensibilidad intermedia a glicopéptidos (SAIG), estafilococos  
coagulasa negativos (ECN) y *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina (SPRP), para los que  
existen muy pocas alternativas terapéuticas. Véase, por ejemplo, Tally *et al.*, 1999, Exp. Opin. Invest.  
Drugs 8:1223-1238, en lo sucesivo "Tally". El efecto inhibitorio de la daptomicina es un efecto rápido,  
30 bactericida dependiente de la concentración *in vitro* e *in vivo*, y un efecto después del antibiótico  
dependiente de la concentración relativamente prolongado *in vivo*.

Baltz describe la daptomicina en Biotechnology of Antibiotics, 2ª Ed., editor W.R. Strohl (Nueva  
York: Marcel Dekker, Inc.), 1997, págs. 415-435, en lo sucesivo en el presente documento "Baltz". La  
daptomicina, también conocida como LY 146032, es un antibiótico lipopeptídico cíclico que puede  
35 derivarse de la fermentación de *Streptomyces roseosporus*. La daptomicina es un miembro de los  
antibióticos de tipo factor A-21978C<sub>0</sub> de *S. roseosporus* y está compuesta por una cadena lateral de  
decanoilo unida al triptófano N-terminal de un péptido cíclico de 13 aminoácidos (figura 1). La daptomicina  
tiene un excelente perfil de actividad porque es sumamente eficaz frente a la mayoría de bacterias gram-  
positivas; es sumamente bactericida y de acción rápida; tiene una baja tasa de resistencia y es eficaz  
40 frente a los organismos resistentes a los antibióticos. En la actualidad, el compuesto está desarrollándose  
en una variedad de formulaciones para tratar infecciones graves provocadas por bacterias, incluyendo,  
pero sin limitarse a, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y enterococos resistentes a  
vancomicina (ERV).

45 Varias patentes estadounidenses describen los antibióticos A-21978C y derivados de los  
mismos, incluyendo daptomicina (LY 146032) así como métodos de producción y aislamiento de los  
antibióticos A-21978C y derivados de los mismos.

50 Las patentes estadounidenses de nuevo examen 32.333, de nuevo examen 32.455 y 4.800.157  
describen un método de síntesis de daptomicina cultivando *Streptomyces roseosporus* NRL15998 en  
condiciones de fermentación aerobia sumergida. La patente estadounidense 4.885.243 describe un  
método mejorado de síntesis de daptomicina alimentando a un cultivo de fermentación un ácido graso  
decanoico o éster o sal del mismo.

55 Las patentes estadounidenses de nuevo examen 32.310, de nuevo examen 32.311, 4.537.717,  
4.482.487 y 4.524.135 describen métodos de desacilación del antibiótico A-21978C y reactivación del  
núcleo peptídico y derivados antibióticos preparados mediante este procedimiento. Todas estas patentes  
describen un núcleo de antibiótico A-21978C desacilado purificado o un derivado del mismo que se aisló  
del caldo de fermentación mediante filtración y, luego, se purificó mediante cromatografía en Diaion HP-20  
60 y cromatografía en gel de sílice/C18.

Las patentes estadounidenses de nuevo examen 32.333 y de nuevo examen 32.455 dan a  
conocer un método de purificación en el que un filtrado de todo el caldo de fermentación se purificó a  
través de varias etapas de precipitación y de extracción para obtener un complejo crudo de A-21978C. El  
65 complejo crudo se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico en IRA-68 y dos  
series de cromatografía en gel de sílice. Los factores A-21978C individuales se separaron mediante gel

de sílice en fase inversa o gel de sílice/C18. Las patentes estadounidenses de nuevo examen 32.333 y de nuevo examen 32.455 también dan a conocer que puede purificarse A-21978C mediante cromatografía discontinua usando resina de Diaion HP-20 seguida de cromatografía en columna de gel de sílice.

5 La patente estadounidense 4.874.843 describe un método de purificación de daptomicina en el que se filtró el caldo de fermentación y se hizo pasar a través de una columna que contenía resina HP-20. Tras la elusión, la daptomicina semipurificada se hizo pasar a través de una columna que contenía HP-  
10 20ss, y después se separó de nuevo en resina HP-20. La patente '843 afirma que la resolución final y la separación de daptomicina de compuestos estructuralmente similares mediante este método se ven impedidas por la presencia de impurezas que no pueden identificarse mediante análisis por ultravioleta del caldo de fermentación. La patente '843 afirma también que los intentos por retirar estas impurezas mediante cromatografía en fase inversa sobre gel de sílice, cromatografía en fase normal sobre gel de sílice o cromatografía de intercambio iónico también fallaron en mejorar significativamente la pureza de la daptomicina. La patente '843 también da a conocer un "método inverso" para la purificación, que  
15 comprende las etapas de poner en contacto una disolución acuosa del producto de fermentación con una resina no funcionalizada en fase acuosa, eliminar físicamente el agua de la resina cargada, rehumectar la resina cargada con un disolvente orgánico polar, lavar la resina con el disolvente orgánico, eluir el producto de fermentación de la resina aumentando la polaridad del disolvente y recuperar el producto de fermentación. La patente '843 enseña que este método mejora la pureza final desde aproximadamente el 80% hasta aproximadamente el 93% y aumenta el rendimiento desde aproximadamente el 5% hasta  
20 aproximadamente el 35%; sin embargo, la patente '843 no da a conocer el tipo de impurezas presentes en la preparación de daptomicina.

25 La patente estadounidense 5.912.226 describe la identificación y el aislamiento de dos impurezas producidas durante la fabricación de daptomicina. La daptomicina, un péptido de  $\alpha$ -aspartilo, se transpeptida para formar un producto intermedio estable en el que el grupo aspartilo pasa a ser un grupo anhídrido-succinimido (figura 2). La patente '226 enseña que la presencia de este producto intermedio, denominado anhídrido-daptomicina, es más pronunciada a pH 4-6. La rehidratación de la forma de anhídrido-succinimido produce un segundo producto de degradación que contiene un grupo  $\beta$ -aspartilo y se denomina la forma de isómero  $\beta$  de daptomicina (figura 3).  
30

La patente '226 da a conocer que el derivado t-BOC de anhídrido-daptomicina puede aislarse mediante cromatografía sobre columna de gel de sílice/C18 en fase inversa, precipitarse y volver a purificarse mediante cromatografía en gel de sílice/C18 en fase inversa. La patente '226 también enseña que la forma de isómero  $\beta$  de daptomicina puede purificarse mediante cromatografía sobre una resina Diaion HP-20ss, desalarse mediante cromatografía sobre una resina Diaion HP-20 y purificarse adicionalmente usando una columna C-18 en fase inversa seguida de una columna con resina HP-20 en modo inverso.  
35

40 Kirsch *et al.* (Pharmaceutical Research, 6:387-393, 1989, en lo sucesivo en el presente documento "Kirsch") afirmaron que se produjeron anhídrido-daptomicina y el isómero  $\beta$  en la purificación de daptomicina. Kirsch describió métodos para minimizar los niveles de anhídrido-daptomicina y el isómero  $\beta$  a través de la manipulación de las condiciones de pH y las condiciones de temperatura. Sin embargo, Kirsch no pudo estabilizar la daptomicina y evitar la conversión de daptomicina en anhídrido-daptomicina y su posterior isomerización al isómero  $\beta$ . Kirsch tampoco pudo evitar la degradación de la daptomicina en otros productos de degradación no relacionados con la anhídrido-daptomicina y el isómero  $\beta$ .  
45

La patente '266 afirma que puede prepararse daptomicina usando estos procedimientos de modo que la daptomicina no contiene más del 2,5% en peso de un total combinado de anhídrido-daptomicina e isómero  $\beta$ , pero no proporciona indicaciones de los niveles de otras impurezas. En el método enseñado en la patente estadounidense 4.874.843 y en las preparaciones a gran escala de daptomicina para ensayos clínicos, los niveles de pureza de daptomicina más altos observados han sido de aproximadamente el 90-93%. Existe la necesidad de un método comercialmente factible para producir daptomicina más altamente purificada y, si es posible, para aumentar su rendimiento tras la purificación. Además, sería deseable obtener daptomicina purificada que contiene poco o nada de anhídrido-daptomicina y la forma de isómero  $\beta$  de daptomicina. También sería deseable reducir los niveles de otras varias impurezas en la daptomicina. Sin embargo, no ha habido ningún método disponible en la técnica que haya demostrado poder reducir adicionalmente los niveles de anhídrido-daptomicina, la forma de isómero  $\beta$  y otras impurezas en el producto de daptomicina.  
50  
55  
60

#### SUMARIO DE LA INVENCION

El método de la invención se expone en la reivindicación 1.

65 La presente invención aborda estos problemas proporcionando métodos comercialmente factibles para producir altos niveles de daptomicina purificada. En una realización de la presente

invención, se dan a conocer métodos comercialmente factibles que dan como resultado daptomicina a un nivel de pureza del 95-97%. En otra realización de la presente invención, se da a conocer un método comercialmente factible que elimina casi completamente las principales impurezas, anhidro-daptomicina e isómero  $\beta$ , así como otras impurezas en las preparaciones de daptomicina. La invención proporciona métodos comercialmente factibles para purificar daptomicina, que comprenden separar las micelas de daptomicina de los contaminantes de bajo peso molecular y separar la daptomicina no asociada de los contaminantes de alto peso molecular. La divulgación también proporciona métodos de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de analizar la pureza de la daptomicina y detectar y caracterizar otras impurezas en la daptomicina, algunas de las cuales no eran anteriormente conocidas.

La divulgación también proporciona daptomicina purificada que tiene una pureza de al menos el 98% o que está sustancial o esencialmente libre de anhidro-daptomicina e isómero  $\beta$ . La divulgación proporciona daptomicina purificada que está libre o esencialmente libre de anhidro-daptomicina y contiene un nivel mucho menor del isómero  $\beta$  y de otros contaminantes que el que era posible obtener anteriormente en la técnica anterior. La divulgación también proporciona micelas de lipopéptidos. En una realización preferida, la micela comprende daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina. La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden daptomicina altamente purificada o una micela de lipopéptidos relacionada con la daptomicina y métodos para usar estas composiciones.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la estructura de la daptomicina.

La figura 2 muestra la estructura de la impureza 8, CB-131010 (identificada anteriormente como el isómero  $\beta$ , LY213846).

La figura 3 muestra la estructura de la impureza 13, CB-130952 (identificada anteriormente como anhidro-daptomicina, LY178480).

La figura 4 muestra la estructura propuesta de la impureza 1, CB-131012 (identificada anteriormente como LY212218).

La figura 5 muestra la estructura propuesta de la impureza 2, CB-131011.

La figura 6 muestra la estructura propuesta de la impureza 3, CB-131008 (identificada anteriormente como LY213928).

La figura 7 muestra la estructura propuesta de la impureza 4, CB-131006.

La figura 8 muestra la estructura propuesta de la impureza 6, CB-130989 (identificada anteriormente como LY213827).

La figura 9 muestra la estructura propuesta de la impureza 7, CB-131005.

La figura 10 muestra la estructura propuesta de la impureza 12, CB-131009.

La figura 11 muestra la estructura propuesta de la impureza 14, CB-131078 (identificada anteriormente como LY109208).

La figura 12 muestra un cromatograma de HPLC para una preparación en masa de daptomicina, incluyendo las impurezas 1 a 14.

La figura 13 muestra un cromatograma de HPLC para una preparación de daptomicina tras la purificación en una resina Poros P150.

Las figuras 14A-14C muestran estructuras micelares. La figura 14A muestra una micela esférica, en la que las colas hidrófobas de las moléculas anfipáticas están orientadas hacia el centro de la esfera, mientras que las cabezas hidrófilas de las moléculas anfipáticas están orientadas hacia el exterior de la esfera, en contacto con el entorno acuoso. La figura 14A muestra un ejemplo en el que las cabezas hidrófilas están cargadas negativamente. La figura 14B muestra una estructura de bicapa lipídica en la que dos capas de las moléculas anfipáticas se ensamblan de tal manera que las colas hidrófobas de cada capa están orientadas una hacia la otra, mientras que las cabezas hidrófilas a cada lado de la bicapa están en contacto con el entorno acuoso. Las bicapas lipídicas pueden ser o bien esféricas o bien planas. La figura 14C muestra un liposoma, en el que una bicapa lipídica, tal como la mostrada en la figura 14B, forma una estructura esférica que encierra un interior acuoso. Las cabezas hidrófilas del liposoma están orientadas hacia el interior acuoso y el ambiente externo acuoso.

La figura 15 muestra los resultados de un experimento para determinar la concentración micelar crítica (cmc) de daptomicina a pH 4,0.

La figura 16 muestra la distribución de tamaños de las micelas de daptomicina mediante dispersión de la luz. Las micelas de daptomicina tienen un tamaño promedio de 5,4 nm (54 Å).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

##### Objetos de la invención

La presente invención proporciona un método para purificar daptomicina que comprende:

- a) someter a la daptomicina a condiciones en las que la solución micelar de daptomicina se forma alterando el pH;
  - b) separar las micelas de daptomicina en la solución micelar de daptomicina de los contaminantes de bajo peso molecular por una técnica de separación por tamaño;
  - 5 c) someter a la daptomicina a condiciones en las que una solución monomérica de daptomicina se forma alterando el pH; y
  - d) separar las moléculas de daptomicina monoméricas en la solución monomérica de daptomicina de las moléculas o agregados de alto peso molecular por una técnica de separación por tamaño.
- 10 Preferiblemente, la técnica de separación por tamaño usada en el método de la invención es ultrafiltración o cromatografía de exclusión por tamaño.

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un método para purificar lipopéptidos que se ajusta fácilmente a escala para la producción comercial, que comprende una combinación única de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba. En una realización preferida, el método se usa para fabricar daptomicina purificada que tiene una pureza superior al 95% y presenta niveles reducidos de impurezas en comparación con la daptomicina preparada mediante los métodos de la técnica anterior. En otra realización preferida, se usa el método para fabricar daptomicina usando niveles reducidos de disolventes en comparación con aquellos usados en los métodos de la técnica anterior. En otra realización preferida, se usa el método para fabricar lipopéptidos relacionados con daptomicina purificados que tienen una pureza superior al 95%.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un método para aumentar los niveles de un lipopéptido producido por un microorganismo alimentando al cultivo de fermentación un nivel reducido de un ácido graso. Usar niveles menores de ácido decanoico que aquéllos propuestos para la fermentación de daptomicina en la patente estadounidense 4.885.243 da como resultado la mejora de la rentabilidad además de producir una forma sumamente pura de daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina. En una realización preferida, se usa el método para aumentar la concentración y la cantidad de daptomicina producida por *Streptomyces roseosporus* al mismo tiempo que se minimiza la producción de los contaminantes relacionados. Los menores niveles de contaminantes en el caldo de fermentación dan como resultado una recuperación y purificación de daptomicina más eficaces, lo que proporciona un procedimiento de fabricación con un mayor rendimiento.

Otro objeto en la presente divulgación es proporcionar un método para purificar daptomicina que comprende del uso de cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado. En una realización preferida, se usa el método para producir daptomicina que tiene una pureza de al menos el 98% o que está sustancial o esencialmente libre de anhidro-daptomicina o isómero β. En otra realización preferida, se usa el método para purificar lipopéptidos relacionados con daptomicina hasta una pureza de al menos el 98%.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un método de cromatografía de procedimiento para purificar el lipopéptido daptomicina, que comprende una combinación novedosa de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado. Inesperadamente, el tampón modificado permite una separación de la anhidro-daptomicina de la daptomicina que no era posible anteriormente en los métodos de cromatografía anteriores.

Otro objeto de la divulgación es proporcionar un método para purificar el lipopéptido daptomicina que se ajusta fácilmente a escala para la producción comercial usando micelas de lipopéptidos. En una realización, el método comprende convertir una disolución de lipopéptidos de un estado monomérico no micelar a un estado micelar y viceversa durante los procedimientos de purificación. En una realización preferida, el método comprende someter los lipopéptidos a condiciones en las que se forman micelas, separar las micelas de lipopéptidos de los contaminantes de bajo peso molecular mediante, por ejemplo, una técnica de separación por tamaños. En otra realización preferida, el método comprende someter los lipopéptidos a condiciones en las que los lipopéptidos están en una forma monomérica y separar las moléculas de lipopéptidos monoméricos de los agregados o las moléculas de alto peso molecular mediante, por ejemplo, una técnica de separación por tamaños. En una realización más preferida, el método comprende ambas etapas: someter los lipopéptidos a condiciones en las que se forman micelas y separar las micelas de lipopéptidos de los contaminantes de bajo peso molecular, y después someter las micelas de lipopéptidos a condiciones en las que los lipopéptidos están en un forma monomérica, y separar los monómeros de lipopéptidos de los agregados o las moléculas de alto peso molecular. Estas dos etapas pueden llevarse a cabo en cualquier orden. En una realización incluso más preferida, la técnica de separación por tamaños es ultrafiltración o cromatografía de exclusión por tamaño.

Un objeto adicional de la presente divulgación es proporcionar métodos mejorados para medir la pureza de lipopéptidos, incluyendo la daptomicina, por cromatografía líquida a alta presión (HPLC).

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar lipopéptidos purificados, como daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina, y formulaciones o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En una realización preferida, la presente divulgación proporciona daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina, purificado mediante uno de los métodos descritos en la memoria descriptiva. La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas de un lipopéptido purificado o sus sales y métodos para administrar estas composiciones. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende daptomicina purificada.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar micelas de lipopéptidos y formulaciones farmacéuticamente aceptables de las mismas. En una realización preferida, la presente divulgación proporciona micelas de daptomicina o una micela de lipopéptido relacionado con la daptomicina y formulaciones farmacéuticamente aceptables de las mismas. En otra realización, la divulgación también proporciona métodos de administrar las micelas de lipopéptidos o formulaciones farmacéuticas de las mismas a pacientes con necesidad de las mismas. En una realización preferida, las micelas de lipopéptidos se administran por vía intravenosa, parenteral, intramuscular o tópica

#### Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el significado tal como lo entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece a esta invención. La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, bioquímica y microbiología y terminología básica usada en las mismas.

El término "aislado" se refiere a un compuesto o producto, es decir, se refiere a un compuesto que representa al menos el 10%, preferiblemente al menos el 20% o 30%, más preferiblemente al menos el 50%, 60% o 70%, y lo más preferiblemente al menos el 80% o 90% del compuesto presente en la mezcla.

El término "lipopéptido" se refiere a una molécula que comprende un resto similar al lípido unido covalentemente a un resto peptídico, así como a sales, ésteres, amidas y éteres de la misma. El término "lipopéptido" también abarca las formas protegidas de los lipopéptidos en las que están protegidos uno o más grupos amino, carboxilato o hidroxilo. Véase, por ejemplo, "Protective Groups in Organic Synthesis" de Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Nueva York, 1981 para ejemplos de grupos protectores. En una realización preferida, el lipopéptido es un antibiótico. En otra realización preferida, el lipopéptido es LY 303366, equinocandinas, pneumocandinas, aculeacinas, surfactina, plipastatina B1, anfomicina o el derivado de lipopéptido dado a conocer en la patente estadounidense 5.629.288. Estos lipopéptidos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense 5.202.309 y la solicitud internacional PCT WO 00/08197. En otra realización preferida, el lipopéptido es una molécula relacionada con daptomicina, incluyendo, entre otros, daptomicina, A54145, un lipopéptido relacionado con daptomicina dado a conocer en la patente estadounidense 4.537.717, 4.482.487, de nuevo examen 32.311, de nuevo examen 32.310, 5.912.226, actualmente en fase de nueva publicación como patente estadounidense n.º de serie 09/547.357, las solicitudes provisionales estadounidenses n.º 60/170.943, 60/170.946 o 60/170.945, presentadas el 15 de diciembre de 1999, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/208.222, presentada el 30 de mayo de 2000, o un antibiótico A-21978 en el que la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo de daptomicina se reemplaza por una cadena lateral de ácido graso de n-octanoilo, n-nonanoilo, n-undecanoilo, n-dodecanoilo, n-tridecanoilo o n-tetradecanoilo. Los lipopéptidos relacionados con daptomicina dados a conocer en los documentos 60/170.943, 60/170.946, 60/170.945 y 60/208.222 se refieren a lipopéptidos sintéticos y semisintéticos en los que se modifican los residuos de ornitina o quinurenina o la cadena lateral de ácido graso de daptomicina. En una realización más preferida, el lipopéptido es daptomicina. El término lipopéptido relacionado con daptomicina se refiere a los compuestos descritos anteriormente, y las sales de los mismos.

El término "daptomicina" se refiere al derivado de n-decanoilo del antibiótico de tipo factor A-21978C<sub>0</sub>, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. "Daptomicina" es sinónimo de LY146032. Véase la figura 1.

El término "anhidro-daptomicina" se refiere al derivado de daptomicina en el que el grupo  $\beta$ -aspartilo de daptomicina se transpeptida para dar un grupo anhidro-succinimido. Véase la figura 3.

El término "isómero  $\beta$ " o "isómero  $\beta$  de daptomicina" se refiere al derivado de daptomicina que contiene un grupo  $\beta$ -aspartilo en vez de un grupo  $\alpha$ -aspartilo. Véase la figura 2.

La daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina es "sustancialmente puro" cuando al menos el 95% de una muestra es daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina. Preferiblemente, la daptomicina o el lipopéptido relacionado con daptomicina es "sustancialmente puro"

cuando al menos el 97% de una muestra es daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina.

5 La daptomicina o el lipopéptido relacionado con daptomicina es “esencialmente puro” cuando al menos el 98% de una muestra es daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina. Preferiblemente, la daptomicina o el lipopéptido relacionado con daptomicina es “esencialmente puro” cuando al menos el 99% de una muestra es daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina.

10 La daptomicina o el lipopéptido relacionado con daptomicina está “sustancialmente libre” de otro compuesto cuando el otro compuesto está presente en una cantidad que no es superior al 1% de la cantidad de la preparación de daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina.

15 La daptomicina o el lipopéptido relacionado con daptomicina está “esencialmente libre” de otro compuesto cuando el otro compuesto está presente en una cantidad que no es superior al 0,5% de la cantidad de la preparación de daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina.

20 La daptomicina o el lipopéptido relacionado con daptomicina está “libre” de otro compuesto cuando el otro compuesto está presente en una cantidad que no es superior al 0,1% de la cantidad de preparación de daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina. Alternativamente, la daptomicina o el lipopéptido relacionado con daptomicina está “libre” de otro compuesto cuando el compuesto no puede detectarse mediante HPLC en condiciones de sensibilidad máxima en las que un límite de detección es aproximadamente el 0,05% o menos de la cantidad de la preparación de daptomicina o lipopéptido relacionado. Métodos de HPLC a modo de ejemplo se describen en el presente documento (tablas 1 y 2).

25 La daptomicina o el lipopéptido relacionado con daptomicina “purificado” se refiere a daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina sustancialmente puro, daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina esencialmente puro, o una sal de los mismos, o a daptomicina, lipopéptido relacionado con daptomicina, o una sal de los mismos que está sustancialmente libre, esencialmente libre, o libre de otro compuesto.

30 La daptomicina o el lipopéptido relacionado con daptomicina “parcialmente purificado” se refiere a daptomicina, lipopéptido relacionado con daptomicina o una sal de los mismos que tiene una pureza inferior al 90%.

35 La pureza de daptomicina, lipopéptido relacionado con daptomicina o de otro lipopéptido se refiere al lipopéptido antes de su formulación en una composición farmacéutica. La pureza puede medirse mediante cualquier medio incluyendo resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de gases/espectroscopía de masas (CG/EM), cromatografía de líquidos/espectroscopía de masas (CL/EM) o ensayos microbiológicos. Un medio preferido para medir la pureza de la daptomicina es mediante cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) analítica.

40 El término “micela” se refiere a agregados de moléculas anfipáticas. En un medio acuoso, los dominios lipófilos de las moléculas del agregado están orientados hacia el interior de la micela, y los dominios hidrófilos están en contacto con el medio. Las estructuras de la micela incluyen, pero no se limitan a, cristal esférico, laminar, cilíndrico, elipsoidal, vesicular (liposomal), lamelar y líquido. Véase la figura 14.

45 El término “micela mixta” se refiere a un tipo particular de micela en el que la micela contiene más de un solo tipo de molécula anfipática. En el contexto de esta invención, las micelas mixtas contienen un lipopéptido y al menos otra molécula anfipática que puede ser otro lipopéptido. Las micelas mixtas contienen al menos el 10% del lipopéptido en peso. En otras realizaciones, una micela mixta contiene al menos el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% del lipopéptido.

50 El término “disolución micelar” se refiere a una disolución en la que más del 50% de las moléculas de lipopéptido en la disolución están presentes en micelas, medidas en peso. Preferiblemente, al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las moléculas están presentes en micelas. Una disolución micelar se retiene en una membrana de ultrafiltración que tiene un límite de peso molecular nominal (PMN) de 10.000 dalton.

55 El término “concentración micelar crítica” (cmc) se refiere a la concentración particular de moléculas, que depende de la temperatura, concentración de sales y la naturaleza y el tipo de molécula anfipática. Por encima de la cmc, los monómeros no asociados y las micelas existen en equilibrio.

60 El término “monómero” se refiere a una molécula anfipática que no es parte de un agregado pero que existe como una molécula individual. En el contexto de esta invención, el término monómero se refiere a un lipopéptido no asociado.

65

El término “disolución monomérica” se refiere a una disolución en la que más del 50% de las moléculas de lipopéptido están presentes como monómeros medidas en peso. Preferiblemente al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o 95% están presentes como monómeros. Una disolución monomérica no se retiene en una membrana de filtración que tiene un límite de PMN de 10.000 dalton sino que más bien pasa a través de la membrana.

El término “tampón de baja fuerza iónica” se refiere a una disolución que tiene una concentración de sales por debajo de 50 mM; el término “tampón de fuerza iónica media” se refiere a una disolución que tiene una concentración de sales entre 50-250 mM; el término “tampón de alta fuerza iónica” se refiere a una disolución que tienen una concentración de sales superior a 250 mM.

#### Métodos para fabricar lipopéptidos purificados

Una realización de la presente invención se refiere a un método de cromatografía de procedimiento que produce un lipopéptido purificado de una manera comercialmente factible. En una realización preferida, el lipopéptido es daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina. El método de cromatografía de procedimiento comprende usar secuencialmente cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y cromatografía de intercambio aniónico para purificar una preparación que contiene un lipopéptido, tal como daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina.

En una realización preferida de la presente divulgación, el método de purificación comprende además alterar las condiciones de fermentación en las que el producto bruto que contiene A21978C se produce por *Streptomyces roseosporus* con el fin de aumentar la producción de daptomicina y reducir las impurezas y los contaminantes relacionados producidos mediante el cultivo de fermentación de *S. roseosporus*.

Una realización preferida del método de cromatografía de procedimiento se describe a continuación:

Se fermenta *Streptomyces roseosporus* con una alimentación de ácido n-decanoico, tal como se da a conocer en la patente estadounidense 4.885.243, con la modificación de que la alimentación de ácido decanoico se mantiene a los niveles más bajos posibles sin disminuir el rendimiento global de la fermentación. En una realización preferida, el ácido decanoico residual se mantiene a menos de 50 partes por millón (ppm) durante la fermentación aerobia. En una realización más preferida, se mantiene el ácido decanoico residual entre una y 20 ppm durante la fermentación aerobia. En una realización aún más preferida, se mantiene el ácido decanoico residual a aproximadamente diez ppm durante la fermentación aerobia. En una realización preferida, la concentración de ácido decanoico residual se mide durante toda la fermentación y el nivel de alimentación de ácido decanoico se ajusta para mantener de manera continua los niveles de ácido decanoico residual dentro de los parámetros preferidos. La técnica anterior no describe las bajas concentraciones de ácido decanoico constante residual y específico *in situ*, requeridas para lograr la expresión óptima de daptomicina que contiene niveles inferiores de impurezas.

Tras la fermentación, la disolución extracelular se clarifica eliminando los micelios del caldo de fermentación. La eliminación de los micelios de la fermentación se lleva a cabo mediante cualquier técnica de separación convencional, tal como centrifugación o microfiltración. En una realización preferida, el caldo de fermentación se clarifica mediante microfiltración, tal como usando un sistema de membrana Pall-Sep™. En una realización más preferida, el caldo de fermentación se clarifica usando una centrifuga industrial, tal como una centrifuga Westfalia™, seguido de un filtro de profundidad de acabado. Otros dispositivos, tales como filtros prensa, filtros de tambor rotatorio o filtros de profundidad desechables, pueden usarse para eliminar los micelios del caldo de fermentación para producir un caldo clarificado adecuado para cromatografía en columna a gran escala.

En otra realización, puede extraerse daptomicina directamente de la fermentación de los micelios, usando un disolvente orgánico tal como butanol antes de la clarificación en un filtro o una centrifuga que separa el disolvente. Puede usarse cualquier alcohol con cuatro carbonos o más en la extracción según esta realización. Un disolvente preferido es n-butanol. Usar un disolvente orgánico da como resultado una purificación adicional inicial de daptomicina en comparación con una separación puramente acuosa de daptomicina. Por ejemplo, la daptomicina se reparte en n-butanol cuando se usa n-butanol en una concentración superior al 10% y cuando el procedimiento se lleva a cabo en condiciones en las que el n-butanol forma una fase separada, por ejemplo, a un valor de pH de 4-5, que está próximo al punto isoeléctrico de la daptomicina (véase ejemplo 4).

En otra realización, se produce daptomicina en un reactor inmovilizado que usa micelios preactivados para la producción no fermentativa de daptomicina usando una fuerza de energía, preferiblemente un azúcar, componentes elementales, tales como aminoácidos y amoníaco, y ácido



decanoico. La producción de daptomicina en un reactor de enzimas inmovilizado se procesa después mediante métodos descritos en el presente documento.

5           Tras la clarificación del caldo de fermentación, se enriquecen los niveles de daptomicina, (por ejemplo, se concentran) en la disolución clarificada mediante cromatografía de intercambio aniónico. La disolución clarificada se pone en contacto en primer lugar con una resina de intercambio aniónico en condiciones en las que la mayoría o toda la daptomicina se une a la resina de intercambio aniónico. Tras la unión, se lava la resina con un tampón acuoso iónico apropiado para retirar el material no unido y algunas de las impurezas de daptomicina. Finalmente, la daptomicina purificada unida a la resina se eluye en condiciones en las que la daptomicina se disociará de la resina.

10           Las etapas de unión, lavado y elución pueden llevarse a cabo según esta invención usando tampones y métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la elución puede realizarse usando un tampón que contiene una elevada concentración de sales en comparación con el tampón de lavado, un tampón que tiene un pH menor en comparación con el tampón de lavado, o un tampón que tiene tanto una mayor concentración de sales como un pH menor que el tampón de lavado. En una realización preferida, la daptomicina se une a la resina de intercambio aniónico que se ha equilibrado en un tampón que no contiene sales añadidas o una menor concentración de sales a un pH que es de neutro a básico. La resina cargada se lava con tres volúmenes de lecho de columna de agua, y luego de tres a seis volúmenes de lecho de un tampón de sales intermedio que contiene NaCl de 30 a 60 mM. Se eluye daptomicina de la columna, con de uno a tres volúmenes de columna de un tampón de pH menor y/o elevada concentración de sales que contiene NaCl de 300 a 500 mM. Mayores concentraciones de cloruro de sodio y sales alternativas tales como cloruro de potasio, también eluirán la daptomicina de la resina. En una realización preferida, se usa una resina de intercambio aniónico de alta tasa de flujo. En una realización más preferida, se usa la resina FP-DA 13 (Mitsubishi).

15           La cromatografía de intercambio aniónico puede llevarse a cabo mediante cromatografía en columna o puede realizarse en modo discontinuo. Para la producción comercial, puede ser preferible usar el modo discontinuo. La resina de intercambio aniónico puede lavarse y eluirse con gradientes de sal graduales o con un gradiente de sal continuo. Un gradiente de sal gradual o continuo adecuado es uno cualquiera que permita la separación de daptomicina de los contaminantes. En una realización preferida, un gradiente de sal continuo es uno que oscila de NaCl desde 0 hasta 1000 mM. En una realización más preferida, un gradiente de sal continuo es uno que oscila de NaCl desde 100 hasta 500 mM o de NaCl desde 0 hasta 400 mM. También puede usarse cromatografía de flujo radial tal como se describe en las patentes estadounidenses 5.756.680, 4.865.729, 4.840.730 ó 4.708.782.

20           Tras la cromatografía de intercambio aniónico, la preparación de daptomicina se purifica adicionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Una realización de esta etapa se describe en la patente estadounidense 4.874.843. La preparación de daptomicina acuosa eluida se pone en contacto con una resina de HIC en condiciones en las que la mayoría o toda la daptomicina se unirá a la resina. El contenido en agua de la resina cargada con daptomicina se reduce poniendo en contacto la resina con una concentración aumentada de un disolvente no polar. La resina se lava con un disolvente orgánico polar apropiado en condiciones en las que las impurezas se disocian de la resina mientras que la daptomicina permanece unida. Finalmente, la preparación de daptomicina se eluye en condiciones en las que la daptomicina se disocia de la resina. En general, la daptomicina se eluye usando un tampón que contiene un disolvente con una polaridad menor (mayor nivel de disolvente polar) y/o pH mayor que el tampón de lavado.

25           En una realización preferida, la resina no funcional para HIC es HP-20ss de partículas pequeñas (Mitsubishi). La daptomicina unida se retira específicamente de la resina HP-20ss con un disolvente de fase orgánica, tal como uno que contiene alcohol isopropílico, acetonitrilo, butanol u otro disolvente adecuado. En una realización más preferida, la daptomicina se une a la resina HP-20ss que se ha equilibrado en un tampón acetato que contiene acetonitrilo al 10% o un disolvente polar equivalente, tal como alcohol isopropílico. La resina cargada con daptomicina se lava con al menos tres volúmenes de lecho de columna de tampón de equilibrio. La resina cargada con daptomicina se libera adicionalmente de impurezas adicionales lavando con de tres a seis volúmenes de lecho de un tampón acetato de lavado que contiene una concentración no eluyente del disolvente polar. En una realización preferida, la resina cargada con daptomicina se lava con acetonitrilo al 30% o alcohol isopropílico al 45%. La resina cargada con daptomicina se eluye con de uno a tres volúmenes de lecho de tampón acetato que contiene acetonitrilo al 35% o más o alcohol isopropílico a más del 50%. En una realización preferida, la daptomicina se eluye con acetonitrilo al 35% a pH 4,0-5,0 o alcohol isopropílico al 55-60%. En otra realización, la resina cargada con daptomicina se eluye con de uno a tres volúmenes de lecho de tampón a un pH aumentado. En esta realización, el pH del tampón se aumenta gradualmente para eluir diferentes compuestos de la columna a diferentes tasas debido a las diferencias de carga. A pH elevado, por ejemplo, pH 6,0-7,0, la concentración de elución del acetonitrilo se reduce hasta el 10-20%. De manera similar, a pH elevado, por ejemplo, pH 6,0-7,0 la concentración de elución del alcohol isopropílico se

reduce hasta el 20-25%. El control de la temperatura a la que se lleva a cabo la cromatografía también influye en la concentración de disolvente. La elución a menores temperaturas, es decir, en condiciones de refrigeración, requiere niveles aumentados de disolvente a todas las condiciones de pH.

5 Tras la HIC, el disolvente orgánico en la preparación de daptomicina se reduce mediante cromatografía de intercambio aniónico. En una realización preferida, se usa FP-DA 13 tal como se comentó anteriormente.

10 Tras la segunda cromatografía de intercambio aniónico, la daptomicina purificada se despirogena, filtra y concentra en condiciones de refrigeración. El filtrado de la daptomicina puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización, el filtrado y la despirogenación pueden llevarse a cabo:

- 15 i) proporcionando una disolución de daptomicina en condiciones en las que la daptomicina está en un estado monomérico y no micelar;
- ii) filtrando la disolución de daptomicina en condiciones en las que la daptomicina pasará a través del filtro pero los pirógenos no pasarán a través del filtro, por ejemplo, teniendo la disolución de daptomicina a pH 6,0-8,0 y filtrando la disolución con un ultrafiltro que está clasificado entre 3.000 PMN y 30.000 PMN;
- 20 iii) alterando la disolución de daptomicina que ha pasado a través del filtro de manera que la daptomicina se agregue, por ejemplo, cambiando el pH de la disolución de daptomicina a 2,5-4,5 de manera que la daptomicina forme micelas;
- iv) filtrando la disolución de daptomicina en condiciones en las que la daptomicina se retendrá en el filtro, por ejemplo, concentrando la daptomicina en un ultrafiltro de 30.000 PMN o menor, tal como
- 25 una membrana de ósmosis inversa; y
- v) recoger la daptomicina despirogenada.

En una realización preferida, la daptomicina de la etapa (ii) se filtra a presión en un ultrafiltro de límite de peso molecular (LPM) de 10.000 dalton a un pH de aproximadamente 7-8. En una realización

30 más preferida, la daptomicina está a una concentración inicial de menos de 40 mg/ml, más preferiblemente, a una concentración de aproximadamente 31,25 mg/ml. En estas condiciones, la daptomicina pasa a través del filtro pero los pirógenos tales como lipopolisacáridos (LPS) no. Tras la ultrafiltración inicial, se reduce el pH del filtrado hasta pH de 2,5 a 4,5 y se concentra el filtrado en un ultrafiltro de LPM de 10.000 hasta aproximadamente 120 mg/ml. En estas condiciones, se retiene la

35 daptomicina en el filtro. En una realización preferida, el pH del filtrado es pH 3,5. Tras la concentración, la concentración de daptomicina se ajusta a 105 mg/ml, se comprueban los niveles de endotoxinas y se usa para llenar viales en condiciones asépticas.

40 En otra realización, la nanofiltración por ósmosis inversa se lleva a cabo a pH 1,5-3,0. El pH bajo y las condiciones de refrigeración se usan para retardar la degradación de la daptomicina purificada. La daptomicina puede filtrarse adicionalmente a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m para reducir el grado de contaminación microbiana y después se liofiliza tanto en masa como en viales.

45 Como alternativa a la etapa de ultrafiltración y concentración anterior, las fracciones eluidas que contienen daptomicina se mezclan con butanol (o bien n, iso o bien t-butanol) a un pH de aproximadamente 4,5, en una razón mayor que una parte de butanol con respecto a nueve partes de disolución de daptomicina. En una realización preferida, una parte de butanol se mezcla con cuatro partes de disolución de daptomicina para dar una disolución de butanol al 20%. Se permite que la disolución de butanol-daptomicina se separe en las fases orgánica y acuosa. La daptomicina se reparte en la fase orgánica, que se recoge. La deshidratación de la daptomicina en el disolvente orgánico puede estabilizar la daptomicina y evitar la degradación de la daptomicina purificada para dar anhidro-daptomicina y la posterior formación de isómero  $\beta$ . Finalmente, puede devolverse la daptomicina a la fase acuosa añadiendo tampón a pH 6,5-7,5 a la fase orgánica. Tras la concentración o recogida de daptomicina, se liofiliza la daptomicina.

55

En otra realización de la presente divulgación, el método de cromatografía de procedimiento se usa para purificar lipopéptidos distintos de daptomicina, tales como A54145, LY303366, equinocandinas, pneumocandinas, aculeacina, surfactina, plipastatina B1, anfomicina o el derivado de lipopéptido dado a conocer en la patente estadounidense 5.629.288. En otra realización, el método de cromatografía de procedimiento se usa para purificar lipopéptidos relacionados con daptomicina, incluyendo A54145, o un lipopéptido dado a conocer en las patentes estadounidenses 4.537.717, 4.482.487, de nuevo examen 32.311, de nuevo examen 32.310, 5.912.226, actualmente en fase de nueva publicación como patente estadounidense n.º de serie 09/547.357, las solicitudes provisionales estadounidenses n.º 60/170.943, 60/170.946 ó 60/170.945, presentadas el 15 de diciembre de 1999, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/208.222, presentada el 30 de mayo de 2000, o un antibiótico A-21978 en el que la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo de daptomicina se reemplaza por una cadena lateral de ácido graso de n-

60

65

octanoílo, n-undecanoílo, -dodecanoílo, n-tridecanoílo o n-tetradecanoílo.

5 En otra realización de la presente divulgación, un "método de nube de sal" [Genetic Engineering News, Vol. 19, n.º 20, páginas 1, 34 y 43, (15 de noviembre de 1999)] se usa en la purificación de daptomicina u otros lipopéptidos. El método de nube de sal es un sistema a base de membranas que combina las separaciones selectivas con capacidad de tratamiento de grandes volúmenes. El método de nube de sal puede usarse junto con aquellas etapas de procedimiento dadas a conocer en el presente documento o por separado para purificar la daptomicina u otros lipopéptidos.

10 Otra realización de la presente invención se refiere a un método cromatográfico que produce un lipopéptido altamente purificado que no podía lograrse mediante los métodos de cromatografía de la técnica anterior. El método de cromatografía comprende el uso de cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado, para purificar una preparación que contiene un lipopéptido. En una realización preferida, el método se usa para producir daptomicina altamente purificada o un lipopéptido relacionado con daptomicina. Este método, cuando se usa con daptomicina parcialmente purificada, produce daptomicina que tiene una pureza de al menos el 98%. El método también produce daptomicina que está libre o esencialmente libre de anhidro-daptomicina. El método comprende las siguientes etapas:

20 Se prepara daptomicina parcialmente purificada mediante cualquier método conocido en la técnica o tal como se describe en el presente documento. La preparación de daptomicina se purifica entonces mediante cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado. La daptomicina se une a la resina de intercambio aniónico en presencia de un tampón iónico modificado apropiado, en condiciones en las que la daptomicina se une a los iones de la resina en un estado monomérico y no micelar. El tampón modificado comprende un agente de tamponamiento, tal como, sin limitación, acetato, fosfato, citrato y Tris-HCl, o cualquier otro agente de tamponamiento que tampone bien a pH neutro. El tampón modificado comprende además uno o más agentes caotrópicos, incluyendo, sin limitación, guanidina, amoníaco, urea, un agente reductor fuerte, benzoato, ascorbato u otro potenciador iónico que pueda modificar el tampón de modo que la daptomicina se separe fácilmente de las impurezas. La resina cargada con daptomicina se lava con un tampón iónico modificado apropiado para eluir las impurezas, incluyendo anhidro-daptomicina. Luego se eluye la daptomicina en condiciones que permiten la separación de daptomicina de las impurezas que permanecen unidas a la resina, incluyendo el isómero  $\beta$ .

35 En una realización preferida, el tampón modificado está a pH neutro (un pH de 6 a 8) y contiene urea de 2 a 6 M. En una realización preferida adicional, la resina de intercambio aniónico es resina Porous P150 o Porous D50 (PE Biosystems). En una realización más preferida, la resina de intercambio aniónico es Porous P150. En una realización preferida, la daptomicina se une a la resina en un tampón de baja fuerza iónica, se lava con un tampón de fuerza iónica de baja a media, y se eluye con un tampón de alta fuerza iónica. En una realización preferida, la daptomicina se une a la resina Porous P150 en un tampón Tris a pH 7,0 que contiene urea 6 M. La resina Porous P150 cargada con daptomicina se lava con tres volúmenes de lecho de tampón Tris u otro tampón adecuado que contiene un nivel de sales que elimina contaminantes y anhidro-daptomicina sin eluir la daptomicina. Se eluye daptomicina de la resina Porous P150 con tampón Tris u otro tampón adecuado en condiciones de sales elevadas que dejará impurezas adicionales, incluyendo un parte significativa del isómero  $\beta$  unido a la columna. En otra realización preferida, se usa Poros P150 y se une la daptomicina a la resina en un tampón acetato a pH 6,0 que contiene urea 2 M. La resina Poros P150 cargada con daptomicina se lava y eluye de manera similar al método anterior excepto que se usa un tampón acetato a pH 6,0 que contiene urea 2 M. El fraccionamiento de los productos puede medirse mediante HPLC o mediante monitorización UV.

50 La cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado puede realizarse mediante cromatografía en columna o puede realizarse en modo discontinuo. También puede usarse cromatografía de flujo radial, tal como se describe en las patentes estadounidenses 5.756.680, 4.865.729, 4.840.730 ó 4.708.782. La resina de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado puede lavarse y eluirse con gradientes de sal graduales o con un gradiente de sal continuo. Un gradiente de sal continuo o gradual adecuado, es uno cualquiera que permite la separación de la daptomicina de las impurezas incluyendo, pero sin limitarse a, anhidro-daptomicina e isómero  $\beta$ . En una realización preferida, un gradiente de sal continuo es de NaCl de 0 a 1000 mM. En una realización más preferida, el gradiente de sal es de NaCl de 100 a 500 mM o de NaCl de 0 a 400 mM.

60 En otra realización de la presente divulgación, la cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado se usa para purificar compuestos lipopeptídicos distintos de daptomicina. Estos compuestos lipopeptídicos incluyen, sin limitación, A54145, LY303366, equinocandinas, pneumocandinas, aculeacina, surfactina y plipastatina B1 (Tsuge *et al.*, 1996, Arch. Microbiol. 165:243-51) y derivados lipopeptídicos tal como se muestran en la patente estadounidense 5.629.288. En otra realización, la cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado se usa para purificar un lipopéptido relacionado con daptomicina tal como A54145, o un

lipopéptido dado a conocer en las patentes estadounidenses 4.537.717, 4.482.487, de nuevo examen 32.311, de nuevo examen 32.310, 5.912.226, actualmente en fase de nueva publicación como patente estadounidense n.º de serie 09/547.357, las solicitudes provisionales estadounidenses n.º 60/170.943, 60/170.946 ó 60/170.945, presentadas el 15 de diciembre de 1999, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/208.222, presentada el 30 de mayo de 2000, o un antibiótico A-21978 en el que se reemplaza la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo de daptomicina por una cadena lateral de ácido graso de n-octanoilo, n-nonanoilo, n-undecanoilo, -dodecanoilo, n-tridecanoilo o n-tetradecanoilo.

En otra realización de la presente divulgación, una combinación novedosa de las etapas de cromatografía de procedimiento se usa para purificar daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina. El método comprende cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía en fase inversa de partículas pequeñas, y cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado. El método de purificación puede comprender además alterar las condiciones de fermentación en las que el producto bruto que contiene A21978C se produce por *Streptomyces roseosporus*. Estos métodos producen daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina que tiene una pureza de al menos el 98%. En una realización preferida, los métodos producen daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina que tiene una pureza superior al 99%.

Una realización preferida del método de cromatografía de procedimiento se describe a continuación:

Se fermenta *Streptomyces roseosporus* con una alimentación de ácido n-decanoico, tal como se da a conocer en la patente estadounidense 4.885.243, con la modificación de que la alimentación de ácido decanoico se mantiene a los niveles más bajos posibles sin disminuir el rendimiento total de la fermentación tal como se describió anteriormente. En una realización alternativa, podrá usarse una alimentación diferente siempre que en última instancia proporcione un grupo n-decanoilo para su adición al núcleo de daptomicina. Ejemplos de estas alimentaciones son, sin limitación, amida decanoica, ésteres decanoicos incluyendo ésteres butílicos, fuentes brutas de aceite de coco o de palma, ácido decanoico de fuente animal, diversas sales de ácido decanoico, y fuentes petroquímicas de ácido decanoico. Tras la fermentación, la disolución extracelular se clarifica tal como se describió anteriormente. En una realización alternativa, puede extraerse daptomicina de los micelios usando un disolvente orgánico tal como n-butanol antes de la clarificación en un filtro o una centrífuga que separa el disolvente tal como se describió anteriormente. Tras la clarificación del caldo de fermentación, se enriquece el nivel de daptomicina en la disolución clarificada, en primer lugar mediante cromatografía de intercambio aniónico y después mediante HIC tal como se describió anteriormente.

Tras la finalización de la HIC, se reduce el disolvente orgánico en la preparación de daptomicina mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización preferida, el disolvente orgánico se reduce mediante cromatografía de intercambio aniónico, tal como se describió anteriormente. Debe eluirse la daptomicina de la columna en un tampón compatible con el tampón requerido para la cromatografía potenciada con tampón modificado. Alternativamente, puede intercambiarse el tampón de elución por el tampón modificado mediante ósmosis inversa o filtración en un filtro de LPM de 10.000. En otra realización preferida, se reduce el disolvente orgánico mediante evaporación o dilución en el tampón. En una tercera realización preferida, el disolvente de la cromatografía de fase inversa y la sal residual se eliminan usando ósmosis inversa a pH 1,5-4,0 o ultrafiltración a pH 2,5-4,5. El producto resultante puede congelarse para su almacenamiento en masa o puede secarse mediante liofilización, y después rehidratarse en agua o en el tampón usado para la cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado.

La daptomicina se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado tal como se describió anteriormente.

Tras la cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado, la daptomicina purificada se filtra y se concentra en condiciones de refrigeración. El filtrado de daptomicina puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización preferida, se despirogena la daptomicina y se concentra tal como se describió anteriormente. Alternativamente, puede concentrarse la daptomicina mediante ósmosis inversa en condiciones de refrigeración a un pH de 1,5 a 4. El pH bajo y las condiciones de refrigeración se usan para retardar la degradación de la daptomicina purificada.

Como alternativa o además de la etapa de filtración y concentración anterior, las fracciones eluidas que contienen daptomicina de la cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado, pueden mezclarse con butanol (o bien n, iso o bien t-butanol) a un pH de aproximadamente 4,5, en una razón de más de una parte de butanol con respecto a nueve partes de disolución de daptomicina. En una realización preferida, se mezcla una parte de butanol con cuatro partes de disolución de daptomicina para dar una disolución de butanol al 20%. Se deja que la disolución de butanol-

daptomicina se separe en las fases orgánica y acuosa. La daptomicina se reparte en la fase orgánica, que se recoge. La deshidratación de la daptomicina en el disolvente orgánico puede estabilizar la daptomicina y evitar la degradación de la daptomicina purificada para dar anhidro-daptomicina y la posterior formación de isómero  $\beta$ .

5

Tras la concentración o recogida de daptomicina, se liofiliza la daptomicina.

En otra realización de la presente invención, la cromatografía de procedimiento se usa para purificar lipopéptidos distintos de daptomicina, tal como los descritos anteriormente.

10

#### Formación de micelas de lipopéptidos y métodos de uso de las mismas

Una realización de la divulgación proporciona micelas de lipopéptidos. La invención está dirigida a métodos para formar micelas de daptomicina y métodos de uso de las micelas de daptomicina para la purificación de la daptomicina. La divulgación también proporciona métodos para usar micelas de lipopéptidos para composiciones farmacéuticas. En una realización preferida, el lipopéptido es una molécula relacionada con daptomicina, incluyendo, entre otros, daptomicina, A54145, un lipopéptido relacionado con daptomicina dado a conocer en la patente estadounidense 4.537.717, 4.482.487, de nuevo examen 32.311, de nuevo examen 32.310, 5.912.226, actualmente en fase de nueva publicación como patente estadounidense n.º de serie 09/547.357, las solicitudes provisionales estadounidenses n.º 60/170.943, 60/170.946 ó 60/170.945, presentadas el 15 de diciembre de 1999, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/208.222, presentada el 30 de mayo de 2000, o un antibiótico A-21978 en el que se reemplaza la cadena lateral de n-decanoilo de daptomicina por una cadena lateral de n-octanoilo, n-nonanoilo, n-undecanoilo, n-dodecanoilo, -tridecanoilo o n-tetradecanoilo. En una realización más preferida, el lipopéptido es daptomicina.

15

20

25

Las micelas son agregados de moléculas anfipáticas. En medios acuosos, las partes lipófilas de las moléculas están orientadas hacia el interior de la micela y las partes hidrófilas de las moléculas están en contacto con los medios acuosos. Se forman espontáneamente micelas en una disolución que contiene moléculas anfipáticas si la concentración de las moléculas es suficientemente alta.

30

La formación de micelas provoca cambios en varias propiedades físicas volumétricas de una disolución, incluyendo cambios en la presión osmótica, turbidez, conductancia eléctrica, tensión superficial, actividades de coión y contraión (en el caso de moléculas anfipáticas iónicas), índice de refracción, espectro UV y RMN, volumen molar parcial, viscosidad, coeficiente de difusión y solubilización de colorantes. Puede determinarse la cmc midiendo una o más de estas propiedades físicas dependientes de la micela, como función de la concentración de la molécula anfipática. El tamaño y la forma de las micelas puede determinarse mediante la dispersión dinámica de luz láser, ultracentrifugación, viscosidad y/o experimentos de dispersión de rayos X de ángulo bajo. Las micelas también pueden existir en fases de cristal líquido.

35

40

Los lipopéptidos pueden agregarse en micelas proporcionando una concentración de lipopéptido que es mayor que la cmc del lipopéptido. La cmc depende de la naturaleza del lipopéptido y la temperatura, la concentración de sales y el pH de la disolución acuosa que comprende el lipopéptido. Con respecto a la naturaleza del lipopéptido, la cmc de un lipopéptido se reduce mediante la adición de grupos  $\text{CH}_2$  a las cadenas carbonadas lipófilas. Por tanto, dada la cmc para daptomicina a una concentración de sales, temperatura y pH particulares, entonces un antibiótico de tipo A-21978 en el que se reemplaza la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo por una cadena lateral de ácido graso de n-octanoilo o n-nonanoilo, tendrá una mayor cmc, mientras que un antibiótico A-21978 en el que se reemplaza la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo de daptomicina por una cadena lateral de ácido graso n-undecanoilo, n-dodecanoilo, -tridecanoilo o n-tetradecanoilo, tendrá una menor cmc en relación con la daptomicina.

45

50

En una realización de la divulgación, la cmc de un lipopéptido puede manipularse añadiendo o quitando un grupo  $\text{CH}_2$  al lipopéptido. En una realización preferida, el lipopéptido es A-21978, en el que se reemplaza la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo de daptomicina por una cadena lateral de ácido graso de n-octanoilo, n-nonanoilo, n-undecanoilo, -dodecanoilo, n-tridecanoilo o n-tetradecanoilo. En otra realización, puede calcularse la cmc aproximada de un lipopéptido siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. Dada la cmc para un lipopéptido tal como daptomicina, puede calcularse la cmc aproximada de un lipopéptido relacionado en el que se reemplaza la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo por una cadena lateral de ácido graso de n-octanoilo, n-nonanoilo, n-undecanoilo, n-dodecanoilo, n-tridecanoilo o n-tetradecanoilo. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos por un experto en la técnica.

60

65

En otra realización preferida, dada la cmc para un lipopéptido, puede calcularse la cmc aproximada para un lipopéptido que contiene un resto peptídico relacionado. En una realización preferida,

5 dada la cmc para daptomicina y las enseñanzas de la técnica anterior, puede determinarse fácilmente la cmc para un lipopéptido relacionado tal como A54145, un lipopéptido relacionado con daptomicina dado a conocer en la patente estadounidense 4.537.717, 4.482.487, de nuevo examen 32.331, de nuevo examen 32.310, 5.912.226, actualmente en fase de nueva publicación como patente estadounidense n.º de serie 09/547.357, las solicitudes provisionales estadounidenses n.º 60/170.943, 60/170.946 ó 60/170.945, presentadas el 15 de diciembre de 1999, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/208.222, presentada el 30 de mayo de 2000.

10 En una realización de la invención, la cmc de un lipopéptido se manipula cambiando la temperatura de la disolución que comprende el lipopéptido. La cmc para un lipopéptido normalmente aumenta con el aumento de la temperatura de la disolución. Por tanto, se promueve la formación de micelas reduciendo la temperatura y se dificulta aumentando la temperatura. Por ejemplo, una disolución que comprende un lipopéptido puede formar micelas a 4°C porque a esa temperatura se reduce la cmc y la concentración del lipopéptido está por encima de la cmc; sin embargo, la misma disolución de lipopéptido puede ser monomérica a 20°C porque la cmc ha aumentado con la temperatura y la concentración de lipopéptido está ahora por debajo de la cmc. Por tanto, en una realización preferida, la concentración de un lipopéptido es mayor que la cmc a una temperatura y es menor que la cmc a otra temperatura más alta. En una realización más preferida, el lipopéptido es daptomicina o una molécula relacionada con daptomicina, tal como las descritas anteriormente. En una realización aún más preferida, el lipopéptido es daptomicina.

25 En otra realización preferida, la capacidad para manipular la formación de micelas de un lipopéptido usando diferentes temperaturas para afectar a la cmc se usa en la purificación del lipopéptido. En una realización más preferida, el lipopéptido es daptomicina o una molécula relacionada, tal como las descritas anteriormente. En una realización aún más preferida, el lipopéptido es daptomicina. En otra realización preferida, la capacidad para manipular la formación de micelas de lipopéptidos alterando la temperatura se usa para preparar composiciones farmacéuticas que son micelares en ciertas condiciones de temperatura y monoméricas en otras condiciones de temperatura. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina, tal como se describió anteriormente. En otra realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden daptomicina.

35 En una realización adicional de la invención, la adición de un electrolito se usa para reducir la cmc de un lipopéptido iónico. En una realización preferida, una sal, tal como NaCl, se añade a una disolución que comprende el lipopéptido para reducir la repulsión entre los grupos cargados en una micela de lipopéptido. En una realización preferida, el lipopéptido es daptomicina o una molécula relacionada con daptomicina, tal como la descrita anteriormente. Por ejemplo, el resto peptídico de daptomicina contiene tres residuos de ácido aspártico y un residuo de ácido L-treo-3-metilglutámico (3-MG), todos los cuales estarían cargados a pH neutro. Por tanto, la adición de un electrolito, tal como NaCl o una sal equivalente, reducirá la cmc de daptomicina. En una realización preferida, la concentración de sales es al menos de 100 mM. En una realización más preferida, la concentración de sales es de sal de 150 mM a 300 mM. En una realización incluso más preferida, la sal es NaCl.

45 También se observa una disminución en la cmc con la adición de un electrolito para otros lipopéptidos, tales como moléculas relacionadas con daptomicina que contienen residuos de ácido aspártico, residuos de 3-MG u otros residuos cargados. Por tanto, en una realización preferida, se añade una sal a una disolución para reducir la cmc de un lipopéptido relacionado con daptomicina, tal como A54145, un lipopéptido relacionado con daptomicina dado a conocer en la patente estadounidense 4.537.717, 4.482.487, de nuevo examen 32.331, de nuevo examen 32.310, 5.912.226, actualmente en fase de nueva publicación como patente estadounidense n.º de serie 09/547.357, las solicitudes provisionales estadounidenses n.º 60/170.943, 60/170.946 ó 60/170.945, presentadas el 15 de diciembre de 1999, la solicitud provisional estadounidense número 60/208.222, presentada el 30 de mayo de 2000, o un antibiótico A-21978 en el que la cadena lateral de ácido graso de n-decanoílo de daptomicina se reemplaza por una cadena lateral de ácido graso de n-octanoílo, n-nonanoílo, n-undecanoílo, -dodecanoílo, n-tridecanoílo o n-tetradecanoílo. En otra realización, se reduce la concentración de sales con el fin de aumentar la cmc de un lipopéptido iónico. En una realización preferida, el lipopéptido iónico es daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina, tal como se describió anteriormente.

60 En otra realización preferida, la capacidad para manipular la formación de micelas de un lipopéptido alterando la concentración de electrolitos para afectar a la cmc se usa en la purificación del lipopéptido. En una realización más preferida, el lipopéptido es daptomicina o una molécula relacionada con daptomicina, tal como las descritas anteriormente. En una realización incluso más preferida, el lipopéptido es daptomicina. En otra realización preferida, la capacidad para manipular la formación de micelas de lipopéptidos mediante la concentración de electrolitos se usa para preparar composiciones farmacéuticas que son micelares a determinadas concentraciones de electrolitos y monoméricas en otras concentraciones de electrolitos. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas

comprenden daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina, tal como se describió anteriormente. En otra realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden daptomicina.

5 En la invención, el pH de una disolución que comprende un lipopéptido se manipula para influir en la cmc del lipopéptido. En una realización preferida, el lipopéptido es daptomicina o una molécula relacionada con daptomicina, tal como las descritas anteriormente. En una realización incluso más preferida, el lipopéptido es daptomicina. En una realización, se manipula el pH de manera que la concentración de un lipopéptido es mayor que la cmc a un pH y es menor que la cmc a otro pH. Por ejemplo, para daptomicina, la cmc a pH 4,0 en agua a una temperatura de 20-25°C era mucho menor que a pH 6,0 ó 7,5. A pH 4,0, la cmc es aproximadamente de 400 µg/ml en estas condiciones. Véase la figura 10 15. Además, la daptomicina es monomérica incluso a daptomicina 150 mg/ml a pH 6,5 (en el que la concentración de sales es de NaCl de 150 mM a 300 mM y la temperatura es de 4°C). Por tanto, para daptomicina, la cmc a pH 4,0 es menor que en disoluciones de o bien mayor pH o bien menor pH. El cambio en la cmc a diferentes niveles de pH también puede usarse para otros lipopéptidos cargados, incluyendo lipopéptidos que están relacionados con daptomicina, tal como se describió anteriormente.

La capacidad para manipular la formación de micelas de un lipopéptido alterando el pH para afectar a la cmc se usa en la purificación del lipopéptido. En una realización más preferida, el lipopéptido es daptomicina o una molécula relacionada con daptomicina, tal como las descritas anteriormente. En una 20 realización incluso más preferida, el lipopéptido es daptomicina. En otra realización preferida, la capacidad para manipular la formación de micelas de lipopéptidos mediante el pH se usa para preparar composiciones farmacéuticas que son micelares a un pH particular y monoméricas a otro pH. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina, tal como se describió anteriormente. En otra realización preferida, las 25 composiciones farmacéuticas comprenden daptomicina.

En otro aspecto de la invención, el lipopéptido puede ser parte de una micela mixta. Una micela mixta es una en la que el lipopéptido forma una micela con uno o más tipos diferentes de moléculas anfipáticas. Los ejemplos de tales moléculas anfipáticas incluyen, sin limitación, ácidos grasos de cadena media y larga, fosfoglicéridos (fosfolípidos), esfingomiélna, glicolípidos y colesterol. En una realización, los alcoholes de longitud de cadena media pueden incorporarse en la micela, donde reducen la repulsión electrostática y el impedimento estérico, reduciendo así la cmc del lipopéptido. En otra realización, la adición de uno o más tipos de moléculas anfipáticas puede usarse para alterar la estructura de la micela desde una micela esférica (véase la figura 14, parte a) hasta una estructura de bicapa lipídica (véase la 30 figura 14, parte b) o hasta una estructura de liposoma (véase la figura 14, parte c). En general, las micelas mixtas que comprenden fosfolípidos y/o glicolípidos provocarán que una micela esférica se convierta en una estructura de bicapa lipídica, que sirven como barreras de permeabilidad a los iones y la mayoría de moléculas polares.

En otra realización, la micela mixta puede formarse a partir de dos o más lipopéptidos diferentes. Por ejemplo, la micela mixta puede formarse a partir de daptomicina y otro lipopéptido, tal como A54145 o un lipopéptido relacionado con daptomicina, tal como se discutió anteriormente. En otra realización, la micela mixta puede comprender un lipopéptido junto con una o más moléculas anfipáticas terapéuticamente útiles, tales como un antibiótico, un antiinflamatorio o un agente antifúngico, que se 40 conocen por los expertos habituales en la técnica.

La daptomicina forma micelas de aproximadamente 5,4 nm (54 Å) a una concentración de 1 mg/ml a un pH de aproximadamente 4.0 en agua. Ver figura 16.

50 En otra realización preferida, las micelas comprenden uno o más tipos diferentes de sustancias terapéuticas. En una realización, una sustancia terapéutica puede mezclarse con el lipopéptido en disolución de manera que una micela se forma a partir del lipopéptido y la sustancia terapéutica queda atrapada en el interior hidrófobo. En otra realización, una sustancia terapéutica se mezcla con un lipopéptido y una o más moléculas anfipáticas diferentes de manera que una micela mixta se forma a 55 partir del lipopéptido y las otras moléculas anfipáticas y la sustancia terapéutica se encuentra en el interior hidrófobo. En una realización preferida, la sustancia terapéutica es un antibiótico, un antiinflamatorio o un agente antifúngico. En una realización más preferida, la sustancia terapéutica es un antibiótico o un agente antifúngico dado a conocer más adelante. En otra realización preferida, la sustancia terapéutica es soluble en un entorno hidrófobo pero no es soluble en una disolución acuosa.

60 En otra realización de la invención, los lipopéptidos pueden formarse en liposomas, que son micelas vesiculares en las que una bicapa lipídica esférica rodea un interior acuoso. Véase la figura 14, parte c. Los liposomas son ventajosos para usos terapéuticos porque se fusionan fácilmente con una membrana plasmática y también pueden usarse para atrapar sustancias en su compartimento acuoso interno. La sustancia puede ser una que es soluble solamente en disoluciones acuosas. En una 65 realización, una disolución que comprende un lipopéptido y otra molécula anfipática puede sonicarse para

producir liposomas. En otra realización, el lipopéptido solo puede sonicarse para producir liposomas. En una realización preferida, el liposoma comprende daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina tal como A54145, un lipopéptido dado a conocer en las patentes estadounidenses 4.537.717, 4.482.487, de nuevo examen 32.331, de nuevo examen 32.310, 5.912.226, actualmente en fase de nueva publicación como patente estadounidense n.º de serie 09/547.357, las solicitudes provisionales estadounidenses n.º 60/170.943, 60/170.946 ó 60/170.945, presentadas el 15 de diciembre de 1999, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/208.222, presentada el 30 de mayo de 2000, o el antibiótico A-21978 en el que la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo de daptomicina se reemplaza por una cadena lateral de ácido graso de n-octanoilo, n-nonanoilo, n-undecanoilo, -dodecanoilo, n-tridecanoilo o n-tetradecanoilo. En una realización más preferida, el lipopéptido es daptomicina.

En otra realización preferida, los liposomas comprenden una o más sustancias terapéuticas en sus compartimentos acuosos internos. En una realización preferida, la sustancia terapéutica es un antibiótico, un antiinflamatorio o un agente antifúngico. En una realización más preferida, la sustancia terapéutica es un antibiótico o un agente antifúngico dado a conocer más adelante. En otra realización preferida, la sustancia terapéutica es soluble en disolución acuosa. En otra realización preferida, una composición farmacéutica comprende el liposoma.

En una realización preferida, una composición farmacéutica comprende micelas de lipopéptidos o una micela de lipopéptido que contiene una sustancia terapéutica. Las micelas de lipopéptidos pueden ser micelas esféricas, micelas mixtas o liposomas. Las composiciones farmacéuticas que comprenden micelas de lipopéptidos pueden minimizar la irritación local tras la inyección o cuando se administran por vía intravenosa. En una realización, la composición farmacéutica comprende una sal, un tampón para mantener un pH particular y micelas. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende uno o más agentes para estabilizar las micelas y/o estabilizar el lipopéptido u otra sustancia terapéutica. En una realización, la composición farmacéutica también comprende una o más sustancias terapéuticas. En una realización preferida, la sustancia terapéutica es un antibiótico, un antiinflamatorio o un agente antifúngico. En una realización más preferida, la sustancia terapéutica es un antibiótico o un agente antifúngico dado a conocer más adelante. La sustancia terapéutica puede estar además de la sustancia terapéutica que se incorpora dentro de la micela, o puede ser el agente terapéutico que se incorpora dentro de la micela.

La composición farmacéutica puede secarse o liofilizarse, en cuyo caso la micelas se forman cuando o bien una disolución acuosa, tal como agua, o bien un tampón se añade a la composición farmacéutica. En una realización preferida, la composición farmacéutica se liofiliza y contiene una concentración fisiológica de sal cuando se reconstituye y un tampón que mantiene un pH al cual las micelas se forman espontáneamente a temperatura ambiente cuando se añade agua estéril u otro tampón. En una realización incluso más preferida, la composición farmacéutica comprende daptomicina o lipopéptido relacionado, tal como A54145, los lipopéptidos relacionados con daptomicina dados a conocer anteriormente, o un antibiótico A-21978 en el que la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo de daptomicina se reemplaza por una cadena lateral de ácido graso de n-octanoilo, n-nonanoilo, n-undecanoilo, n-dodecanoilo, n-tridecanoilo o n-tetradecanoilo. En una realización aún más preferida, el lipopéptido es daptomicina. En otra realización, la composición farmacéutica es acuosa. Esto se prefiere cuando se usan liposomas. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende un agente estabilizante para los liposomas.

En otro aspecto de la invención, la disolución micelar se aísla y/o purifica. En una realización, las micelas se aíslan de sustituyentes más pequeños mediante ultrafiltración. La elección de la membrana de ultrafiltración se basará en el tamaño de la micela. En general, una membrana de PMN de 10.000 o PMN de 30.000 será suficiente para retener las micelas mientras permite que fluyan a través sustituyentes más pequeños, tales como contaminantes. En otra realización, las micelas pueden aislarse y/o purificarse mediante diálisis, centrifugación en gradiente de densidad o cromatografía de exclusión por tamaño. Estos métodos se conocen bien en la técnica. En una realización, las micelas tienen una pureza superior al 30%, midiéndose la pureza como el peso de las micelas en comparación con el peso de las formas monoméricas del lipopéptido o de otras moléculas. En una realización preferida, las micelas tienen una pureza superior al 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%.

En la invención, la capacidad para formar micelas de daptomicina y después disociarlas alterando el pH proporciona un método para purificar diptomicina. El método de la invención comprende purificar daptomicina de contaminantes de bajo peso molecular sometiendo la daptomicina a condiciones en las que se forma una solución micelar de daptomicina alternado el pH y después separando las micelas de daptomicina en la solución micelar de los contaminantes por una técnica de selección por tamaño, como ultrafiltración o cromatografía de exclusión por tamaño. En otra realización de la invención, el método comprende concentrar daptomicina sometiendo a la daptomicina a condiciones en las que la daptomicina forma micelas y después concentrándolas por una técnica de selección por tamaño.



En una realización más preferida, el método comprende tanto la purificación como la concentración como una única etapa.

5 El método de la invención comprende además purificar daptomicina de contaminantes de alto peso molecular, incluyendo pirógenos (por ejemplo lipopolisacáridos), sometiendo la daptomicina a condiciones en las que se forma una solución monomérica de daptomicina alternado el pH y después separando las moléculas de daptomicina monoméricas en la solución monomérica de daptomicina de los contaminantes de alto peso molecular por una técnica de separación por tamaño.

10 En una realización preferida, la técnica de separación por tamaño es la ultrafiltración, tal como se discutió anteriormente.

15 Una realización preferida del método de cromatografía de procedimiento que usa micelas para purificar daptomicina se describe a continuación:

Se fermenta *Streptomyces roseosporus* con una alimentación de ácido n-decanoico tal como se describió anteriormente. Tras la fermentación, se clarifica la disolución extracelular tal como se describió anteriormente.

20 Entonces se aplica la preparación clarificada a una resina de intercambio aniónico, tal como FP-DA 13, tal como se describió anteriormente. La daptomicina se eluye desde la columna con de uno a tres volúmenes de columna de un tampón con alta concentración de sal que contiene NaCl de 300 a 500 mM.

25 La preparación de daptomicina eluida se ajusta a un pH de 2,5 a 5,0 usando un ácido. En una realización preferida, el ácido es ácido fosfórico diluido. A pH de 2,5 a 4,7, NaCl de 300 a 500 mM y una temperatura de 2-15°C, la daptomicina forma una micela.

30 La preparación de daptomicina se filtra en una membrana de ultrafiltración de PMN de 10.000 a 30.000. Durante la ultrafiltración, la preparación de daptomicina se lava con un tampón que contiene acetato de sodio 30 mM, pH 3,5 y a temperaturas de hasta 15°C. La concentración inicial de sales es de NaCl 300 mM debido a las condiciones de elución, pero la concentración de sales disminuye a medida que continúa el lavado. Puesto que daptomicina está en forma micelar, queda retenida en el filtro mientras que las impurezas menores de 10.000 a 30.000 (dependiendo del filtro usado), pasan a través del filtro. La preparación de daptomicina obtenida tiene una pureza de aproximadamente el 85-90%.

35 Como etapa opcional, puede diluirse la preparación de daptomicina y elevarse su pH hasta 6,5 con el fin de convertir la daptomicina a un estado monomérico. La preparación de daptomicina se pasa entonces a través de una membrana de ultrafiltración de PMN de 10.000. Esta etapa opcional reduce el contenido en pirógenos significativamente.

40 Métodos para analizar la pureza de daptomicina

45 Otra realización de la invención proporciona métodos analíticos para medir la pureza de daptomicina.

50 En la técnica anterior, muchos de los contaminantes que se purifican conjuntamente con daptomicina no se resolvían o identificaban porque la capacidad para visualizar y medir las impurezas estaba limitada por los equipos y métodos analíticos disponibles. Véase por ejemplo la patente estadounidense 4.874.843 y Kirsch *et al.* El desarrollo de técnicas y sistemas de HPLC analíticos más sensibles permite la resolución de una serie de contaminantes que existen en lotes de daptomicina preparados mediante los métodos de la técnica anterior. Los métodos de HPLC de mayor resolución demuestran que la daptomicina tal como se purifica mediante los métodos de la técnica anterior se contamina con impurezas anteriormente identificadas, tales como anhidro-daptomicina e isómero  $\beta$ , y otros contaminantes anteriormente desconocidos que se purifican conjuntamente con daptomicina (y se eluyen conjuntamente en las condiciones de detección de HPLC establecidas anteriormente) durante la práctica de los métodos de la técnica anterior. La identificación de estos contaminantes ahora permite el desarrollo de métodos diseñados para eliminar estos contaminantes.

60 Tal como se discutió anteriormente, la anhidro-daptomicina y el isómero  $\beta$  se describieron anteriormente como impurezas que se producían de manera persistente y consistente durante la preparación de daptomicina. Usando los análisis de HPLC descritos en el presente documento, se distinguieron aproximadamente doce impurezas adicionales producidas durante la producción de daptomicina, algunas de las cuales no se habían identificado anteriormente. Estas impurezas no se eliminaron tras la purificación mediante el método dado a conocer en la patente estadounidense 4.874.843. Se han identificado al menos diez de estos compuestos (véanse por ejemplo las figuras 2-11). Además, al menos seis de estos compuestos no son el resultado directo de la reacción que produce

anhidro-daptomicina y la forma de isómero  $\beta$  de daptomicina, sino más bien son compuestos producidos mediante otros procedimientos, no relacionados, que se producen durante la fermentación o la purificación de daptomicina. El método de la presente invención, descrito a continuación, también reduce significativamente los niveles de varias de estas impurezas (véanse los ejemplos).

5  
10  
Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para medir la cantidad de otros compuestos en una preparación de daptomicina. Los métodos para identificar contaminantes de daptomicina incluyen, sin limitación, espectroscopía de masas, espectroscopía infrarroja, electroforesis capilar y espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Un método preferido para medir la cantidad de otros compuestos en una preparación de daptomicina es HPLC.

15  
Se usaron dos métodos para medir las impurezas de daptomicina en la presente invención. El primer método es un método de resolución ligeramente menor que el segundo método. En ambos métodos, se usa un sistema de HPLC HP o Shimadzu con el software Turbochrom versión 4.1 de PE Nelson. El "primer" método de resolución se resume en la tabla 1 y el "segundo" método de resolución se resume en la tabla 2:

**TABLA 1**

- 20
1. Sistema de suministro de disolvente:
 

Modo:	bombeo isocrático
Tasa de flujo:	1,5 ml/min.
Tiempo de ejecución:	30 minutos
  - 25
  2. Disolvente A: acetoniitrilo al 34% en  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  al 0,5% a pH 4,5  
 Disolvente B: acetoniitrilo al 20% en  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  al 0,5% a pH 4,5  
 La condición objetivo es retener daptomicina a  $15,0 \pm 0,5$  minutos. El disolvente B puede usarse junto con el disolvente A para ajustar las condiciones de la fase móvil de HPLC para lograr el tiempo de retención deseado.
  - 30
  3. Enfriador del inyector automático: 5 (de 4 a 6) $^\circ\text{C}$
  - 35
  4. Volumen de inyección: de 5  $\mu\text{l}$  a 75  $\mu\text{l}$  (normal 20  $\mu\text{l}$ )
  - 40
  5. Columna: IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5 $\mu$ , 4,6 mm x 250 mm (o equivalente)
  6. Precolumna: IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5 $\mu$ , 4,6 mm x 30 mm (o equivalente)
  - 45
  7. Longitud de onda de detección: 214 nm
  - 50
  8. Temperatura de la columna: ambiental
  - 55
  9. Integración: Un sistema o integrador informático que puede medir el área de pico.
  - 60
  - 65

**TABLA 2**

5	1. Sistema de suministro de disolvente:	
	Modo:	bombeo isocrático
	Tasa de flujo:	1,5 ml/min.
	Tiempo de ejecución:	75 minutos
10	2. Disolvente A:	acetonitrilo al 20% en NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> al 0,45% a pH 3,25
	Disolvente B:	acetonitrilo al 50% en NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> al 0,45% a pH 3,25
15	La condición objetivo es acetonitrilo aproximadamente al 35% en NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> al 0,45% a pH 3,25 (50% del disolvente B) para retener daptomicina a 36,0 ± 1,5 minutos; sin embargo, la proporción de los disolventes se usará para ajustar la composición de la fase móvil de HPLC para lograr el tiempo de retención deseado.	
20	3. Enfriador del inyector automático:	5 (de 4 a 6)°C
25	4. Volumen de inyección:	de 5 µl a 75 µl (normal 20 µl)
30	5. Columna:	IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5µ, 4,6 mm x 250 mm (o equivalente)
	6. Precolumna:	IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5µ, 4,6 mm x 30 mm (o equivalente)
35	7. Longitud de onda de detección:	214 nm
40	8. Temperatura de la columna:	25 (de 22 a 28)°C
45	9. Integración:	Un sistema o integrador informático que puede medir el área de pico.

50

55

60

65

Lipopéptidos purificados, composiciones farmacéuticas y métodos de uso de los mismos

5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar lipopéptidos purificados, así como sales, ésteres, amidas, éteres y formas protegidas de los mismos, así como formulaciones farmacéuticas que comprenden lipopéptidos purificados o sus sales. En una realización preferida, el lipopéptido es daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina, tal como se describió anteriormente. Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden micelas de lipopéptidos. En una realización preferida, las micelas de lipopéptidos son micelas que comprenden daptomicina o uno o más lipopéptidos relacionados con daptomicina. Toda referencia en el presente documento a micelas de lipopéptidos se refiere no sólo a todas las micelas de lipopéptidos, sino específicamente contempla la daptomicina o un lipopéptido relacionado, tal como A54145, los lipopéptidos relacionados con daptomicina dados a conocer anteriormente, o un antibiótico A-21978 en el que la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo de daptomicina se reemplaza por una cadena lateral de ácido graso de n-octanoilo, n-nonanoilo, n-undecanoilo, n-dodecanoilo, n-tridecanoilo o n-tetradecanoilo. Además, todas las referencias en el presente documento a micelas de lipopéptidos contemplan específicamente micelas esféricas, micelas mixtas y liposomas, tal como se discutió anteriormente.

20 Los lipopéptidos purificados, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos o las micelas de lipopéptidos pueden formularse para su administración oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, en aerosol, tópica o parenteral para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades, particularmente infecciones bacterianas. En una realización preferida, el lipopéptido purificado es daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina purificado. La referencia en el presente documento a "daptomicina purificada", "lipopéptido relacionado con daptomicina purificado" o "lipopéptido purificado" incluye las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las micelas de daptomicina, lipopéptido relacionado con daptomicina u otro lipopéptido pueden formularse usando cualquier excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable que sea compatible con daptomicina o con el lipopéptido de interés. Véase por ejemplo Handbook of Pharmaceutical Additives: An International Guide to More than 6000 Products by Trade Name, Chemical, Function, and Manufacturer, Ashgate Publishing Co., editores M. Ash e I. Ash, 1996; The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, editor S. Budavari, publicación anual; Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA; Martindale: The Complete Drug Reference, editor K. Parfitt, 1999; y Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Pergamon Press, Nueva York, NY, editor L.S. Goodman *et al.*; para una descripción general de los métodos para administrar diversos agentes antimicrobianos para tratamiento en seres humanos. Las micelas de daptomicina, lipopéptido relacionado con daptomicina u otro lipopéptido purificado de esta invención pueden mezclarse con excipientes y vehículos farmacéuticos convencionales y usarse en forma de comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, cremas y similares. Las micelas de daptomicina, lipopéptido relacionado con daptomicina u otro lipopéptido pueden mezclarse con otros agentes terapéuticos y antibióticos, tal como se discute en el presente documento. Las composiciones que comprenden un compuesto de esta invención contendrán desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 90% en peso del compuesto activo, y más generalmente desde aproximadamente el 10 hasta aproximadamente el 30%.

45 Las composiciones de la invención pueden administrarse usando sistemas de administración de liberación controlada (por ejemplo cápsulas) o sostenida (por ejemplo matrices biodegradables). Ejemplos de sistemas de administración de liberación retardada para la administración de fármacos que son adecuados para la administración de las composiciones de la invención se describen en las patentes estadounidenses n.º 4.452.775 (concedida a Kent), 5.239.660 (concedida a Leonard), 3.854.480 (concedida a Zaffaroni).

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

60 Los aglutinantes para comprimidos que pueden incluirse son goma arábiga, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona (Povidona), hipromelosa, sacarosa, almidón y etilcelulosa.

Los lubricantes que pueden usarse incluyen estearato de magnesio u otros estearatos metálicos, ácido esteárico, silicona fluida, talco, ceras, aceites y sílice coloidal.

65 También pueden usarse agentes aromatizantes tales como menta piperita, aceite de gaulteria, aroma de cereza o similares. También puede ser deseable añadir un agente colorante para hacer la forma farmacéutica más estética en apariencia o para ayudar a identificar el producto.

Para uso oral, las formulaciones sólidas tales como comprimidos o cápsulas son particularmente útiles. También pueden idearse preparaciones con recubierta entérica o de liberación sostenida. Para aplicaciones pediátricas y geriátricas, las suspensiones, los jarabes y los comprimidos masticables son especialmente adecuados. Para administración oral, las composiciones farmacéuticas son en forma de, por ejemplo, un comprimido, una cápsula, una suspensión o un líquido. La composición farmacéutica se prepara preferiblemente en forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo. Ejemplos de tales unidades de dosificación son comprimidos y cápsulas. Para fines terapéuticos, los comprimidos y las cápsulas que pueden contener, además del principio activo, vehículos convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo goma arábiga, gelatina, polivinilpirrolidona, sorbitol o tragacanto; cargas, por ejemplo fosfato de calcio, glicina, lactosa, almidón de maíz, sorbitol o sacarosa; lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, polietilenglicol, sílice o talco; disgregantes, por ejemplo almidón de patata; agentes aromatizantes o colorantes, o agentes humectantes aceptables. Las preparaciones líquidas orales generalmente son en forma de disoluciones, suspensiones emulsiones, jarabes o elixires acuosos o aceitosos que pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes no acuosos, conservantes, agentes colorantes y agentes aromatizantes. Las preparaciones líquidas orales pueden comprender micelas de lipopéptidos o formas monoméricas del lipopéptido. Los ejemplos de aditivos para preparaciones líquidas incluyen goma arábiga, aceite de almendras, alcohol etílico, aceite de coco fraccionado, gelatina, jarabe de glucosa, glicerina, grasas comestibles hidrogenadas, lecitina, metilcelulosa, para-hidroxibenzoato de metilo o propilo, propilenglicol, sorbitol o ácido sórbico.

Para uso intravenoso (i.v.), una forma soluble en agua de daptomicina, lipopéptido relacionado con daptomicina u otro lipopéptido puede disolverse en cualquiera de los fluidos intravenosos usados comúnmente y administrarse mediante infusión. Para las micelas de lipopéptidos, el lipopéptido se disuelve en una formulación intravenosa en condiciones en las que el lipopéptido está presente a una concentración por encima de su cmc. Un experto habitual en la técnica puede variar el pH, la temperatura o la concentración de sales siguiendo las enseñanzas de esta invención para obtener una disolución intravenosa que comprende micelas de lipopéptidos. Además, puede sonicarse la disolución de lipopéptido con el fin de obtener liposomas de lipopéptido. Las formulaciones intravenosas pueden incluir vehículos, excipientes o estabilizadores que incluyen, sin limitación, calcio, albúmina sérica humana, citrato, acetato, cloruro de calcio, carbonato y otras sales. Los fluidos intravenosos incluyen, sin limitación, solución salina fisiológica o solución de Ringer. La daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina también puede colocarse en inyectoras, cánulas, catéteres y vías.

Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de disoluciones o suspensiones inyectables estériles isotónicas acuosas o no acuosas. Estas disoluciones o suspensiones pueden prepararse a partir de polvos o gránulos estériles que tienen uno o más de los vehículos mencionados para su uso en las formulaciones para administración oral. Las micelas de lipopéptidos pueden ser particularmente deseables para la administración parenteral. Los compuestos pueden disolverse en polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, alcohol bencílico, cloruro de sodio y/o diversos tampones. Para las preparaciones intramusculares, una formulación estéril de un compuesto de lipopéptido o una forma de sal soluble adecuada del compuesto, por ejemplo la sal de clorhidrato, puede disolverse y administrarse en un diluyente farmacéutico tal como agua para inyección (API), solución salina fisiológica o glucosa al 5%.

Las micelas de lipopéptidos pueden ser particularmente deseables para la administración parenteral porque es probable que no provoquen irritación local en el sitio de inyección. Sin querer restringirse a ninguna teoría, es probable que las micelas de lipopéptidos provoquen menos irritación local que los lipopéptidos monoméricos porque las colas lipídicas, que pueden provocar irritación tras la inyección, quedarán secuestradas en el interior de la micela, mientras que el núcleo peptídico, que es menos probable que provoque irritación local que la cola lipídica, quedará expuesto al tejido. Las micelas de lipopéptidos pueden prepararse para preparaciones intramusculares y parenterales siguiendo las enseñanzas de esta invención para obtener una preparación que comprende micelas de lipopéptidos. Además, puede sonicarse la disolución de lipopéptido con el fin de obtener liposomas de lipopéptido. Una forma insoluble adecuada del compuesto también puede prepararse y administrarse como una suspensión en una base acuosa o una base aceitosa farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un éster de un ácido graso de cadena larga tal como oleato de etilo.

Las formas de liberación lenta inyectables pueden prepararse formando matrices microencapsuladas del compuesto en polímeros biodegradables tal como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la razón del fármaco con respecto al polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhidridos). Las formulaciones inyectables de liberación lenta también se prepararan atrapando el fármaco en microemulsiones que son compatibles con los tejidos del organismo.

Para uso tópico, los compuestos y las micelas de la presente divulgación también pueden prepararse en formas adecuadas para aplicarse a la piel, o las membranas mucosas de la nariz y la garganta, y pueden tomar la forma de cremas, ungüentos, inhalantes o pulverizadores líquidos, pastillas para chupar o jarabes espesos para la garganta. Tales formulaciones tópicas pueden incluir además compuestos químicos tales como dimetilsulfóxido (DMSO) para facilitar la penetración en superficie del principio activo. Para preparaciones tópicas, una formulación estéril de daptomicina, lipopéptido relacionado con daptomicina, formas de sales adecuadas de los mismos o una micela de lipopéptido puede administrarse en una crema, ungüento, pulverizador u otro apósito tópico. Las preparaciones tópicas también pueden estar en forma de vendas que se han impregnado con daptomicina, lipopéptido relacionado con daptomicina o una composición de micelas de lipopéptidos purificado.

Para aplicación en los ojos o las orejas, los compuestos de la presente invención pueden presentarse en forma líquida o semilíquida formulada en bases hidrófobas o hidrófilas como ungüentos, cremas, lociones, jarabes espesos o polvos.

Para administración rectal, los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma de supositorios mezclados con vehículos convencionales tales como manteca de cacao, cera u otros glúcidos.

Para preparaciones en aerosol, una formulación estéril de daptomicina o un lipopéptido relacionado con daptomicina purificado o la forma de sal del compuesto puede usarse en inhaladores, tales como inhaladores de dosis medidas, y nebulizadores. Una formulación estéril de una micela de lipopéptido también puede usarse para preparación en aerosol. Las formas en aerosol pueden ser especialmente útiles para tratar infecciones respiratorias, tales como neumonía e infecciones de los senos paranasales.

Alternativamente, los compuestos de la presente invención pueden estar en forma de polvo para reconstitución en el vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado en el momento de la administración. Si la forma de polvo ha de reconstituirse como micelas de lipopéptidos, el polvo puede comprender un tampón y/o una sal tal que la reconstitución con una cantidad particular de agua estéril o solución salina provocará que el lipopéptido forme micelas. Alternativamente, la forma de polvo puede contener instrucciones en cuanto a la cantidad y el tipo de vehículo farmacéuticamente aceptable que ha de usarse para reconstituir el lipopéptido con el fin de obtener micelas. En otra realización, la forma de dosificación unitaria del compuesto puede ser una disolución del compuesto, una sal del mismo o una micela de lipopéptido en un diluyente adecuado en ampollas selladas herméticamente, estériles. La concentración del compuesto en la dosificación unitaria puede variar, por ejemplo, desde aproximadamente el 1 por ciento hasta aproximadamente el 50 por ciento, dependiendo del compuesto usado y su solubilidad y la dosis deseada por el médico. Si las composiciones contienen unidades de dosificación, cada unidad de dosificación contiene preferiblemente desde 50-500 mg del material activo. Para el tratamiento de seres humanos adultos, la dosificación empleada preferiblemente oscila de desde 100 mg hasta 3 g, por día, dependiendo de la vía y la frecuencia de administración.

En un aspecto adicional, esta divulgación proporciona un método para tratar una infección, especialmente aquellas provocadas por bacterias gram-positivas, en seres humanos y otros animales. El término "tratar" se usa para designar tanto la prevención de una infección como el control de una infección establecida después de que se ha infectado el animal huésped. Una infección establecida puede ser una que es aguda o crónica. El método comprende administrar al ser humano u otro animal una dosis eficaz de un compuesto de esta invención. Una dosis eficaz generalmente es de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 25 mg/kg de daptomicina, lipopéptido relacionado con daptomicina o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos purificados. La daptomicina o el lipopéptido relacionado con daptomicina puede ser monomérico o puede ser parte de una micela de lipopéptido. Una dosis preferida es de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 25 mg/kg de daptomicina o lipopéptido relacionado con daptomicina o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos purificados. Una dosis más preferida es de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 12 mg/kg de daptomicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma purificadas.

En una realización, la divulgación proporciona un método para tratar una infección, especialmente aquellas provocadas por bacterias gram-positivas, en un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de daptomicina u otro lipopéptido antibacteriano. La daptomicina o el lipopéptido antibacteriano puede ser monomérico o estar en una micela de lipopéptido. Procedimientos a modo de ejemplo para administrar un agente antibacteriano se describen en la patente estadounidense número 5.041.567, concedida a Rogers y en la solicitud de patente PCT número EP94/02552 (publicación n.º WO 95/05384). Tal como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de daptomicina o lipopéptido antibacteriano según la presente invención que previene la aparición, alivia los síntomas o detiene la progresión de una infección bacteriana. El término "tratar" se define como administrar, a un sujeto, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto

de la invención, tanto para prevenir la aparición de una infección como para controlar o eliminar una infección. El término "sujeto", tal como se describe en el presente documento, se define como un mamífero, una planta o un cultivo celular. En una realización preferida, un sujeto es un paciente humano u otro animal que necesita tratamiento con compuestos de lipopéptido.

5

El compuesto de antibiótico lipopeptídico puede administrarse como una única dosis diaria o en dosis múltiples por día. El régimen de tratamiento puede requerir la administración durante periodos prolongados de tiempo, por ejemplo, durante varios días o durante desde dos hasta cuatro semanas. La cantidad por dosis administrada o la cantidad total administrada dependerá de factores tales como la naturaleza y la gravedad de la infección, la edad y el estado de salud general del paciente, la tolerancia del paciente al antibiótico y el microorganismo o los microorganismos implicados en la infección. Un método de administración se da a conocer en la patente estadounidense n.º de serie 09/406.568, presentada el 24 de septiembre de 1999, que reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales estadounidenses n.º 60/101.828, presentada el 25 de septiembre de 1998, y 60/125.750, presentada el 24 de marzo de 1999.

10

Los métodos de la presente divulgación comprenden administrar daptomicina u otro antibiótico lipopeptídico purificados, o composiciones farmacéuticas de los mismos a un paciente que necesita los mismos en una cantidad que es eficaz en reducir o eliminar la infección por bacterias gram-positivas. La daptomicina o el antibiótico lipopeptídico puede ser o bien monomérico o bien puede estar presente en una micela de lipopéptido. El antibiótico puede administrarse por vía oral, por vía parenteral, por inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal, o mediante un reservorio implantado, una bomba externa o un catéter. El antibiótico puede prepararse para usos oftálmicos o en aerosol. La daptomicina, antibiótico lipopeptídico purificados o composiciones farmacéuticas de los mismos también pueden inyectarse o administrarse directamente en un absceso, un ventrículo o una articulación. La administración parenteral incluye la inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasnovial, cisternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. En una realización preferida, la daptomicina u otro lipopéptido se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía oral.

15

El método de la presente divulgación puede usarse para tratar un paciente que tiene una infección bacteriana en la que la infección se provoca o exacerba por cualquier tipo de bacteria gram-positiva. En una realización preferida, la daptomicina, el lipopéptido relacionado con daptomicina, otro lipopéptido purificados o composiciones farmacéuticas de los mismos se administran a un paciente según los métodos de esta invención. En otra realización preferida, la infección bacteriana puede provocarse o agravarse por bacterias que incluyen, pero no se limitan a, estafilococos sensibles a meticilina y resistentes a meticilina (incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus* y estafilococos coagulasa negativos), *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a glucopéptidos (SAIG), estreptococos sensibles a penicilina y resistentes a penicilina (incluyendo *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus sanguis* del grupo C, estreptococos del grupo G y estreptococos viridans), enterococos (incluyendo cepas sensibles a vancomicina y resistentes a vancomicina tales como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*), *Clostridium difficile*, *Clostridium clostridiiforme*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium perfringes*, *Clostridium ramosum*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium jeikeium*, *Bifidobacterium spp.*, *Eubacterium aerofaciens*, *Eubacterium lentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus asaccarolyticus*, *Peptostreptococcus magnus*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus productus*, *Propionibacterium acnes* y *Actinomyces spp.*

20

25

30

35

40

45

50

La actividad antibacteriana de la daptomicina frente a cepas clásicamente "resistentes" es comparable con aquella frente a cepas clásicamente "sensibles" en experimentos *in vitro*. Además, el valor de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para daptomicina frente a las cepas sensibles es normalmente 4 veces menor que aquella de vancomicina. Por tanto, en una realización preferida, la daptomicina, el antibiótico lipopeptídico relacionado con daptomicina purificado o composiciones farmacéuticas de los mismos se administran según los métodos de esta invención a un paciente que presenta una infección bacteriana que es resistente a otros antibióticos, incluyendo vancomicina. Además, a diferencia de los antibióticos glicopeptídicos, la daptomicina presenta actividad bactericida dependiente de la concentración rápida contra los organismos gram positivos. Por tanto, en una realización preferida, la daptomicina, el antibiótico lipopeptídico purificado o composiciones farmacéuticas de los mismos se administran según los métodos de esta invención a un paciente que necesite tratamiento antibiótico de acción rápida.

55

60

El método de la presente divulgación puede usarse para una infección por bacterias gram-positivas de cualquier órgano o tejido del organismo. Estos órganos o tejidos incluyen, sin limitación,

músculo esquelético, piel, corriente sanguínea, riñones, corazón, pulmón y hueso. El método de la invención puede usarse para tratar, sin limitación, infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia e infecciones del tracto urinario. El método de la invención puede usarse para tratar infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad, que incluyen, sin limitación, otitis media, sinusitis, bronquitis crónica y neumonía, incluyendo neumonía provocada por *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae* resistente a fármacos. El método de la invención también puede usarse para tratar infecciones mixtas que comprenden diferentes tipos de bacterias gram-positivas, o que comprenden tanto bacterias gram-positivas como gram-negativas, incluyendo bacterias aerobias, capnófilas o anaerobias. Estos tipos de infecciones incluyen infecciones intraabdominales e infecciones obstétricas/ginecológicas. Los métodos de la invención pueden usarse en tratamiento escalonado descendente para infecciones hospitalarias, que incluyen, sin limitación, neumonía, septicemia intraabdominal, infecciones de piel y tejidos blandos e infecciones de huesos y articulaciones. El método de la invención también puede usarse para tratar una infección que incluye, sin limitación, endocarditis, nefritis, artritis séptica y osteomielitis. En una realización preferida, cualquiera de las enfermedades descritas anteriormente puede tratarse usando daptomicina, antibiótico lipopeptídico purificados o composiciones farmacéuticas de los mismos. Además, las enfermedades pueden tratarse usando daptomicina o antibiótico lipopeptídico en o bien una forma monomérica o bien micelar.

La daptomicina, el lipopéptido relacionado con daptomicina u otro lipopéptido también puede administrarse en la dieta o la alimentación de un paciente o un animal. Si se administra como parte de una ingesta dietética total, la cantidad de daptomicina u otro lipopéptido puede ser inferior al 1% en peso de la dieta y preferiblemente no más del 0,5% en peso. La dieta para los animales puede ser productos alimenticios normales a los que puede añadirse daptomicina o lipopéptido o ésta puede añadirse a una mezcla previa.

El método de la presente divulgación también puede ponerse en práctica mientras se administra al mismo tiempo uno o más agentes antifúngicos y/o uno o más antibióticos distintos de daptomicina u otro antibiótico lipopeptídico. La administración conjunta de un agente antifúngico y un antibiótico distinto de daptomicina u otro antibiótico lipopeptídico puede ser útil para infecciones mixtas tales como aquéllas provocadas por diferentes tipos de bacterias gram-positivas, aquéllas provocadas tanto por bacterias gram-positivas como gram-negativas o aquéllas provocadas tanto por bacterias como hongos. Además, la daptomicina u otro antibiótico lipopeptídico puede mejorar el perfil de toxicidad de uno o más antibióticos administrados conjuntamente. Se ha demostrado que la administración de daptomicina y un aminoglicósido puede mejorar la toxicidad renal provocada por los aminoglicósidos. En una realización preferida, un antibiótico y/o un agente antifúngico pueden administrarse al mismo tiempo con daptomicina, otro antibiótico lipopeptídico purificados o en composiciones farmacéuticas que comprenden daptomicina u otro antibiótico lipopeptídico purificados.

La administración conjunta de otro agente terapéutico con daptomicina u otro antibiótico lipopeptídico puede realizarse usando daptomicina o antibiótico lipopeptídico en forma o bien monomérica o bien micelar. Tal como se discutió anteriormente, las micelas de lipopéptidos esféricas pueden usarse para ayudar a solubilizar agentes que presentan una baja solubilidad acuosa. Además, los liposomas de lipopéptido pueden usarse para atrapar agentes, que son solubles en medios acuosos, en el interior de la vesícula de los liposomas. Siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva, un experto habitual en la técnica podría preparar micelas de lipopéptidos que comprenden agentes terapéuticos, tales como agentes antiinflamatorios, agentes antifúngicos y otros antibióticos.

Los agentes antibacterianos y las clases de los mismos que pueden administrarse conjuntamente con daptomicina u otros antibióticos lipopeptídicos incluyen, sin limitación, penicilinas y fármacos relacionados, carbapenems, cefalosporinas y fármacos relacionados, aminoglicósidos, bacitracina, gramicidina, mupirocina, cloranfenicol, tianfenicol, fusidato sódico, lincomicina, clindamicina, macrólidos, novobiocina, polimixinas, rifamicinas, espectinomicina, tetraciclinas, vancomicina, teicoplanina, estreptograminas, agentes antifolato incluyendo sulfonamidas, trimetoprima y sus combinaciones y pirimetamina, antibacterianos sintéticos incluyendo nitrofuranos, mandelato de metenammina e hipurato de metenammina, nitroimidazoles, quinolonas, fluoroquinolonas, isoniazida, etambutol, pirazinamida, ácido para-aminosalicílico (PAS), cicloserina, capreomicina, etionamida, protonamida, tiacetazona, viomicina, eveminomicina, glicopéptido, glicilciclina, cetólidos, oxazolidinona; imipenen, amikacina, netilmicina, fosfomicina, gentamicina, ceftriaxona, Zircin, LY 333328, CL 331002, HMR 3647, Linezolid, Synercid, Aztreonam y Metronidazol, Epiroprima, OCA-983, GV-143253, Sanfetrinem sódico, CS-834, Biapenem, A-99058.1, A-165600, A-179796, KA 159, Dinemicina A, DX8739, DU 6681; Cefluprenam, ER 35786, Cefoselis, Sanfetrinem cilexetilo, HGP-31, Cefpiroma, HMR-3647, RU-59863, Mersacidina, KP736, Rifalazil; Kosan, AM 1732, MEN 10700, Lenapenem, BO 2502A, NE-1530, PR 39, K130, OPC 20000, OPC 2045, Venepim, PD 138312, PD 140248, CP 111905, Sulopenem, ritipenam acoxilo, RO-65-5788, Ciclotialidina, Sch-40832, SEP-132613, micacocidina A, SB-275833, SR-15402, SUN A0026, TOC 39, carumonam, Cefozopran, Cefetamet pivoxilo y T 3811.



En una realización preferida, los agentes antibacterianos que pueden administrarse conjuntamente con daptomicina según ésta invención incluyen, sin limitación, imipenem, amikacina, netilmicina, fosfomicina, gentamicina, ceftriaxona, teicoplanina, Ziracin, LY 333328, CL 331002, HMR 3647, Linezolid, Synercid, Aztreonam y Metronidazol.

Los agentes antifúngicos que pueden administrarse conjuntamente con daptomicina u otro antibiótico lipopeptídico incluyen, sin limitación, Caspofungen, Voriconazol, Sertaconazol, IB-367, FK-463, LY-303366, Sch-56592, Sitafloraxacino, polienos DB-289, tales como Anfotericina, Nistatina, Primaricina; azoles, tales como Fluconazol, Itraconazol y Ketoconazol; alilaminas, tales como Naftifina y Terbinafina; y antimetabolitos tal como Flucitosina. Otros agentes antifúngicos incluyen sin limitación, aquéllos dados a conocer en Fostel *et al.*, Drug Discovery Today 5:25-32 (2000), que se incorpora al presente documento como referencia. Fostel *et al.* dan a conocer compuestos antifúngicos que incluyen Corinecandina, Mer-WF3010, Fusacardinas, Artriquitina/LL 15G256□, Sordarinas, Cispentacina, Azoxibacilina, Aureobasidina y Khafrefungina.

La daptomicina u otro antibiótico lipopeptídico; incluyendo lipopéptidos relacionados con daptomicina, pueden administrarse según este método hasta que se erradique o reduzca la infección bacteriana. En una realización, la daptomicina u otro lipopéptido se administra durante un periodo de tiempo de desde 3 días hasta 6 meses. En una realización preferida, la daptomicina u otro lipopéptido se administra durante de 7 a 56 días. En una realización más preferida, la daptomicina u otro lipopéptido se administra durante de 7 a 28 días. En una realización incluso más preferida, la daptomicina u otro lipopéptido se administra durante de 7 a 14 días. La daptomicina u otro lipopéptido puede administrarse durante un periodo de tiempo más largo o más corto si así se desea.

Con el fin de que esta invención pueda entenderse de una manera más completa, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solamente con fines de ilustración y de todas formas no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

#### EJEMPLO 1

Se lleva a cabo un cultivo de fermentación de *S. roseosporus* NRRL cepa 15998 en una fermentación con alimentación de ácido decanoico controlada a niveles que optimizan la producción del antibiótico mientras que minimizan la producción de contaminantes. Se mide la alimentación de ácido decanoico residual mediante cromatografía de gases y el nivel residual objetivo es de 10 ppm de ácido decanoico desde que empieza la inducción (aproximadamente en la hora 30) hasta la recogida. La centrifugación del cultivo y el análisis posterior del caldo clarificado se usan para medir la producción de daptomicina mediante HPLC. El título de la recogida está normalmente entre 2,1 y 2,6 gramos por litro de caldo de fermentación.

La fermentación se recoge o bien mediante microfiltración usando un Pall-Sep o bien mediante centrifugación a escala comercial completa y filtro de profundidad. El caldo clarificado se aplica a una resina de intercambio aniónico, Mitsubishi FP-DA 13, se lava con NaCl 30 mM a pH 6,5 y se eluye con NaCl 300 mM a pH 6,0-6,5. Alternativamente, se lava la columna FP-DA 13 con NaCl 60 mM a pH 6,5 y se eluye con NaCl 500 mM a pH 6,0-6,5. Se aplica el eluato a una resina de HIC, HP-20ss, se lava con acetonitrilo al 30% y se eluye con acetonitrilo al 35% a pH 4,0-5,0. Alternativamente, se lava la resina HIC con alcohol isopropílico al 45% y se eluye con alcohol isopropílico al 55-60%. Se aplica el eluato a la resina FP-DA 13 y se lava y eluye tal como anteriormente. La etapa de intercambio aniónico final reduce el disolvente en un tercio o más. La diafiltración por ósmosis inversa y la concentración a pH 1,5-2,5 se lleva a cabo usando un filtro de 0,2 µm y se congela la preparación de daptomicina. Se lleva a cabo una diafiltración por ósmosis inversa final con agua para inyección (API) para lavar la daptomicina y ajustar su concentración antes del llenado estéril. Después se liofilizan los viales o cantidades en masa de daptomicina.

#### EJEMPLO 2

Se produjo daptomicina en un cultivo de fermentación de *S. roseosporus* y se purificó la daptomicina parcialmente purificada (9,9 kg) mediante microfiltración de 5500 litros de caldo de fermentación mediante el método descrito en la patente estadounidense 4.885.243. La daptomicina parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante el método descrito en la patente estadounidense n.º 4.874.843, y dio como resultado una preparación de daptomicina en masa con una pureza del 91%. La preparación de daptomicina contenía catorce impurezas mediante análisis de HPLC (véase el ejemplo 10). Se aplicó la preparación de daptomicina a una resina de intercambio aniónico Poros P150 (PE Biosystems) en tampón Tris pH 7,0 que contiene urea 6 M y permitió que se uniera a la resina. Se lavó la resina con tres volúmenes de columna de tampón antes de la iniciación de un gradiente de NaCl en el mismo tampón. Alternativamente, los contaminantes pueden retirarse eficazmente de la columna con un nivel de sal fijado de NaCl 30 mM. La elución de la daptomicina purificada a partir de la

resina se produjo aproximadamente a NaCl 300 mM durante un gradiente de NaCl de 0 a 1000 mM. La daptomicina eluida de la columna tenía una pureza superior al 99% según se midió mediante el "primer" método de HPLC. La daptomicina purificada sólo contenía un contaminante de daptomicina detectable. La anhidro-daptomicina y el isómero  $\beta$  eran imperceptibles (menos del 0,01% de contaminación). El nivel del contaminante no identificado fue superior al 0,1% e inferior al 0,5%.

### EJEMPLO 3

Se preparó una preparación de daptomicina en masa con una pureza del 91% tal como se describió en el ejemplo 2. Se aplicó el producto a una resina de intercambio aniónico Poros D50 (PE Biosystems) en un tampón acetato pH 7,0 que contenía urea 6 M. Se lavó y eluyó la resina Poros D50 de la misma manera que la descrita en el ejemplo 2. La daptomicina eluida de la columna tenía una pureza del 96,92% según se midió mediante el "segundo" método de HPLC. El producto de esta invención sólo contenía dos de las catorce impurezas iniciales (menos del 0,5% de contaminación). No pudo detectarse anhidro-daptomicina en la preparación de daptomicina purificada (menos del 0,01% de contaminación y con la cuantificación precisa en menos del 0,05%).

### EJEMPLO 4

Se produjo un caldo de fermentación que contenía daptomicina tal como se describió en el ejemplo 2. Se clarificó el caldo de fermentación mediante microfiltración. Se extrajo el producto clarificado con n-butanol o isobutanol al 20% a pH 4,5 (una parte de butanol por cuatro partes de disolución clarificada). Se llevó a cabo una nueva extracción de la disolución clarificada para lograr un rendimiento de daptomicina parcialmente purificada superior al 90% de la daptomicina total en la disolución clarificada. La daptomicina se recuperó de la fase de butanol mediante la adición de un tampón acuoso a pH 6,5 en un volumen que es la mitad o más del volumen de butanol para extraer la daptomicina de la fase de butanol a la fase acuosa. La etapa de extracción de butanol dio como resultado una preparación de daptomicina parcialmente purificada que se purificó 5 veces y se concentró 10 veces en relación a la disolución clarificada.

Entonces se purificó la preparación de daptomicina acuosa mediante el método dado a conocer en la patente estadounidense n.º 4.874.843, dando como resultado una daptomicina que tenía una pureza del 91%. La daptomicina contenía catorce impurezas. Se aplicó el producto a una resina Poros D50 en un tampón Tris a pH 7,0 que contenía urea 6 M. Se lavó la resina con tres volúmenes de lecho de tampón Tris a pH 7,0 que contenía urea 6 M antes de la iniciación de un gradiente de NaCl de desde 0 hasta 1000 mM en el mismo tampón. Se produjo la elución de la daptomicina purificada a partir de la resina aproximadamente a NaCl 300 mM. La daptomicina tenía una pureza del 98% según se midió mediante el "segundo" método de HPLC.

### EJEMPLO 5

Se fermenta la daptomicina tal como se describió en el ejemplo 2. Los 5500 litros de caldo de fermentación contienen 13 kg de daptomicina. El caldo de fermentación se extrae directamente con n-butanol al 20% a pH 4,5, lo que reparte la daptomicina en el butanol. Se realizan nuevas extracciones del caldo de fermentación con butanol para lograr un rendimiento superior al 90% de la daptomicina total en el caldo de fermentación. Se extrae la fase de butanol con un tampón acetato acuoso a pH 6,5, dando como resultado daptomicina que se purifica 5 veces (35%) y se concentra 10 veces en relación con el caldo de fermentación. La daptomicina acuosa se microfiltra mediante el método descrito en la patente estadounidense 4.885.243, después se purifica mediante el método de la patente estadounidense n.º 4.874.843. Este método da como resultado daptomicina con una pureza de aproximadamente el 91%. La daptomicina contiene 14 impurezas mediante el método de HPLC usado en el momento de la técnica anterior. Se aplica el producto a una columna de resina Poros D50 en un tampón acetato a pH 7,0 que contiene urea 6 M. El lavado y la elución de la resina se llevan a cabo tal como se indicó en el ejemplo 2. El producto de la etapa cromatográfica tiene una pureza de aproximadamente del 98% al 99% según se midió mediante el segundo método de HPLC.

### EJEMPLO 6

Se produjo daptomicina en un cultivo de fermentación de *S. roseosporus* excepto que se usó una alimentación de ácido decanoico residual con el fin de mejorar la calidad de la fermentación hasta una pureza de aproximadamente el 10% cuando se clarifica mediante microfiltración o centrifugación. Se monitorizó y ajustó periódicamente el nivel de ácido decanoico para mantener los niveles de ácido decanoico residual a menos de 50 ppm y preferiblemente entre 1 a 10 ppm durante la fermentación. El caldo de fermentación se microfiltró mediante el método descrito en la patente estadounidense 4.885.243 para producir 12,1 kg de daptomicina parcialmente purificada a partir de 5500 litros de caldo de fermentación. El caldo de fermentación clarificado se unió al intercambiador aniónico, FP-DA 13

(Mitsubishi) en tampón acetato a pH neutro, se lavó en tampón acetato que contenía NaCl 30 mM, y posteriormente se eluyó con un tampón acetato a NaCl 300 mM. Esta etapa de intercambio aniónico produjo daptomicina con una pureza superior al 70%. Esta daptomicina parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante el método de la patente estadounidense 4.874.843 con la modificación de que se usó la resina HP-20ss. Específicamente, se cargó la daptomicina parcialmente purificada sobre HP-20ss en tampón acetato que contenía acetónitrilo al 10%, se lavó con tampón acetato que contenía acetónitrilo al 30% y se eluyó con acetónitrilo al 40% en tampón acetato, dando como resultado daptomicina con una pureza de aproximadamente del 94 al 96% según se midió mediante el "segundo" método de HPLC. Se somete el producto a cromatografía de intercambio aniónico potenciada con tampón modificado usando la resina Poros D50 tal como se describió en el ejemplo 5. La daptomicina tiene una pureza superior al 99% y contiene sólo dos de las catorce impurezas producidas mediante los métodos descritos en la técnica anterior.

#### EJEMPLO 7

Se preparó una preparación de daptomicina con una pureza del 93% tal como se describió en el ejemplo 2. Se aplicó el producto a una resina Poros P150 (PE Biosystems) en un tampón acetato pH 6,0 que contenía urea 2 M. Se lavó la resina Poros P150 con tres volúmenes de columna del tampón. Se eluyó la daptomicina de la resina usando un gradiente de NaCl de 0 a 400 mM en el tampón acetato pH 6,0 que contenía urea 2 M. Se eluyó la daptomicina en NaCl entre 150 y 300 mM. La daptomicina eluida de la columna tenía una pureza del 99,0 al 99,5% según se midió mediante el "primer" método de HPLC. La daptomicina contenía cantidades traza de cuatro impurezas que eran menos del 1% del total de daptomicina. No pudo detectarse la anhidro-daptomicina en la preparación de daptomicina purificada (menos del 0,02% de contaminación).

#### EJEMPLO 8

Se preparó una preparación de daptomicina con una pureza del 93% tal como se describió en el ejemplo 2. Se aplicó el producto a una resina Poros P150 (PE Biosystems) en un tampón acetato pH 6,0 que contenía urea 2 M. Se lavó la columna con seis volúmenes de columna de NaCl 60 mM en tampón acetato pH 6,0 que contenía urea 2 M (el "tampón de lavado"). El tampón de lavado puede variar entre NaCl 50-75 mM. El lavado elimina prácticamente toda la anhidro-daptomicina. Se eluye la daptomicina con dieciséis volúmenes de columna de NaCl 250 mM en tampón acetato pH 6,0 que contenía urea 2 M. La daptomicina tiene una pureza del 98,5 al 99,5% según se midió mediante el "primer" método de HPLC.

#### EJEMPLO 9

Se preparó una preparación de daptomicina tal como se describió en el ejemplo 2 usando un método que reducía significativamente la concentración del disolvente requerido para realizar la cromatografía con HP-20ss. Inesperadamente, el disolvente para la elución de daptomicina, acetónitrilo al 40% o alcohol isopropílico al 55-60%, se redujo hasta el 12% y el 25%, respectivamente, cuando la cromatografía con HP-20ss se llevó a cabo a pH neutro en lugar de pH ácido tal como se describió en la patente estadounidense 4.874.843. En una realización preferida, el cambio de pH puede usarse para reciclar la resina HP-20ss sin la eliminación del disolvente.

Tras la elución de una columna FP-DA13 a pH 6,5-7,0, se carga la daptomicina en una columna HP-20ss equilibrada, así como una que se ha equilibrado en acetato 60 mM, pH 6,6. Se lava la columna con de cinco a ocho volúmenes de lecho de columna (VLC) de tampón de lavado. Un tampón de lavado a modo de ejemplo es alcohol isopropílico al 5%/acetato 60 mM, pH 6,6. Se eluye la daptomicina a partir de la columna con tampón de elución. Un tampón de elución a modo de ejemplo es de dos a tres VLC de alcohol isopropílico al 25%/acetato 60 mM pH 6,6. Se somete a separación la columna con un tampón de separación. En una realización, la columna se somete a separación con un VLC de alcohol isopropílico al 40%/acetato 60 mM pH 6,6-7,0. Se ajusta la disolución de daptomicina a pH 3,5-4,0 y vuelve a cargarse en la columna HP-20ss con el fin de mejorar adicionalmente la pureza. En una realización, la daptomicina eluida a partir de la columna HP-20ss a pH 6,5 se ajusta a pH 3,5 usando ácido fosfórico 0,25 M. La disolución de daptomicina vuelve a cargarse en la columna HP-20ss sometida a separación anteriormente que se ha equilibrado en acetato 60 mM, pH 3,5. Se lava la columna con un tampón de ajuste de pH de tal manera que el pH es 6,5. Un tampón de ajuste de pH a modo de ejemplo es de cinco a seis VLC de alcohol isopropílico al 5%/acetato 60 mM, pH 6,6. Se eluye la daptomicina con un tampón de elución y si se desea, puede purificarse adicionalmente mediante intercambio aniónico u otros métodos de purificación. La columna HP-20ss se somete a separación con un tampón de separación y se limpia antes de que vuelva a usarse. Un procedimiento de limpieza a modo de ejemplo incluye lavar con tres VLC de NaOH 0,5 M, lavar con un VLC de agua y lavar después con ácido fosfórico 0,25 M antes del equilibrado. La columna puede almacenarse en NaOH 0,5 M.

## EJEMPLO 10

Se caracterizó la daptomicina en masa preparada tal como se describió en el ejemplo 2 por medio de HPLC semipreparativa y se caracterizó mediante cromatografía de líquidos/espectroscopía de masas (CL/EM) usando modos de iones tanto positivos como negativos. En la tabla 3 se muestra un perfil de impurezas de la daptomicina en masa antes de la cromatografía en la resina de intercambio aniónico Poros P150 y en la figura 12 se muestra un cromatograma de la preparación de daptomicina en masa.

Tabla 3

ID Impureza	Tiempo de retención	PM observado	ID Lilly	ID Cubist	% del área total mediante HPLC
1	7,96	1638	LY212218	CB-131012	>0,5%,<1,0%
2	9,11	1638		CB-131011	<0,5%,>0,1%
3	11,54	745	LY213928	CB-131008	>0,5%,<1,0%
4	12,28	1624		CB-131006	<0,5%,>0,1%
5	13,10	1618		Desconocido-1	<0,5%,>0,1%
6	14,43	587	LY213827	CB-130989	>0,5%,<1,0%
7	14,43	1606		CB-131005	>0,5%,<1,0%
8	15,10	1620	LY213846	CB-131010	>1,0%,<4,0%
Dapto- micina	16,68	1620	LY146032	CB-109187	>90%
9	17,92	874		Desconocido-2	<0,5%,>0,1%
10	19,57	1810		Desconocido-3	<0,5%,>0,1%
11	19,57	1635		Desconocido-4	<0,5%,>0,1%
12	20,93	859		CB-131009	<0,5%,>0,1%
13	23,11	1602	LY178480	CB-130952	>1,0%,<4,0%
14	24,53	1634	LY109208	CB-131078	<0,1

*Impureza 1* (CB-131012), que eluye aproximadamente a los 7,96 minutos, (PM: 1638) se propone que es un producto de hidrólisis de lactona de la daptomicina (figura 4). Los resultados parecen coincidir con LY212218 tal como se identificó anteriormente por Lilly como derivado de apertura de anillo de decilo de la daptomicina.

*Impureza 2* (CB-131011), que eluye aproximadamente a los 9,11 minutos, (PM: 1638) también se propone que es un producto de hidrólisis de lactona del isómero  $\beta$  (figura 5).

*Impureza 3* (CB-131008), que eluye aproximadamente a los 11,54 minutos, (PM: 745) se propone que es un lipopéptido lineal que consiste en una cadena de cinco aminoácidos que contiene triptófano, asparagina, aspartato, treonina y glicina con una cadena de ácido decanoico (figura 6). Este resultado parece coincidir con LY213928 tal como se identificó anteriormente por Lilly.

*Impureza 4* (CB-131006), que eluye aproximadamente a los 12,28 minutos (PM: 1624) se propone que es un análogo oxidativo de la daptomicina en el que el aminoácido triptófano se ha oxidado a ácido quinurénico (figura 7).

*Impureza 5*, que eluye aproximadamente a los 13,10 minutos, (PM: 1618) todavía no se le ha asignado una estructura.

*Impureza 6* (CB-130989) e *Impureza 7* (CB-131005) coeluyen aproximadamente a los 14,43 minutos. CB-130989 (PM: 587) parece coincidir con LY213827 un lipopéptido lineal que consiste en una cadena de tres aminoácidos de triptófano, asparagina y aspartato con una cadena de ácido decanoico (figura 8), tal como se identificó anteriormente por Lilly. CB-131005 (PM: 1606) corresponde a un análogo de daptomicina en el que el ácido decanoico carece de un grupo metilo (figura 9).

*Impureza 8* (CB-131010), eluye aproximadamente a los 15,10 minutos, (PM: 1620) coincide con LY213846 (isómero  $\beta$ ) tal como se identificó anteriormente por Lilly (figura 2). Los niveles de isómero  $\beta$  son superiores al 1%.

*Impureza 9*, que eluye aproximadamente a los 17,92 minutos (PM: 874), todavía no se le ha asignado una estructura.

*Impureza 10 y 11*, que coeluyen aproximadamente a los 19,57 minutos, todavía no se les ha asignado una estructura.

*Impureza 12* (CB-131009), que eluye a los 20,93 minutos (PM: 859), se propone que es un lipopéptido lineal que consiste en una cadena de seis aminoácidos de triptófano, asparagina, aspartato, treonina, glicina y ornitina con una cadena de ácido decanoico (figura 10).

5 *Impureza 13* (CB-130952), que eluye aproximadamente a los 23,11 minutos (PM: 1602), se propone que es anhidro-daptomicina (figura 3), y parece ser la misma que LY178480. Los niveles de anhidro-daptomicina son superiores al 1%.

10 *Impureza 14* (CB-131078), que eluye aproximadamente a los 24,53 minutos (PM: 1634), parece ser la misma que LY109208, identificada anteriormente por Lilly como un análogo de daptomicina que contiene un grupo metilo adicional en la cadena de ácido decanoico (figura 11).

15 La daptomicina en masa puede purificarse en Poros P150 tal como se describió anteriormente en los ejemplos 2 ó 7-8 o puede purificarse en Poros D50 tal como se describió anteriormente en los ejemplos 3-5. Tras la purificación en Poros P150 tal como se describió en el ejemplo 2, un cromatograma (figura 13) muestra que la pureza de daptomicina es superior al 99,0%, con isómero  $\beta$  y anhidro-daptomicina por debajo del nivel de detección (menos del 0,05% del total). Hay una impureza no identificada que está presente en una cantidad superior al 0,1% pero inferior al 0,5%.

## 20 EJEMPLO 11

25 Se lleva a cabo un cultivo de fermentación de *S. roseosporus* NRRL cepa 15998 en una fermentación con alimentación de ácido decanoico controlada a niveles que optimizan la producción del antibiótico mientras que minimizan la producción de contaminantes. Se mide la alimentación de ácido decanoico residual mediante cromatografía de gases y el nivel residual objetivo es de 10 ppm de ácido decanoico desde que empieza la inducción (aproximadamente en la hora 30) hasta la recogida. La centrifugación del cultivo y el análisis posterior del caldo clarificado se usan para medir la producción de daptomicina mediante HPLC. El título de la recogida está normalmente entre 1,0 y 3,0 gramos por litro de caldo de fermentación.

30 La fermentación se recoge o bien mediante microfiltración usando un Pall-Sep o bien mediante centrifugación a escala comercial completa y filtro de profundidad. Se aplica el caldo clarificado a una resina de intercambio aniónico, Mitsubishi FP-DA 13, se lava con NaCl 30 mM a pH 6,5 y se eluye con NaCl 300 mM a pH 6,0-6,5. Alternativamente, se lava la columna FP-DA 13 con NaCl 60 mM a pH 6,5 y se eluye con NaCl 500 mM a pH 6,0-6,5. Se ajusta el pH a de 3,0 a 4,8 y se ajusta la temperatura a 2-15°C. En estas condiciones, la daptomicina forma una micela. La disolución de daptomicina micelar se purifica lavando la preparación micelar mientras que se retiene en un ultrafiltro usando un filtro de PMN de 10.000 (AG Technology Corp. UF de fibra hueca o equivalente) en cualquier configuración. Las micelas de daptomicina se retienen por el filtro, pero se elimina una gran cantidad de impurezas porque éstas pasan a través del filtro de PMN de 10.000. La ultrafiltración de las micelas de daptomicina aumenta la pureza de la daptomicina desde aproximadamente el 40% hasta el 80% o más.

45 Se aplica el eluato a la resina de HIC, HP-20ss, se lavó con acetonitrilo al 30% y se eluyó con acetonitrilo al 35% a pH 4,0-5,0. Alternativamente, se lavó la resina de HIC con alcohol isopropílico al 20-30% y se eluyó con alcohol isopropílico al 30-40% a pH 3,5-6,5. En estas condiciones de aumento del disolvente y un mayor pH de 6,0-7,5, la daptomicina vuelve a un estado no de micela, simple. Se aplica el eluato a la columna de resina FP-DA 13 y se lava y eluye tal como anteriormente. La etapa de intercambio aniónico final reduce el disolvente en un tercio o más. La diafiltración por ósmosis inversa y la concentración a pH 1,5-2,5 se realizan usando un filtro de 0,2  $\mu$ m y se congela la preparación de daptomicina. Se lleva a cabo una diafiltración por ósmosis inversa final con agua para inyección (API) para lavar la daptomicina y ajustar su concentración antes del llenado estéril. Después se liofilizan viales o cantidades en masa de daptomicina.

## 55 EJEMPLO 12

60 La daptomicina purificada liofilizada tal como se describió en alguno de los ejemplos descritos anteriormente, tal como el descrito en el ejemplo 11, se reconstituye en solución salina fisiológica (NaCl aproximadamente 140 mM) a un pH de 4,0-5,0. En estas condiciones, la daptomicina está presente como una micela, y puede usarse para inyección o administración intravenosa, parenteral, oral o tópica.

## 60 EJEMPLO 13

65 Se produce daptomicina mediante fermentación y se clarifica a partir del caldo mediante microfiltración tal como se describió en el ejemplo 11. Se aplica el caldo clarificado a una resina de intercambio aniónico, Mitsubishi FP-DA 13, se lava con NaCl 30 mM a pH 6,5 y se eluye con NaCl 300 mM a pH 6,0-6,5 para dar una preparación de daptomicina que tiene una pureza de aproximadamente el

40%. Se ajusta el eluato a pH 3,5 con ácido fosfórico diluido de tal manera que prácticamente toda la daptomicina forma micelas. Se carga la preparación de micelas en una membrana de ultrafiltración de PMN de 10.000. Se lava la preparación de daptomicina con acetato de sodio 30 mM pH 3,5 y a temperaturas de hasta 15°C. La reducción en el volumen y el lavado reducen el nivel de contaminación, lo que da como resultado una preparación de daptomicina con una pureza del 85%. La preparación de daptomicina puede purificarse adicionalmente usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

#### EJEMPLO 14

Se produce daptomicina mediante fermentación, se clarifica a partir del caldo mediante microfiltración y se fracciona en la resina FP-DA 13 tal como se describió en el ejemplo 11. Se ajusta el eluato a pH 3,5 con ácido fosfórico diluido de tal manera que prácticamente toda la daptomicina forma micelas. Se carga la preparación de micelas en una membrana de ultrafiltración de PMN de 10.000. Se lava la preparación de daptomicina con acetato de sodio 30 mM pH 3,5 y a temperaturas de hasta 15°C. La reducción en el volumen y el lavado reducen el nivel de contaminación, lo que da como resultado una preparación de daptomicina con una pureza del 80-90%. La preparación de daptomicina puede purificarse adicionalmente usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

#### EJEMPLO 15

Se produce daptomicina mediante fermentación y se clarifica a partir del caldo usando microfiltración tal como se describió en el ejemplo 11. Se purifica la preparación usando cromatografía de interacción hidrófoba, tal como se describe en la patente estadounidense 4.874.843. En este método, se usa la cromatografía en columna repetida en resina HP-20 y HP-20ss. La pureza de la daptomicina es del 93% con impurezas visibles en cromatogramas de HPLC y pirógeno medible. Se diluyó el producto en agua y se ajustó su pH a pH 6,5 con NaOH o equivalente. Se filtra la preparación de daptomicina a través de una membrana de ultrafiltración de PMN de 10.000. En estas condiciones, la daptomicina es monomérica y pasa a través de la membrana de ultrafiltración. El producto resultante sigue teniendo una pureza del 93%, pero varias impurezas que habían estado presentes al 0,1-0,2% se eliminan mediante la membrana de ultrafiltración. Además, se reduce el contenido en pirógenos hasta niveles indetectables.

#### EJEMPLO 16

Se preparó una preparación de daptomicina con una pureza de aproximadamente el 93% tal como se describió en el ejemplo 15. Se transforma la preparación de daptomicina a un estado micelar reduciendo el pH hasta 4,7 con HCl o equivalente y enfriando la preparación de daptomicina hasta 2-5°C. Se concentra el producto desde 400 litros hasta tres litros y hasta una concentración final de aproximadamente 100 mg/ml mediante filtración en una membrana de ultrafiltración de PMN de 10.000. En estas condiciones, la membrana retiene la daptomicina. Esto da como resultado un gran aumento de la concentración de daptomicina. La pureza es aproximadamente del 93%.

#### EJEMPLO 17

Se preparó una preparación de daptomicina tal como se describió en el ejemplo 16. Se llenan los viales con aproximadamente 250 mg de daptomicina y se liofilizan. Se reconstituye la daptomicina en 50 ml de solución salina 150 mM estéril a un pH de 4,0-5,0 para la administración a un paciente humano o animal. La dosis de daptomicina que se administra dependerá de la naturaleza de la infección, la edad y el peso del paciente, y la especie del animal. A un pH de 4,0-5,0 en solución salina 150 mM, la daptomicina estará presente en un estado micelar, que es soluble y adecuado para la inyección intravenosa, intramuscular o parenteral. La formulación minimizará cualquier irritación local debido a la naturaleza lipopeptídica de la daptomicina.

#### EJEMPLO 18

Se produjeron micelas de daptomicina usando daptomicina a una concentración de 1,0 mg/ml en agua a pH 4,0 a 25°C. Se midió el tamaño de una micela de daptomicina usando un Zetasizer™ (Malvern Instruments, modelo 3000 HS). La tasa de recuento era de 36,3, el tipo de célula era una célula capilar, el ángulo de detección (grados) era de 90° y la longitud de onda (nm) era de 633. Los resultados indicaron que el diámetro de la micela era de 54 Å, que es aproximadamente el doble del diámetro de una molécula de daptomicina monomérica simple. Véase la figura 18.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión. Será fácilmente aparente para los expertos en la técnica en vista de las enseñanzas de esta invención que se pueden hacer ciertos cambios y modificaciones a la misma sin salirse del ámbito de las reivindicaciones añadidas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para purificar daptomicina que comprende:

- 5 a) someter a la daptomicina a condiciones en las que la solución micelar de daptomicina se forma alterando el pH;
- b) separar las micelas de daptomicina en la solución micelar de daptomicina de los contaminantes de bajo peso molecular por una técnica de separación por tamaño;
- 10 c) someter a la daptomicina a condiciones en las que una solución monomérica de daptomicina se forma alterando el pH; y
- d) separar las moléculas de daptomicina monoméricas en la solución monomérica de daptomicina de las moléculas o agregados de alto peso molecular por una técnica de separación por tamaño

15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la técnica de separación por tamaño es ultrafiltración o cromatografía de exclusión por tamaño.

20

25

30

35

40

45

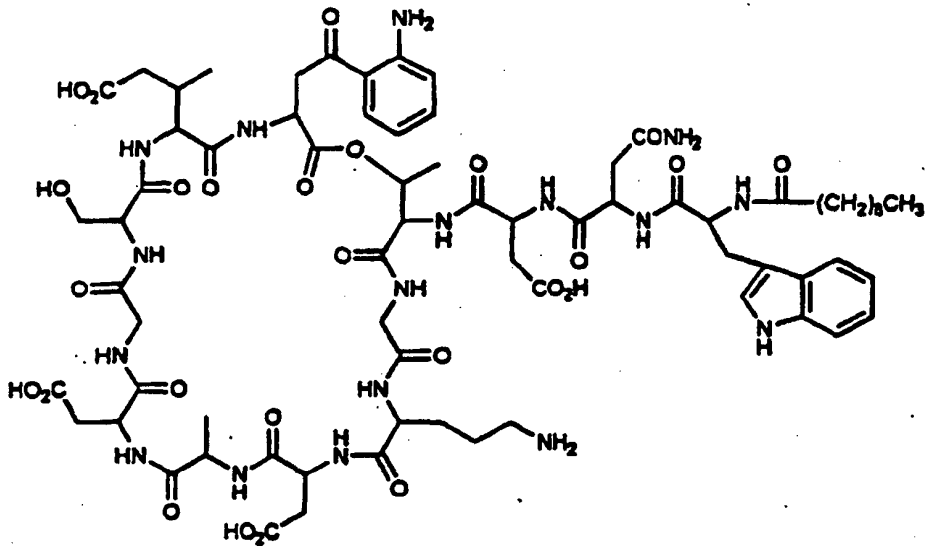
50

55

60

65

**Fig. 1**



**Fig. 2**

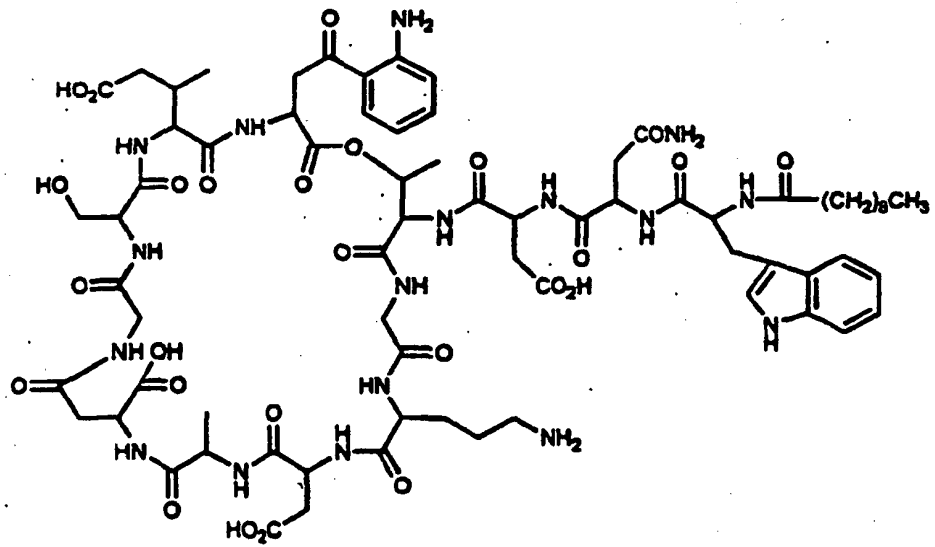




Fig. 3

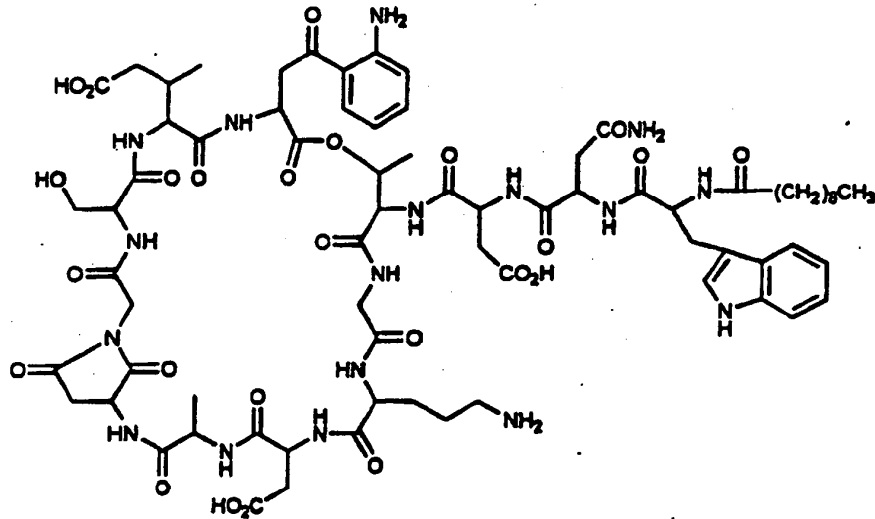
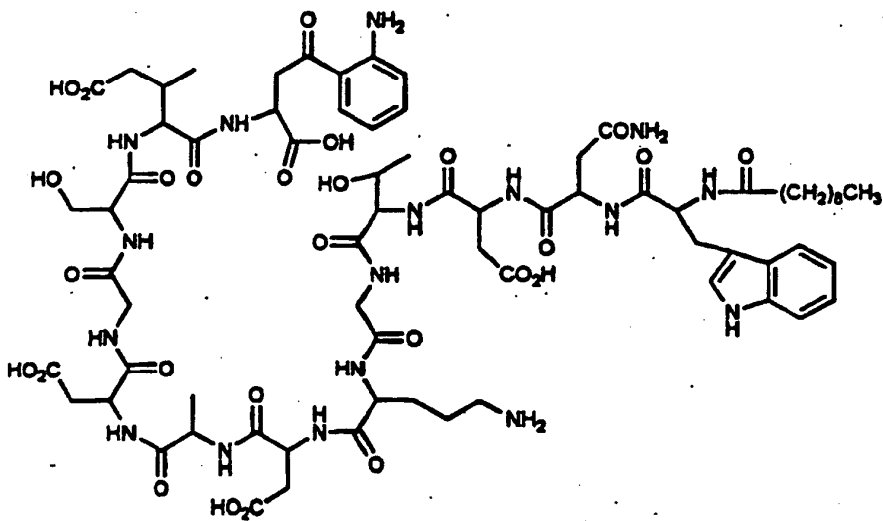


Fig. 4



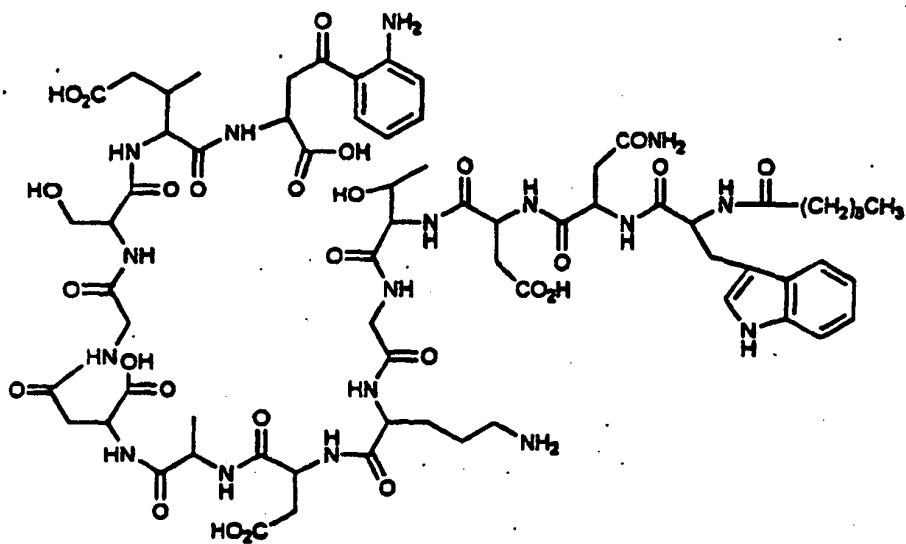
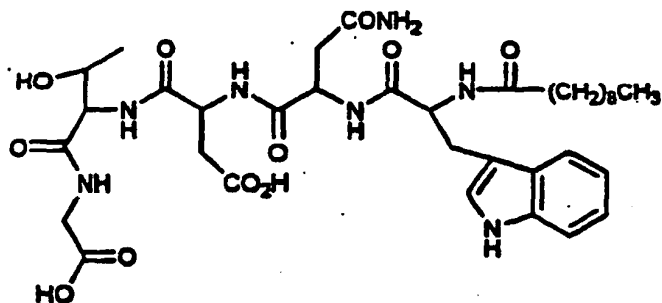
**Fig. 5****Fig. 6**

Fig. 7

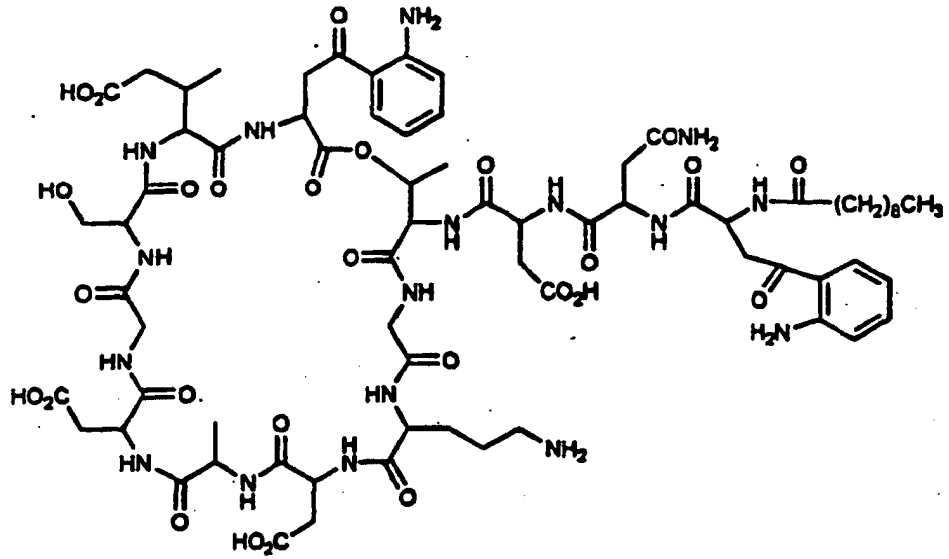
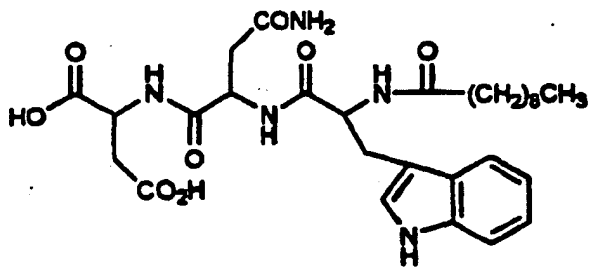
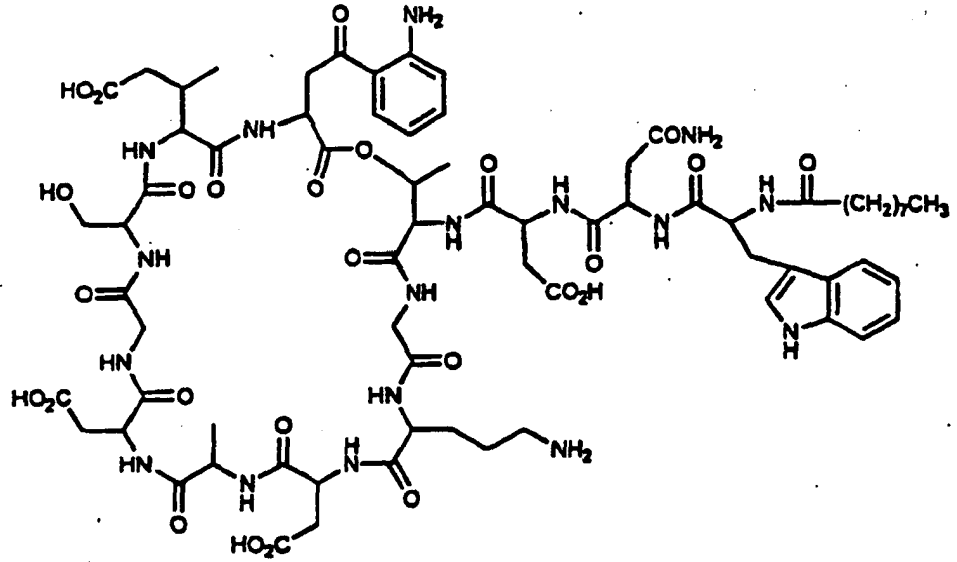


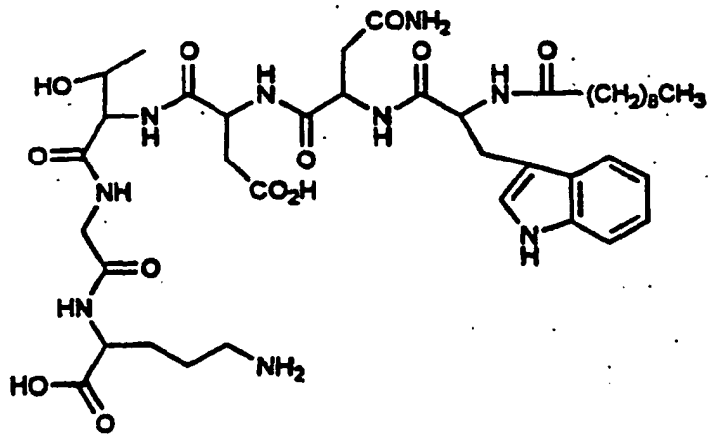
Fig. 8



**Fig. 9**



**Fig. 10**



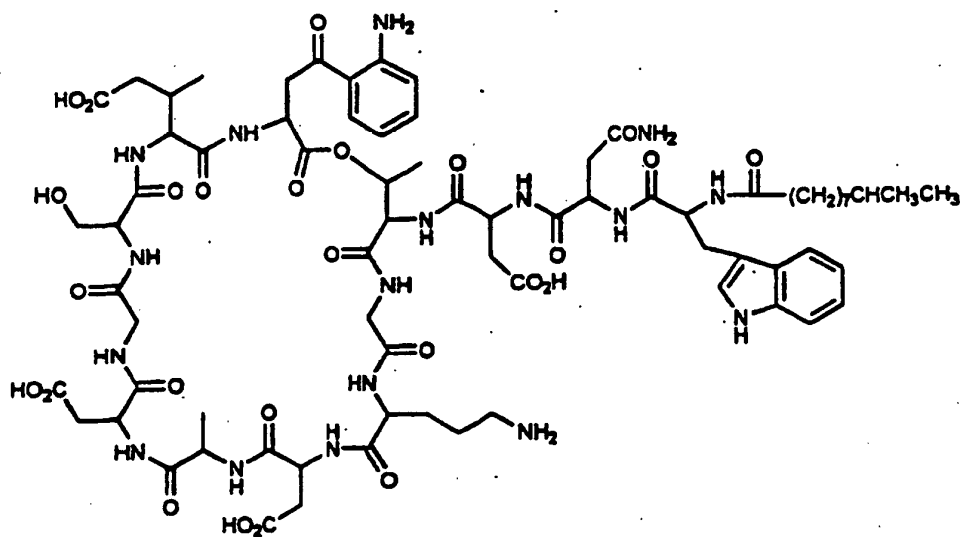
**Fig. 11**

Fig. 12

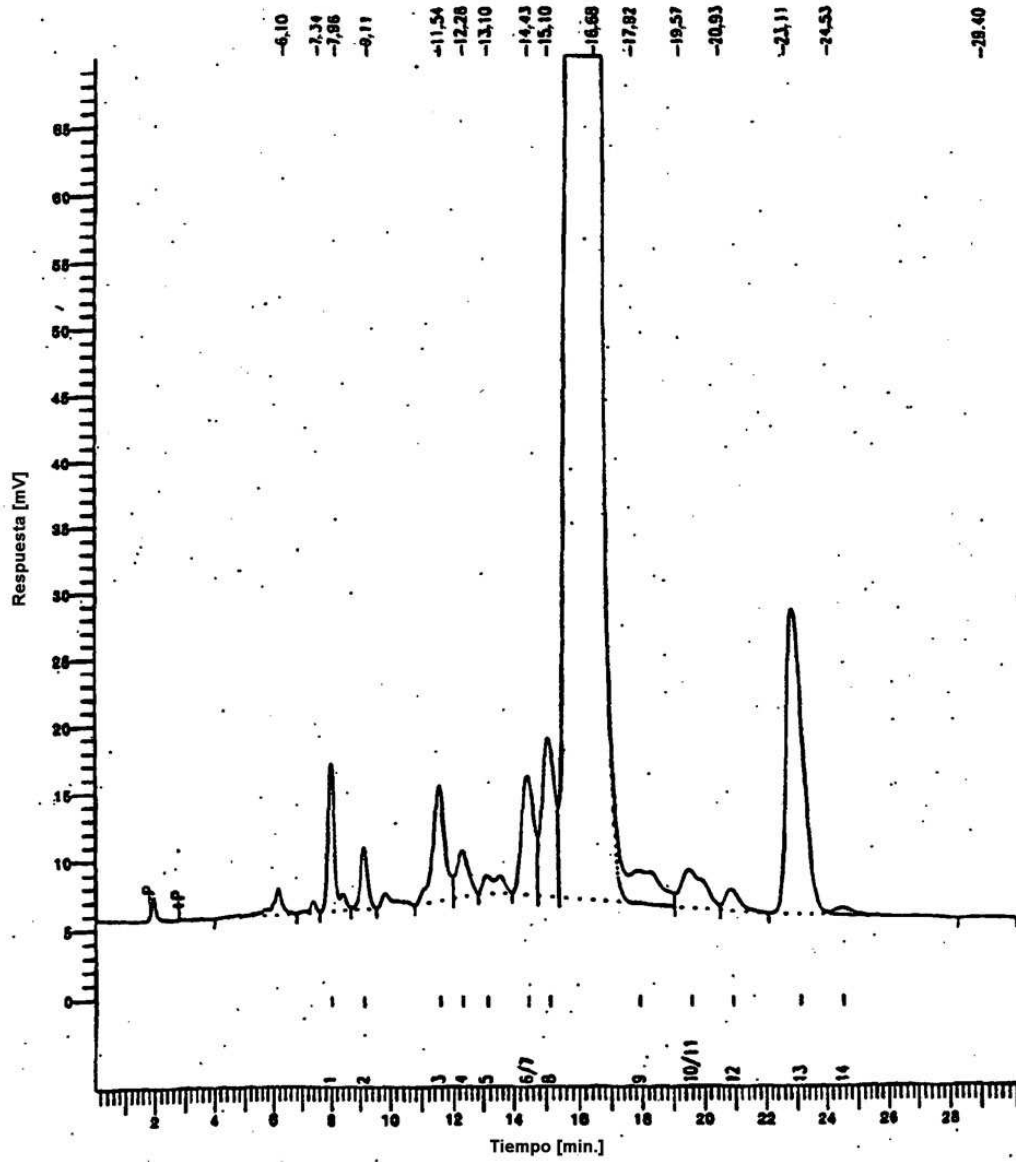
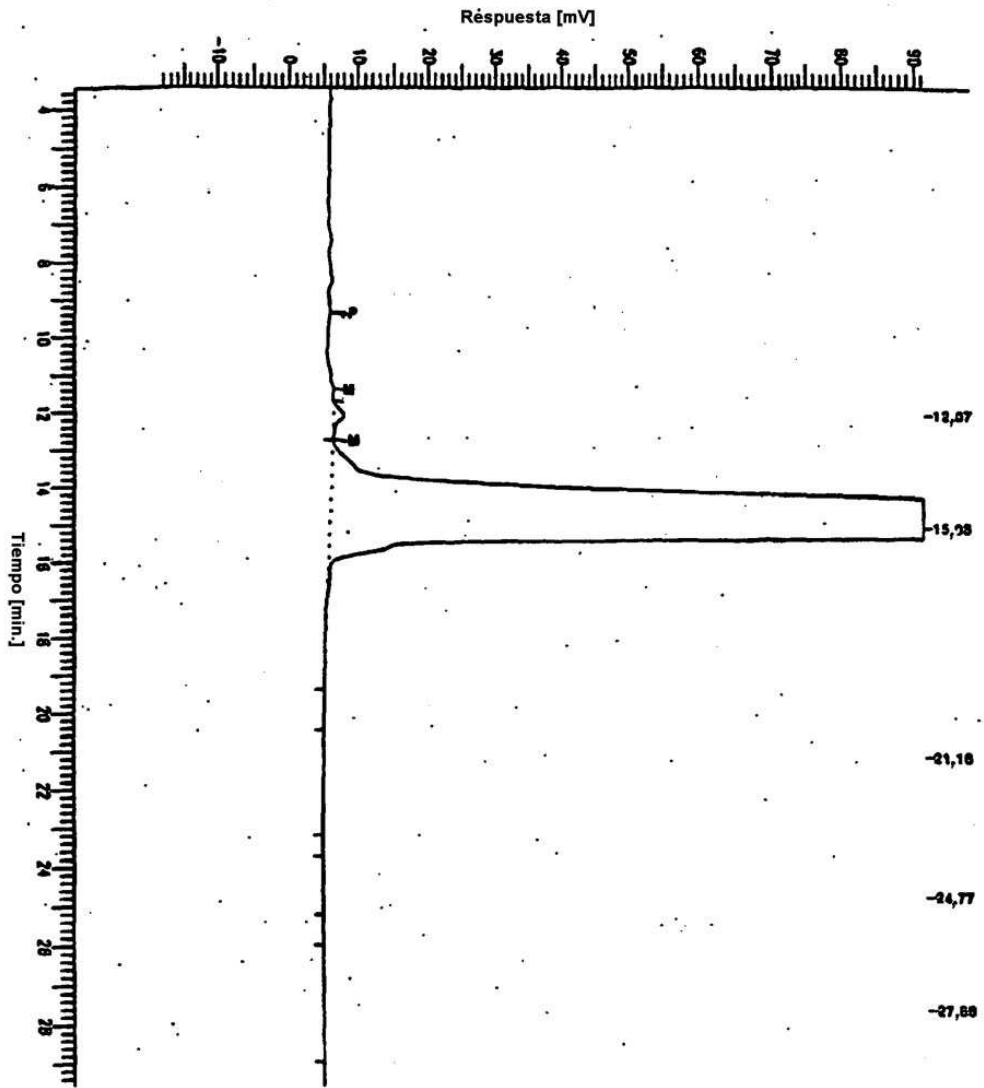


Fig. 13



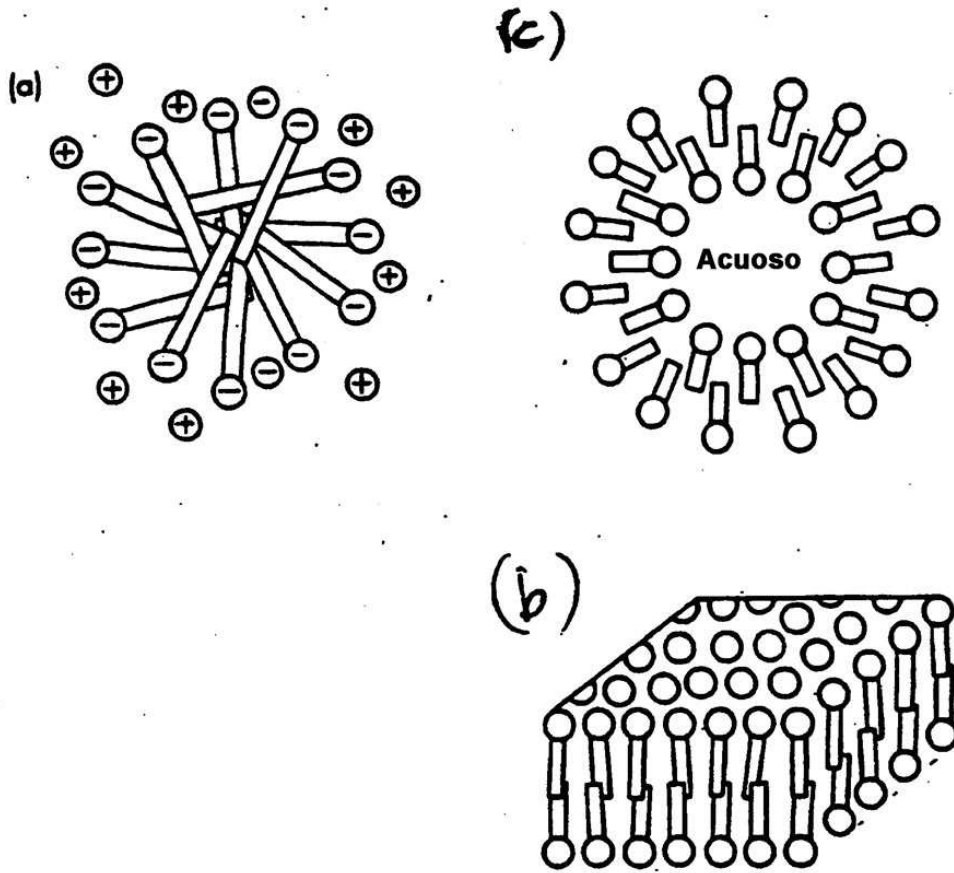


Fig. 14



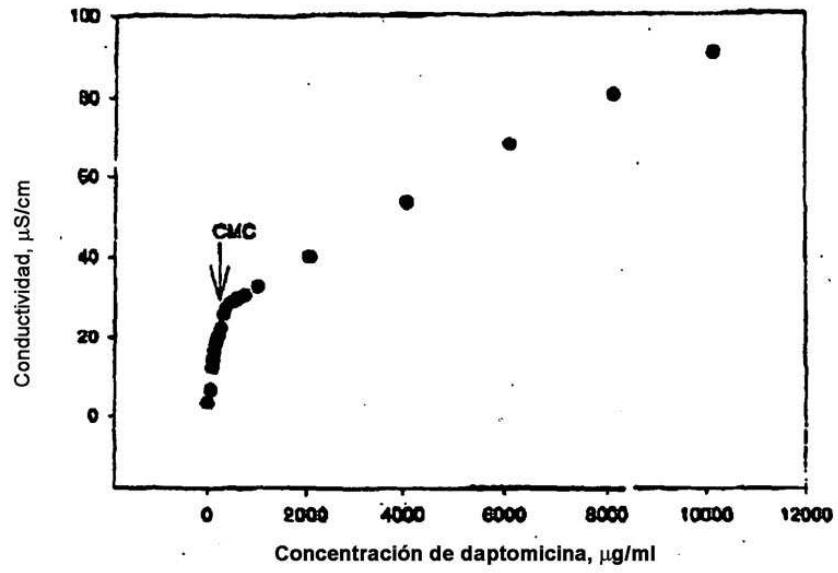
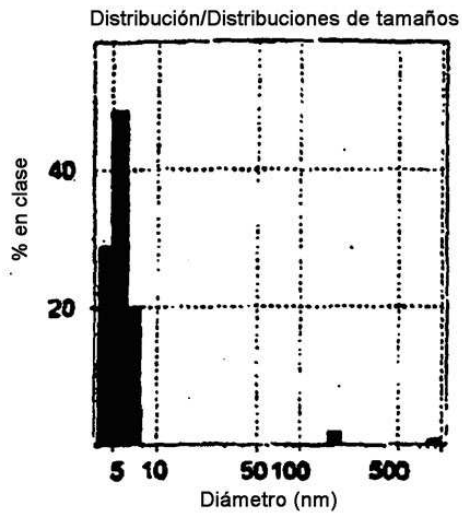


Fig. 15

Intensidad



Volumen

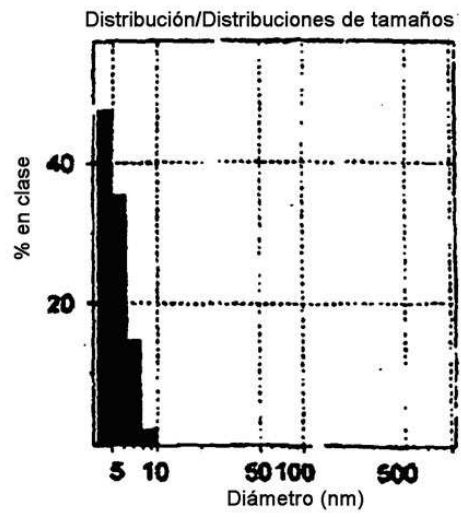


Fig. 16