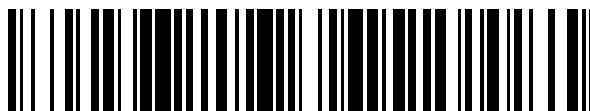


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 680**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2001 E 10181862 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2261237**

54 Título: **Daptomicina en forma cristalina y su preparación**

30 Prioridad:

18.12.2000 US 256268 P

09.03.2001 US 274741 P

13.12.2001 US 340525 P

13.12.2001 US 341315 P

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

28.11.2018

73 Titular/es:

CUBIST PHARMACEUTICALS LLC (100.0%)

Weystrasse 20

6000 Lucerne 6, CH

72 Inventor/es:

KEITH, DENNIS;

LAI, JAN-JI;

GOVARDHAN, CHANDRIKA y

KHALAF, NAZER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 691 680 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

Daptomicina en forma cristalina y su preparación

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a la presente invención se refiere a la daptomicina cristalina, un antibiótico lipopeptídico con una potente actividad bactericida contra las bacterias grampositivas, incluidas las cepas que son resistentes a los antibióticos convencionales. La presente invención también se refiere a procedimientos para preparar daptomicina cristalina y a métodos para purificar daptomicina. La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la forma purificada de la daptomicina.

Antecedentes de la invención

15 El rápido aumento del índice de infecciones Gram positivas, incluyendo aquellas causadas por bacterias resistentes a antibióticos, ha suscitado un nuevo interés en el desarrollo de novedosas clases de antibióticos. Una de estas clases son los antibióticos lipopéptidos, que incluyen daptomicina. La daptomicina tiene una potente actividad bactericida *in vitro* contra las bacterias Gram positivas clínicamente relevantes que causan enfermedades graves y potencialmente mortales. Estas bacterias incluyen, sin carácter limitativo, patógenos resistentes, como los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), *Staphylococcus aureus* susceptible a escala intermedia al glicopéptido (GISA), estafilococos coagulasa negativos (ECN), *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina (PRSP, por sus siglas en inglés), para los cuales hay alternativas terapéuticas muy escasas. Véase, por ejemplo, Tally et al., 1999, Exp. Opin. Invest. Drugs 8: 1223-1238. El efecto inhibitorio de la daptomicina es un efecto bactericida rápido *in vitro* y *in vivo* que depende de la concentración, y un efecto postantibiótico *in vivo* que depende de la concentración relativamente prolongado.

La daptomicina ha sido descrita por Blatz en *Biotechnology of Antibiotics*, 2nd Ed., ed. W.R. Strohl (New York Marcel Dekker, Inc.), 1997, páginas 415-435. La daptomicina, también conocida como LY 146032, es un antibiótico lipopéptido cíclico que puede ser obtenido a partir de la fermentación de *Streptomyces roseosporus*. La daptomicina es un miembro de los antibióticos de tipo factor A-21978 C₀ 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 altamente eficaz contra la mayoría de las bacterias Gram positivas; es altamente bactericida y de acción rápida; tiene una baja tasa de resistencia y es selectivo frente a los organismos resistentes a los antibióticos. El compuesto está siendo desarrollado actualmente en varias formulaciones para tratar infecciones graves causadas por bacterias, incluyendo, pero sin carácter limitativo, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y enterococos resistentes a la vancomicina (ERV).

Diversas patentes estadounidenses describen los antibióticos A-21978C₀ y los lipopéptidos relacionados con la daptomicina incluyendo la daptomicina (LY 146032). Estas patentes describen también los métodos de producción y aislamiento de los antibióticos A-21978C₀ y lipopéptidos relacionados con la daptomicina.

Las patentes estadounidenses RE32.333, RE32.455, 4.800.157, 4.874.843 y 4.885.243 describen métodos para sintetizar y aislar daptomicina a partir de cultivos de fermentación de *Streptomyces roseosporus*. Las patentes estadounidenses RE32.310, RE32.311, 4.537.717, 4.482.487 y 4.524.135 describen antibióticos A-21978C₀ y métodos de desacilación del antibiótico A-21978C₀ y reacilación de los núcleos de los péptidos y derivados antibióticos realizados mediante este proceso. La patente estadounidense 5.912.226 (en lo sucesivo patente '226) describe la identificación y el aislamiento de dos impurezas producidas durante la producción de daptomicina, anhidro-daptomicina y la forma de isómero β de daptomicina. Ninguna de estas patentes estadounidenses revela un método para precipitar o cristalizar un lipopéptido de tal forma que aumente la pureza del lipopéptido.

La patente estadounidense 4.439.425 (en lo sucesivo patente '425) revela un lipopéptido cristalino y un método para cristalizar el lipopéptido. El lipopéptido revelado en la patente '425 es estructuralmente diferente a la daptomicina y los lipopéptidos relacionados con la daptomicina. La patente estadounidense 5.336.756 (en lo sucesivo patente '756) también revela un lipopéptido cíclico cristalino compuesto por un hexapéptido. El lipopéptido cíclico cristalino revelado en la patente '756 es también estructuralmente diferente a la daptomicina y los lipopéptidos relacionados con la daptomicina. La patente '756 revela que el lipopéptido, un compuesto de tipo equinocandina, puede obtenerse al utilizar n-propanol acuoso como disolvente cristalizador. Véase, por ejemplo, cols. 1 y 2 de la patente '756. Ni la patente '425 ni la patente '756 revelan métodos de cristalización o precipitación de daptomicina o lipopéptidos relacionados con la daptomicina. Tampoco revelan métodos de cristalización o precipitación de lipopéptidos producidos por *Streptomyces*.

Jancarik + Kim, J. Appl. Cryst. (1991) 24: 409-411, describe un conjunto generalizado de condiciones de cristalización que puede ser utilizado para la cristalización de proteínas.

65 Sería beneficioso desarrollar un método de cristalización o precipitación de daptomicina y lipopéptidos relacionados con la daptomicina para lograr un método de purificación mejorada para estos lipopéptidos. Además, se utilizaría

una forma precipitada altamente purificada o cristalina de daptomicina u otro lipopéptido relacionado con la daptomicina al formular composiciones farmacéuticas para tratar infecciones bacterianas. Además, una forma precipitada altamente purificada o cristalina de daptomicina o lipopéptidos relacionados con la daptomicina resultaría útil en un método para fabricar un producto estéril, especialmente productos estériles en grandes cantidades. Por consiguiente, hay una necesidad de métodos para producir daptomicina precipitada o cristalina y lipopéptidos relacionados con la daptomicina y las formas precipitadas y cristalinas de los lipopéptidos así producidos. Sin embargo, no ha habido un método sólido y simple que haya sido efectivo cristalizando o precipitando daptomicina o lipopéptidos relacionados con la daptomicina y que se obtenga un lipopéptido que sea más puro tras la cristalización o precipitación que antes.

Sumario de la invención

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención aborda estos problemas proporcionando daptomicina cristalina y un método para producirla. En una realización, la invención proporciona un método para cristalizar daptomicina. En otra realización, el método proporciona daptomicina que es más pura después de la cristalización que antes de la cristalización.

La invención también proporciona un proceso robusto para producir y purificar daptomicina que comprende, entre otros, cristalizar daptomicina. Las etapas de cristalización del proceso se utilizan para purificar la daptomicina. En otra realización, el proceso se utiliza para la producción a gran escala y / o comercial de daptomicina.

La invención proporciona además formas cristalinas altamente purificadas de daptomicina. En una realización, las formas cristalinas de la daptomicina se pueden usar en composiciones farmacéuticas. También se describen métodos de uso las composiciones farmacéuticas.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la estructura de la daptomicina.

La Fig. 2 muestra una fotomicrografía de cristales en forma de erizo o partículas de daptomicina similares al cristal producidos por el método descrito en el Ejemplo 12.

La Fig. 3 muestra una fotomicrografía de cristales de daptomicina en forma de aguja.

La Fig. 4 muestra una fotomicrografía de cristales de daptomicina en forma de barra.

La Fig. 5 muestra fotomicrografías de muestras de daptomicina con un aumento de 100x. Se muestran fotomicrografías de daptomicina amorfa utilizando luz transmitida plana (A) y luz polarizada cruzada (B). Se muestran fotomicrografías de cristales de daptomicina utilizando luz transmitida plana (C y E) y luz polarizada cruzada (D y F). Los cristales de daptomicina fueron producidos mediante el protocolo descrito en el Ejemplo 7.

La Fig. 6 muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo para la daptomicina amorfa.

La Fig. 7 muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo para un cristal de daptomicina producido mediante el protocolo descrito en el Ejemplo 7.

La Fig. 8 muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo para una segunda muestra de cristal de daptomicina producido mediante el protocolo descrito en el Ejemplo 7.

La Fig. 9 muestra la birrefringencia de una partícula de daptomicina similar al cristal al exponerla a luz polarizada.

La partícula similar al cristal fue producida mediante el método descrito en el Ejemplo 12.

La Fig. 10 muestra un diagrama de un método a modo de ejemplo de cristalización.

La Fig. 11 muestra un diagrama de método de producción a modo de ejemplo que no utiliza cristalización o precipitación. El método de producción utiliza fermentación bacteriana para producir un cultivo de fermentación que contiene daptomicina, y después la purificación de daptomicina utilizando microfiltración, cromatografía de intercambio aniónico, ultrafiltración por exclusión de tamaño, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de intercambio aniónico para la eliminación de solvente, ultrafiltración para la eliminación de pirógeno, osmosis inversa y llenado de viales con daptomicina. Véase, p. ej., la publicación internacional PCT WO 01144274, publicada el 21 de junio de 2001 para una descripción detallada de este tipo de método.

La Fig. 12 muestra un diagrama de un método de producción a modo de ejemplo de un compuesto de lipopéptido que comprende etapas de fermentación, microfiltración, cromatografía de intercambio aniónico, ultrafiltración por exclusión de tamaño, cristalización o precipitación, secado del cristal o precipitado, y llenado seco de viales con el compuesto. Véase, p. ej., el Ejemplo 13.

La Fig. 13 muestra un diagrama de un método de producción a modo de ejemplo de un compuesto de lipopéptido que comprende etapas de fermentación, microfiltración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización o precipitación, secado del cristal o precipitado, y llenado seco de viales con el compuesto. Véase, p. ej., el Ejemplo 14.

La Fig. 14 muestra un diagrama de un método de producción a modo de ejemplo de un compuesto de lipopéptido que comprende etapas de fermentación, microfiltración, ultrafiltración por exclusión de tamaños, cristalización o precipitación, secado del cristal o precipitado, y llenado seco de viales con el compuesto. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 15.

La Fig. 15 muestra un diagrama de un método de producción a modo de ejemplo de un compuesto de lipopéptido que comprende etapas de fermentación, microfiltración, cristalización o precipitación, secado del cristal o precipitado, y llenado seco de viales con el compuesto. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 16.

La Fig. 16 representa la estructura de CB-131547, un lipopéptido cíclico análogo de la daptomicina.

5

Descripción detallada de la invención

Objetos de la invención

10 En el presente documento se desvelan métodos para la cristalización y precipitado de los lipopéptidos. En un aspecto, los métodos se usan para cristalizar o precipitar daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina. En otro aspecto, los métodos incrementan la pureza del lipopéptido en comparación con la pureza anterior a la cristalización o precipitación. Los métodos comprenden las etapas de proporcionar una preparación amorfa de un lipopéptido y cristalizar y precipitar el lipopéptido bajo unas condiciones en las que el lipopéptido
15 cristalizado o precipitado, similar al cristal, sea más puro que la preparación amorfa del lipopéptido. En un aspecto, la preparación amorfa no tiene una pureza superior al 92 % y el lipopéptido cristalino, o similar al cristal, purificado por este método tiene al menos un 95 % de pureza, y puede alcanzar una pureza de al menos el 96 %, 97 % o 98 % o superior. En otro aspecto, la preparación amorfa tiene una pureza no superior al 80 % y el lipopéptido cristalino, o similar al cristal, purificado por este método tiene al menos una pureza del 95 %, y puede alcanzar una pureza de al menos el 96 %, 97 % o 98 % o superior. En otro aspecto, la preparación amorfa, tiene una pureza no superior al 60 %, y el lipopéptido cristalino, o similar al cristal, purificado por este método tiene al menos una pureza del 95 %, y puede alcanzar una pureza de al menos el 96 %, 97 % o 98 % o superior. En otro aspecto, la preparación amorfa tiene una pureza no superior al 40 %, y el lipopéptido cristalino, o similar al cristal, purificado por este método tiene al menos una pureza del 95 %, y puede alcanzar una pureza de al menos el 96 %, 97 % o 98 % o superior. En otro aspecto, la preparación amorfa tiene una pureza no superior al 20 %, y el lipopéptido cristalino, o similar al cristal, purificado por este método tiene al menos una pureza del 95 %, y puede alcanzar una pureza de al menos el 96 %, 97 % o 98 % o superior. En otro aspecto más preferido, la preparación amorfa tiene una pureza no superior al 10 %, y el lipopéptido cristalino, o similar al cristal, purificado por este método, tiene una pureza de al menos el 95 %, y puede alcanzar al menos el 96 %, 97 % o 98 % o superior.

30

Un objetivo de la invención es proporcionar procesos para producir y purificar daptomicina que comprende, entre otros, la cristalización de la daptomicina. En una realización, las etapas de cristalización son utilizadas para purificar la daptomicina. En un modo de realización preferido, la cristalización es realizada mediante cristalización por lotes. En otro modo de realización, el proceso es un proceso para la producción comercial de daptomicina. La daptomicina se produce mediante fermentación. El producto de la fermentación es entonces purificado mediante varias técnicas de purificación. La etapa de cristalización se usa en combinación con otras técnicas de purificación, incluyendo la microfiltración, ultrafiltración por exclusión de tamaño y/o cromatografía de intercambio aniónico. En un modo de realización, la etapa de cristalización se utiliza para sustituir una o más técnicas de purificación usadas en un proceso de purificación que no utilice cristalización o precipitación. En otro modo de realización, la etapa de
35 cristalización o precipitación se utiliza para aumentar la purificación en comparación con las otras etapas que no incluyen cristalización o precipitación. El método incluye una etapa de recogida la daptomicina cristalina, tras la cristalización.

40

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar formas de daptomicina cristalinas altamente purificadas, estériles. La forma cristalina de la daptomicina pueden tener cualquier forma cristalina o similar al cristal, incluyendo en forma de erizo (un grupo de agujas unidas que se parecen visualmente a un erizo de mar) (véase Fig. 2), en forma de aguja (véase Fig. 3), en forma de barra (véase Fig. 4), en forma de placa o de escama. La daptomicina cristalina tiene una pureza de al menos el 98.

45

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprenda daptomicina cristalina. En un modo de realización, la composición farmacéutica tiene un recubrimiento entérico para la administración oral o es formulado en forma de partículas micronizadas o microesferas. También se divulgan métodos para administrar la composición farmacéutica a los sujetos que necesiten la misma.

50

Definiciones

55

A menos que se defina lo contrario, a todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados se les aplica el significado comúnmente comprendido por un experto ordinario en el campo al que pertenece la presente invención. La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de
60 química, bioquímica, biofísica y microbiología y terminología básica usada en los mismos.

60

El término lipopéptido hace referencia a una molécula que comprende un grupo parecido a los lípidos unido de manera covalente a un grupo de péptidos, así como a sales, ésteres, amidas y éteres del mismo. El término "lipopéptido" también engloba las formas protegidas de los lipopéptidos en las que uno a más grupos de aminos, carboxilato o hidroxilo están protegidos. Véase, por ejemplo, "Protective Groups in Organic Synthesis" por Therodora W. Greeny John Wiley and Sons, Nueva York, 1981 para ejemplos de grupos protectores. En un modo de

65

realización, el lipopéptido es un antibiótico. En otro modo de realización, el lipopéptido es LY303366, equinocandinas, pneumocandinas, aculeacinas, viscosina, surfactina, plipastatina B1, anfomicina o el lipopéptido derivado de la patente estadounidense 5.629.288. Estos lipopéptidos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense 5.202.309 y la solicitud internacional PCT WO 00/08197. En otro modo de
5 realización, el lipopéptido es una molécula relacionada con la daptomicina. En otro modo de realización, el lipopéptido es daptomicina.

Una "molécula relacionada con la daptomicina" incluye, entre otros, daptomicina A54145 u otro lipopéptido que esté estructuralmente relacionado con la daptomicina, como el lipopéptido relacionado con la daptomicina, incluyendo
10 todos los estereoisómeros que pueden ser producidos en cualquier núcleo quiral presente en estas moléculas.

Un "lipopéptido relacionado con la daptomicina" incluye, sin carácter limitativo, un lipopéptido descrito en la patente estadounidense 4.537.717, 4.482.487, RB32.311, RE32.310 y 5.912.226, actualmente en fase de nueva emisión como solicitud estadounidense número 09/547.357. Los lipopéptidos relacionados con la daptomicina también
15 incluyen aquellos descritos en la Publicación Internacional PCT WO 01/44272, publicada el 21 de junio de 2001; la Publicación Internacional PCT WO 01/44274, publicada el 21 de junio de 2001; y la Publicación Internacional PCT WO 01/144271, publicada el 21 de junio de 2001. Los lipopéptidos relacionados con la daptomicina divulgados en las solicitudes arriba mencionadas hacen referencia a lipopéptidos sintéticos o semisintéticos en los que se modifican los restos de ornitina y/o quinurenina, y/o la cadena lateral de ácido graso de daptomicina. Los
20 lipopéptidos relacionados con la daptomicina también incluyen un antibiótico A-21978C₀ en el cual la cadena lateral de ácido graso de n-decanoilo de daptomicina es sustituida por una cadena lateral de ácido graso de n-octanoilo, n-nonanoilo, n-undecanoilo, n-dodecanoilo, n-tridecanoilo o n-tetradecanoilo.

El término "daptomicina" hace referencia al derivado de n-decanoilo del antibiótico de tipo factor A-21978C₀ que contiene un grupo α -aspartilo. La "daptomicina" es sinónimo de LY 146032.
25

El término "anhidro-daptomicina" hace referencia a un lipopéptido relacionado con la daptomicina en el que un grupo α -aspartilo de daptomicina es ciclado para dar un grupo succinimida. Véase, por ejemplo, la patente '226 para la estructura de la anhidro-daptomicina.
30

El término "isómero β " o "isómero β de daptomicina" hace referencia a un lipopéptido relacionado con la daptomicina que contiene un grupo β -aspartilo en lugar de un grupo α -aspartilo. Véase, por ejemplo, la patente '226 para la estructura del isómero β de daptomicina.
35

El término "aislado" hace referencia a un compuesto o producto que es al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % del compuesto presente en la mezcla. Se entenderá que el término "aislado" también se refiere a un compuesto que es al menos un 5-10 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 % o un 80-90 % del compuesto presente en el grupo de la mezcla. El porcentaje del compuesto en la mezcla podrá medirse por cualquier medio conocido en la técnica, tal y como se describe a continuación para medir la pureza de un compuesto.
40

"Sustancialmente puro" hace referencia a una muestra que tenga contenga al menos un 95 % del compuesto deseado. Preferentemente, la daptomicina es "sustancialmente pura" cuando al menos de un 95 % a un 97 % de la muestra es daptomicina. Del mismo modo, un lipopéptido relacionado con la daptomicina es "sustancialmente puro" cuando al menos de un 95 % a un 97 % de la muestra es un lipopéptido relacionado con la daptomicina.
45

La daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina es "esencialmente puro" cuando al menos de un 98 % a un 99 % de la muestra es daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina, respectivamente.
50

La daptomicina o un lipopéptido relacionado con la 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 el lipopéptido relacionado con la daptomicina, respectivamente.
55

La daptomicina o un lipopéptido relacionado con la 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 el lipopéptido relacionado con la daptomicina, respectivamente.
60

La daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina está "libre" de otro compuesto cuando el otro compuesto está presente en una cantidad que no es superior al 0,01 % de la cantidad de la preparación de daptomicina o el lipopéptido relacionado con la daptomicina, respectivamente. Alternativamente, la daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina está "libre" de otro compuesto cuando el compuesto no puede ser detectado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en condiciones de máxima sensibilidad en las que un límite de detección es aproximadamente 0,05 % o menos de la cantidad de preparación de daptomicina o del lipopéptido relacionado con la daptomicina, respectivamente.
65

La daptomicina "purificada" hace referencia a la daptomicina sustancialmente pura, daptomicina esencialmente pura, o una sal de la misma, o a daptomicina o una sal de la misma que está sustancialmente libre, esencialmente libre o libre de otro compuesto. Del mismo modo, un lipopéptido relacionado con la daptomicina "purificado" hace referencia a un lipopéptido relacionado con la daptomicina sustancialmente puro, esencialmente puro, o a una sal del mismo, o a un lipopéptido relacionado con la daptomicina o una sal del mismo que está sustancialmente libre, esencialmente libre, o libre de otro compuesto.

La daptomicina "cruda" hace referencia a daptomicina o una sal de la misma que tiene un grado de pureza inferior al 90 %. Del mismo modo, un lipopéptido relacionado con la daptomicina "crudo" hace referencia a un lipopéptido relacionado con la daptomicina o a una sal del mismo con una pureza inferior al 90 %.

La daptomicina "semipurificada" hace referencia a daptomicina o a una sal de la misma con una pureza de al menos un 90 % e inferior a un 95 %. Del mismo modo, un lipopéptido relacionado con la daptomicina "semipurificado" hace referencia a un lipopéptido relacionado con la daptomicina o una sal del mismo que tiene una pureza de al menos un 90 % e inferior a un 95 %.

La pureza de la daptomicina, un lipopéptido relacionado con la daptomicina o de otro lipopéptido hace referencia al lipopéptido antes de su formulación en una composición farmacéutica. Se hace referencia a la pureza del lipopéptido mediante el "porcentaje de pureza". La medida de la pureza no es una medida del grado de cristalinidad de la preparación cristalina. La pureza puede medirse por cualquier medio, incluyendo la resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de gases/espectroscopia de masas (CG/EM), cromatografía de líquidos/espectroscopia de masas (CL/EM), o ensayos microbiológicos. Un medio preferido para la medida de la pureza de la daptomicina es mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se describen dos métodos de HPLC analíticos en la Publicación Internacional PCT WO 01/53330, publicada el 26 de julio de 2001.

Un "cristal de lipopéptido" hace referencia a uno o más cristales de un lipopéptido o una sal de lipopéptido. La determinación de un lipopéptido como un cristal puede realizarse mediante cualquier medio, incluyendo, entre otros, microscopía óptica, microscopía electrónica, difracción de rayos X de polvo, resonancia magnética nuclear de sólidos (RMN) o microscopía polarizante. La microscopía también puede emplearse para determinar la longitud del cristal, su diámetro, anchura, tamaño y forma, así como para determinar si el cristal existe como una partícula única o si es policristalino.

Un lipopéptido o partícula de lipopéptido es "similar al cristal" si se establece que tiene características cristalinas mediante un medio, por ejemplo, visualmente o por microscopía óptica o polarizante, pero no tiene características cristalinas si se determinan mediante otro medio, por ejemplo, difracción de rayos X de polvo. Un lipopéptido que es "similar al cristal" puede ser cristalino en determinadas condiciones pero puede convertirse en no cristalino cuando se encuentra bajo otras condiciones.

Un "lipopéptido cristalino" o una "forma cristalina de un lipopéptido" hace referencia a una preparación de un lipopéptido o sal del mismo que comprende cristales de lipopéptido. En un modo de realización, un lipopéptido cristalino puede comprender cierta cantidad de lipopéptidos amorfos. En un modo de realización, el lipopéptido cristalino comprende más del 50 % en peso de cristales de lipopéptido. En otro modo de realización, el lipopéptido cristalino comprende más del 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de cristales de lipopéptido. El lipopéptido cristalino puede comprender el 50-60 %, 60-70 %, 70-80 %, 80-90 % o 90-95 % de cristales de lipopéptido. En otro modo de realización, el lipopéptido cristalino comprende más del 95 % de cristales de lipopéptido, por ejemplo, al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de cristales de lipopéptido o el 100 % de cristales de lipopéptido. El lipopéptido cristalino puede comprender también del 95 % al 100 % de cristales de lipopéptido. El porcentaje en peso de cristales de lipopéptido se refiere a la preparación de lipopéptido previa a su formulación en una composición farmacéutica.

Una forma "amorfa" de un lipopéptido se refiere a una preparación de lipopéptido que comprende pocos o ningún cristal de lipopéptido, o lipopéptidos similares al cristal (o partículas similares al cristal) como aquí se ha definido. En un modo de realización, un lipopéptido amorfo comprende menos del 20 % en peso de cristales de lipopéptido o lipopéptidos similares al cristal. En otro modo de realización, un lipopéptido amorfo comprende menos del 10 % en peso de cristales de lipopéptido o lipopéptidos similares al cristal. En otro modo de realización, un lipopéptido amorfo comprende menos del 5 % en peso de cristales de lipopéptido o lipopéptidos similares al cristal. En otro modo de realización más preferido, un lipopéptido amorfo comprende menos del 1 % en peso de cristales de lipopéptido o lipopéptidos similares al cristal.

La "cristalización por lotes" hace referencia a un método en el que el lipopéptido de interés se mezcla con los reactivos de cristalización en solución y se permite al lipopéptido cristalizar en solución. La "precipitación por lotes" hace referencia a un método en el que se mezcla el lipopéptido con reactivos de precipitación en solución y se permite al lipopéptido que precipite en solución. En un modo de realización, la preparación cristalina o precipitada es recogida de la solución. En otro modo de realización, la preparación cristalino o precipitada es recogida mediante filtración o centrifugación.

Un "precipitante orgánico" hace referencia a polietilenglicol (PEG, por sus siglas en inglés) o polietilenglicol monometil éter (PEG MME, por sus siglas en inglés) o compuestos que sean químicamente similares.

Las "sales" hacen referencia a compuestos iónicos. Estos compuestos iónicos pueden actuar como precipitantes.

Los "alcoholes de bajo peso molecular" son compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo funcional de los alcoholes, y ocho átomos de carbono o menos. Por ejemplo, los alcoholes de bajo peso molecular incluyen, sin carácter limitativo, metanol, isopropanol y terc-butanol.

Los "alcoholes polihídricos" se refieren a compuestos que contienen más de un grupo de alcoholes, y menos de ocho átomos de carbono. Los alcoholes polihídricos incluyen, por ejemplo, sin carácter limitativo, 1,6-hexanediol, etilenglicol, propilenglicol, glicerol, 1,2-propanodiol, 2-metilo-2,4-pentanediol y 1,4-butanodiol.

Los "recipientes" hacen referencia a un envase para contener productos. Por ejemplo, un recipiente puede incluir, sin carácter limitativo, una ampolla, vial, tubo, botella o cilindro.

Métodos de producción de lipopéptidos purificados

En el presente documento se divulgan un método para purificar un lipopéptido, que incluye los pasos de facilitar una preparación amorfa de un lipopéptido y cristalizar o precipitar el lipopéptido. En un aspecto, el lipopéptido tiene un grado superior de pureza tras la cristalización o precipitación que antes de ser sometido a cristalización o precipitación. Los lipopéptidos pueden ser cristalizados mediante difusión en vapor en gota colgante (hanging drop), en gota posada (sitting drop) o gota en sándwich (sandwich drop), difusión de interfase libre o líquido-líquido, mircodíálisis o diálisis, evaporación lenta del solvente, cristalización por sublimación o por lotes o micro-lotes (microbatch). En general, un lipopéptido puede ser precipitado de forma similar, preferiblemente se precipita el lipopéptido mediante precipitación por lotes. En un aspecto preferido, el lipopéptido cristalizado o precipitado es daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina. En un aspecto más preferido, el lipopéptido cristalizado o precipitado es daptomicina.

La daptomicina pueden cristalizarse siguiendo las pautas de esta descripción. En un modo de realización, la daptomicina puede cristalizarse mediante la preparación de una solución que contenga daptomicina con un peso molecular bajo o un alcohol polihídrico, un agente regulador del pH y una sal que contenga un catión monovalente o divalente, y permitiendo que se produzca la precipitación, como se discute a continuación. En otro modo de realización, la sal comprende un catión divalente. En un modo de realización preferido, la solución preparada no contiene PEG o PEG-MME o compuestos químicamente similares. El método para cristalizar la daptomicina en la presente invención comprende las fases de:

- a) mezclar la daptomicina con una sal que contenga un catión monovalente o divalente, un agente regulador del pH opcional, y un alcohol con bajo peso molecular o polihídrico; y
- b) permitir que la daptomicina cristalice a partir de la solución bajo las condiciones de temperatura adecuadas.

Las muestras pueden ser monitorizadas, entre otros, para vigilar la formación de cristal o precipitado mediante examen microscópico y el rendimiento puede seguirse por espectrofotometría..

En otro modo de realización, la daptomicina puede cristalizarse mediante la preparación de una solución que comprende alcohol(es) polihídricos o con bajo peso molecular, sales y un precipitante orgánico como se explica a continuación. En general, para la cristalización por lotes, la daptomicina se disuelve en una solución, y a ésta se le añaden alcoholes con bajo peso molecular, sales, agentes reguladores y/o precipitantes orgánicos. Después, las muestras son cristalizadas bajo condiciones de temperatura adecuadas, con o sin agitación. Las muestras pueden ser monitorizadas, entre otros, para vigilar la formación de cristal mediante examen microscópico y el rendimiento puede seguirse por espectrofotometría.

Como se explica arriba, la daptomicina se cristaliza en presencia de un alcohol polihídrico o de bajo peso molecular. Los ejemplos de alcoholes con bajo peso molecular o polihídricos incluyen, sin carácter limitativo, metanol, isopropanol, terc-butanol, 1,6-hexanediol, etilenglicol, propilenglicol, glicerol, 1,2-propanodiol, 2-metilo-2,4-pentanediol y 1,4-butanodiol. En un modo de realización preferido, el alcohol es isopropanol, terc-butanol, glicerol, 1,6-hexanediol, 1,2-propanodiol, 1,4-butanodiol, propilenglicol y/o etilenglicol. En un modo de realización más preferido, el alcohol es isopropanol.

Las sales incluyen, entre otros, formiato de magnesio o de sodio, sulfato de amonio, dihidrogenofosfato de amonio, acetato de calcio, acetato de zinc, citrato trisódico dihidratado, acetato de magnesio, acetato de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de cadmio, acetato de amonio, cloruro sódico y sulfato de litio. En un modo de realización, la sal contiene un catión monovalente, por ejemplo, sodio. En un modo de realización preferido, la sal contiene un catión divalente. En un modo de realización más preferido, la sal contiene un catión de calcio, un catión de magnesio o un catión de manganeso. En un modo de realización aún más preferido, la sal contiene un catión divalente de calcio. En un modo de realización, la sal es cloruro de calcio, acetato de calcio, acetato de zinc, citrato sódico, citrato trisódico

dihidratado, cloruro de magnesio, sulfato de litio, cloruro sódico, acetato de magnesio, acetato sódico o una sal de manganeso, como acetato de manganeso o cloruro de manganeso. En un modo de realización preferido, la sal es acetato de calcio. Los ejemplos de otras sales que contienen un catión divalente, como un catión de calcio, son conocidos en la técnica, e incluyen, entre otros, aquellos enumerados en el Catálogo Sigma 2000. Sin entrar en discusiones técnicas, se cree que el catión de la sal puede neutralizar las cargas negativas en el lipopéptido, por ejemplo, los cuatro ácidos carboxílicos de la daptomicina. Los precipitantes orgánicos incluyen, entre otros, polietilenglicoles (PEGs) cuyo peso molecular medio puede oscilar entre 300 y 10.000, o polietilenglicol monometil éter (PEG-MME). En un modo de realización preferido, el precipitante orgánico es PEG-300, PEG-600, PEG-2000, PEG-4000, PEG-8000 o PEG-10.000.

La daptomicina se cristaliza desde una solución que es ajustada a un pH de 5,0 a 9,5. En un modo de realización, antes de ser ajustada, la solución tiene un pH de 1,5, 2,0 o 3,. En un modo de realización, la daptomicina se cristaliza desde una solución de pH 5,5 aproximadamente a pH 7,5 aproximadamente. En otro modo de realización, el tampón tiene un pH 5,9 aproximadamente a 6,3 aproximadamente. En un modo de realización, la solución tamponada puede obtenerse mediante el uso de un agente regulador del pH. Ejemplos de agentes reguladores del pH incluyen, sin carácter limitativo, tris, fosfato, citrato, HEPES, CHES, acetato sódico o ácido 2-Morpholinoethanesulfonic (MES), borato sódico, cacodilato sódico, imidazol o citrato trisódico dihidratado. En un modo de realización preferido, la sal es un cacodilato sódico, acetato sódico, citrato trisódico dihidratado, HEPES, MES, CHES, imidazol, acetato de calcio y Tris-HCl. En un modo de realización más preferido, el regulador de pH es acetato de calcio pH 6,1, acetato sódico pH 6,1, cacodilato sódico pH 6,5, citrato trisódico dihidratado pH 5,6, HEPES pH 7,5, imidazol pH 8, MES pH 6,0, acetato de calcio pH 6 y Tris-HCl pH 8,5. En otro modo de realización, la solución puede ser ajustada utilizando una sal que también tenga capacidad reguladora del pH. En un modo preferido, el tampón utilizado es acetato de calcio pH 6,1.

La daptomicina se cristaliza mediante difusión en vapor en gota colgante (hanging drop) a partir de una solución que contiene de un 2 a un 40 % de alcohol de bajo peso molecular o polihídrico, de 0,001 a 0,5 M de sal y de 0,005 a 0,2 M de agente regulador de pH. En un modo de realización preferido, la daptomicina se cristaliza a partir de una solución que contiene de un 3 a un 30 % de alcohol de bajo peso molecular o polihídrico, de 0,01 a 0,3 M de sal y de 0,01 a 0,1 M de agente regulador de pH. En un modo de realización más preferido, la daptomicina se cristaliza a partir de una solución que contiene de un 5 % a un 20 % de alcohol de bajo peso molecular o polihídrico, de 0,02 a 0,1 M de sal y de 0,02 a 0,07 M de agente regulador de pH. La solución obtenida puede o no contener polietilenglicol (PEG) o polietilenglicol monometil éter (PEG-MME).

La daptomicina se cristaliza utilizando la cristalización por lotes a partir de una solución que contiene de un 65 % a un 95 % de alcohol de bajo peso molecular o polihídrico, de 0,001 a 0,5 M de sal y de 0,001 a 0,2 M de agente regulador de pH. En un modo de realización preferido, la daptomicina se cristaliza a partir de una solución que contiene de un 70 % a un 90 % de alcohol de bajo peso molecular o polihídrico, de 0,005 a 0,04 M de sal y de 0,005 a 0,04 M de agente regulador de pH. En algunos modos de realización, la daptomicina se cristaliza a partir de una solución que también contiene un 3-8 % de precipitante orgánico. En un modo de realización más preferido, la daptomicina se cristaliza a partir de una solución que contiene de un 80 % a un 85 % de alcohol de bajo peso molecular o polihídrico, de 0,01 a 0,03 M de sal y de 0,01 a 0,03 M de agente regulador de pH. En algunos modos de realización, la solución también contiene alrededor de un 4 o 5 % de precipitante orgánico, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o polietilenglicol monometil éter (PEG-MME). En otro modo de realización, la solución producida no contiene polietilenglicol (PEG) o polietilenglicol monometil éter (PEG-MME).

La daptomicina se cristaliza a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 30 °C para obtener formaciones de precipitado y cristal, respectivamente. En un modo de realización preferido, la daptomicina se cristaliza a una temperatura de aproximadamente 20-30 °C. En un modo de realización más preferido, la mezcla se cristaliza a aproximadamente 23-28 °C. En un modo de realización aún más preferido, la mezcla se cristaliza a aproximadamente 27 °C. La mezcla puede ser cristalizada o precipitada durante cualquier periodo de tiempo que resulte en la cristalización o precipitación, preferiblemente de una hora aproximadamente a dos semanas aproximadamente. En un modo de realización preferido, la mezcla se conserva durante un periodo de aproximadamente tres horas a aproximadamente 24 horas, más preferiblemente 8-18 horas aproximadamente.

Los cristales de lipopéptido o partículas similares al cristal pueden tener la forma de, sin carácter limitativo, aguja, barra, erizo, escama, placa o racimo. En un modo de realización, los cristales de daptomicina tienen forma de erizo, barra o aguja. La forma de la partícula de cristal puede determinarse, entre otros, mediante microscopía óptica o electrónica. En otro modo de realización, los cristales de daptomicina pueden tener cualquier tamaño que tenga al menos 0,5 µm de diámetro en cualquier dimensión. En un modo de realización más preferido, los cristales de daptomicina tienen al menos 5 µm, más preferiblemente al menos 10 µm. En un modo de realización aún más preferido, los cristales de daptomicina tienen al menos 50 µm, más preferiblemente al menos 100 µm. El tamaño del cristal puede determinarse mediante cualquier método conocido por los expertos del sector. Véase, por ejemplo, United States Pharmacopeia (USP), páginas 1965-67.

Las propiedades de un lipopéptido cristalino o similar al cristal pueden determinarse por cualquier método conocido por los expertos del sector. Las propiedades que pueden ser determinadas incluyen el tamaño del lipopéptido

5 cristalino o similar al cristal, la forma, propiedades de birrefringencia, propiedades de difracción de rayos X de polvo, propiedades de RMN en estado sólido, la temperatura de fusión y la estabilidad frente al calor, la luz, la humedad y la degradación. En un modo de realización preferido, un experto en el sector puede determinar si un lipopéptido es cristalino mediante difracción de rayos X de polvo. La difracción de rayos X de polvo es sumamente útil para
 10 determinar si una preparación es cristalina cuando la muestra es un grupo de pequeños cristales orientados de forma aleatoria. La difracción por un conjunto de microcristales orientados de forma aleatoria produce una serie de líneas o anillos (según el detector) característica de la molécula estudiada y su estructura. En un modo de realización preferido, la difracción de polvo es medida por un instrumento automatizado de difracción de polvo para determinar si el lipopéptido es cristalino. Véase, por ejemplo, Atkins et al., Physical Chemistry, pp. 710-716 (1978)
 15 para una discusión del Método de Debye-Scherrer de difracción de polvo. Para establecer el patrón de difracción, se puede utilizar cualquier instrumento de difractómetro de polvo conocido en el sector que esté equipado con cualquier detector de difracción de polvo conocido en el sector.

20 En un modo de realización preferido de la invención, la daptomicina se cristaliza utilizando un agente regulador de entre aproximadamente pH 5,0 y 9,5, una sal y un alcohol a una temperatura de aproximadamente 24-28 °C durante un periodo de aproximadamente tres a 24 horas. En un modo de realización preferido, la sal es un agente regulador y contiene un catión divalente y el alcohol es un alcohol de bajo peso molecular, y el pH es de entre 5,5 y 7,5 aproximadamente. En un modo de realización aún más preferido, la sal es una sal de calcio, el alcohol es isopropanol y el pH es de entre 5,9 y 6,3 aproximadamente. En los modos de realización en los que la solución
 25 incluye un precipitante orgánico, éste es preferiblemente PEG 4000 o PEG 8000. En otro modo de realización, la daptomicina se cristaliza a partir de una solución que contiene de un 12 a un 18 % de glicerol, de 0,3 a 0,8m de sal, de 0,03 a 0,08m de agente regulador de pH y un 12-18 % de PEG 600. Los Ejemplos 2-3 proporcionan métodos para precipitar daptomicina similar al cristal altamente pura. Un experto en el sector, siguiendo las indicaciones de la presente descripción, puede modificar las condiciones de cristalización/precipitación establecidas en los ejemplos para cristalizar o precipitar daptomicina, lipopéptidos relacionados con la daptomicina, u otros lipopéptidos de interés. Además, a pesar de que las indicaciones de la presente descripción explican el uso de una sola fase de cristalización o precipitación en un proceso para purificar un lipopéptido, un experto en el sector siguiendo las indicaciones de la descripción puede utilizar múltiples fases de cristalización o precipitación en un proceso para purificar un lipopéptido. Puede resultar beneficioso utilizar rondas múltiples de cristalización o precipitación como se
 30 revela aquí para aumentar aún más la pureza del lipopéptido.

35 Tras la cristalización, se puede recoger el material cristalino mediante cualquier método conocido en el sector. En un modo de realización preferido, el material cristalino recogido mediante centrifugación o filtración. En un modo de realización aún más preferido, el material cristalino es recogido mediante filtración porque la filtración se puede incorporar fácilmente a un proceso a gran escala para la producción de un lipopéptido. Después de que el material cristalino haya sido recogido, puede ser lavado para eliminar cualquier exceso de reactivos cristalizadores. Se puede elegir cualquier disolvente de lavado conocido en el sector mientras que no disuelva perceptiblemente el material cristalino. Se da un ejemplo de disolvente de lavado en el Ejemplo 12. Una vez que el material cristalino ha sido lavado, puede ser secado por cualquier método conocido en el sector. Los ejemplos de métodos de secado incluyen
 40 el secado al aire, la liofilización (secado por frío) o la desecación. En un modo de realización preferido, el material cristalino es desecado. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 12. En otro modo de realización, la estabilidad de la daptomicina cristalina puede ser determinada por su actividad antibiótica residual o su degradación. La actividad antibiótica puede medirse en una prueba de difusión en agar estándar contra varias cepas bacterianas. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 32 de la patente estadounidense 4.537.717. La cantidad de degradación puede medirse mediante, entre otros, análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), como el descrito en la Publicación Internacional PCT WO 01/53330, publicada el 26 de julio de 2001. En un modo de realización preferido, la estabilidad de la daptomicina cristalina es mayor que la de la forma amorfa de la daptomicina. Se puede determinar la estabilidad del lipopéptido cristalino exponiendo el lipopéptido cristalino y una forma amorfa del mismo al calor, a la luz, y a la humedad, y midiendo el grado de degradación de la forma cristalina en comparación con la forma amorfa.
 50

55 La degradación del lipopéptido puede medirse determinando la actividad biológica del lipopéptido o cualquier parámetro físico aplicable. En un modo de realización, la degradación puede medirse determinando la actividad biológica particular de un lipopéptido tras haberlo expuesto al calor, la luz, la humedad, cambios en el pH o pH extremo, y comparándolo con la misma actividad biológica del lipopéptido anterior a cualquier test de estabilidad. La cantidad de degradación puede establecerse, por ejemplo, determinando el porcentaje de actividad biológica restante tras el test de estabilidad. El porcentaje de actividad biológica restante puede compararse al porcentaje de una forma amorfa del lipopéptido que ha sido sometido a la misma prueba. En un modo de realización, si el lipopéptido es un antibiótico, el lipopéptido cristalino puede someterse a pruebas para determinar su actividad antibiótica antes y después de realizar una prueba de estabilidad y compararlo con la forma amorfa que ha sido sometida a pruebas antes y después de la prueba de degradación. En la presente invención, el lipopéptido es daptomicina y la prueba de la actividad biológica determina la cantidad de actividad antibiótica del lipopéptido frente a bacterias Gram positivas.
 60

65 La degradación de un lipopéptido también puede medirse mediante una prueba física. En un modo de realización, la degradación puede medirse determinando el porcentaje de lipopéptido cristalino intacto restante tras una prueba de

estabilidad. El porcentaje de lipopéptido intacto restante puede compararse al de una forma amorfa de lipopéptido que ha sido sometida a la misma prueba de estabilidad. En un modo de realización preferido, la degradación del lipopéptido puede medirse mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), espectroscopía ultravioleta, espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear, o espectroscopía de masas. En un modo de realización aún más preferido, se usa HPLC para determinar el porcentaje de lipopéptidos intactos que quedan después de que una forma cristalina de un lipopéptido haya sido sometida a una prueba de su estabilidad.

Sin entrar en discusiones técnicas, los solicitantes creen que la daptomicina es cristalizada por los métodos arriba descritos. Sin embargo, se cree que lavar y/o secar los cristales de daptomicina provoca que el material cristalino de la daptomicina vuelva a una forma no cristalina pero aún similar al cristal. No obstante, incluso si los métodos arriba descritos solo precipitan, más que cristalizar, la daptomicina u otro lipopéptido, los métodos continúan siendo beneficiosos porque los métodos purifican el lipopéptido.

La invención también proporciona daptomicina cristalina producida por los métodos arriba descritos, como se define en las reivindicaciones adjuntas. En un modo de realización, la daptomicina cristalina comprende una cantidad menor de una o más impurezas en comparación con el lipopéptido antes de la cristalización. En un modo de realización, la daptomicina cristalina comprende un nivel menor de anhidro-daptomicina y de isómero β de daptomicina en comparación con la daptomicina antes de la cristalización. En otro modo de realización, la daptomicina cristalina comprende un nivel inferior de todas las impurezas en comparación con la daptomicina amorfa..

La daptomicina cristalina producida por el método descrito arriba probablemente contiene cationes monovalentes o divalentes y agua. En un modo de realización preferido, la daptomicina cristalina comprende un catión divalente. En un modo de realización más preferido, el catión divalente es un catión de calcio. En un modo de realización aún más preferido, la daptomicina cristalina comprende aproximadamente un 1-10 % en peso de un catión de calcio divalente y aproximadamente un 0-15 % en peso de agua, como se ha determinado por análisis de absorción atómica y gravedad térmica. En un modo de realización aún más preferido, la daptomicina cristalina comprende aproximadamente un 5 % en peso de un catión de calcio divalente y aproximadamente un 10 % en peso de agua, mediante análisis HPLC, la pureza de la daptomicina cristalina o similar al cristal es el menos de un 98 % en comparación con otras sustancias relacionadas y contaminantes orgánicos. Alternativamente, la daptomicina cristalina comprende un catión monovalente como el sodio. Sin entrar en discusiones técnicas, se cree que la daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina puede formar una sal con el catión monovalente o divalente cuando cristaliza o precipita.

La forma cristalina del lipopéptido puede presentar una solubilidad aumentada en una solución o una tasa de reconstitución aumentada en una solución en comparación con la forma amorfa del lipopéptido. Se puede medir si el lipopéptido cristalino presenta una solubilidad aumentada o tasa de reconstitución aumentada por cualquier método conocido en el sector. Por ejemplo, se puede disolver una cantidad definida de lipopéptido cristalino en una solución acuosa y medir la concentración de lipopéptido disuelto y compararla a la concentración de lipopéptido disuelto que se ha preparado disolviendo la misma cantidad de lipopéptido amorfo en una solución acuosa. Del mismo modo, se puede medir la tasa de reconstitución de un lipopéptido cristalino añadiendo el lipopéptido cristalino a una solución acuosa y después midiendo la concentración de lipopéptido disuelto con el tiempo y comparándolo con la tasa de reconstitución de un lipopéptido amorfo que ha sido medido del mismo modo. La concentración de lipopéptido se mide mediante HPLC.

Los métodos arriba descritos facilitan la producción de daptomicina cristalina que es más pura que la daptomicina amorfa a partir del cual se cristaliza. En otro modo de realización, la daptomicina tiene una pureza no superior al 92 % antes de la cristalización y tiene una pureza de al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 % o 98 %, o cualquier pureza entre el 95-98 %, tras la cristalización. En un modo de realización aún más preferido, la daptomicina tiene una pureza no superior al 90 % antes de la cristalización y tiene una pureza de aproximadamente al menos 97 % o 98 % tras la cristalización.

En otro modo de realización, la daptomicina tiene una pureza no superior al 80 %, preferentemente no superior al 70 % y más preferentemente no superior al 60 % antes de la cristalización, y al menos una pureza de aproximadamente 95 %, 96 %, 97 % o 98 %, o cualquier pureza entre el 95-98 %, tras la purificación. En otro modo de realización, la daptomicina tiene una pureza no superior al 50 %, preferentemente no superior al 40 %, más preferentemente no superior al 30 %, antes de la cristalización y al menos aproximadamente una pureza del 95 %, 96 %, 97 % o 98 %, o cualquier pureza entre el 95-98 %, tras la purificación mediante cristalización. Se prefiere aún más un modo de realización en el que la daptomicina tiene una pureza no superior al 20 %, más preferentemente no superior al 15 %, aún más preferentemente no superior al 10 % antes de la cristalización, y tiene al menos una pureza de aproximadamente el 95 %, 96 %, 97 % o 98 %, o cualquier pureza entre el 95-98 % tras la purificación.

En un modo de realización más preferido, el lipopéptido es daptomicina. Se puede obtener una preparación de daptomicina mediante cualquier método descrito, por ejemplo, en cualquiera de las patentes estadounidenses RE32,333, RE32,455, 4,800,157, RE32,310, RE32,311, 4,537,717, 4,482,487, 4,524,135, 4,874,843, 4,885,243 o 5,912,226. También se puede obtener una preparación de daptomicina mediante uno de los métodos descritos en la

publicación internacional PCT WO 01/53330, publicada el 26 de julio de 2001. Una vez que se ha preparado la preparación de lipopéptido, ésta es cristalizada o precipitada siguiendo las pautas de la descripción aquí realizada para producir un lipopéptido cristalino que es más puro o que contiene niveles más bajos de impurezas específicas, por ejemplo, anhidro-daptomicina, que la preparación de lipopéptido a partir de la que se prepara.

5

Proceso para la producción de lipopéptidos purificados a partir de cultivos de fermentación

Se esboza en un modo de realización de la presente invención un proceso que combina fases de cromatografía de procesos y cristalización para producir daptomicina purificada. El método comprende las fases de producción de daptomicina mediante fermentación de un organismo de origen natural o recombinante, y después sometiendo la preparación de daptomicina a uno o más de cualquiera de los métodos de purificación como la microfiltración, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, y/o cromatografía de exclusión de tamaños (bien sea mediante los medios de cromatografía de exclusión de tamaños tradicionales o mediante ultrafiltración) para producir una preparación de daptomicina que ha sido parcialmente purificada, y después cristalizando la preparación de daptomicina para obtener daptomicina cristalina purificada. Las fases relativas a la fermentación, microfiltración, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, y ultrafiltración han sido descritas en la técnica, por ejemplo, en cualquiera de las patentes estadounidenses RE32.333, RE32.455, 4.800.157, RE32.310, RE32.311, 4.537.717, 4.482.487, 4.524.135, 4.874.843, 4.885.243 o 5.912.226, en la publicación internacional WO 01/53330, publicada el 26 de julio de 2001.

10

15

20

El método comprende la fase de recoger y/o lavar el material cristalino tras la fase de cristalización o precipitación. En un modo de realización preferido, la daptomicina cristalina se puede recoger mediante filtración. En otro modo de realización, el material cristalino o similar al cristal es secado.

25

El método de purificación comprende fermentar *Streptomyces roseosporus* para obtener un cultivo de fermentación que contenga daptomicina. En un modo de realización, el *Streptomyces roseosporus* puede ser fermentado como se describe en la patente estadounidense 4.885.243. En otro modo de realización, las condiciones de fermentación en las que se produce el producto bruto que contiene A-21978C₀ mediante *Streptomyces roseosporus* son alteradas para aumentar la producción de daptomicina y reducir las impurezas y contaminantes relacionados producidos por el cultivo de fermentación del *Streptomyces roseosporus* como se describe en la Publicación Internacional PTC WO 01/53330, publicada el 26 de julio de 2001. La publicación WO 01/53330 describe la fermentación de *Streptomyces roseosporus* como se describe en la patente '243 con la modificación de que la alimentación de ácido decanoico se mantiene en los niveles más bajos posibles sin disminuir el rendimiento general de la fermentación.

30

35

Alternativamente, la daptomicina puede obtenerse fermentando una cepa bacteriana u otro organismo productor que produzca recombinantemente daptomicina. En otro modo de realización, la cepa bacteriana recombinante u otro organismo recombinante comprende el cluster génico biosintético de la daptomicina. En otro modo de realización, el cluster génico biosintético de la daptomicina o una porción del mismo se introduce en el organismo o cepa bacteriana por medio de un BAC o cromosoma artificial bacteriano. En otro modo de realización, la cepa bacteriana recombinante utilizada es el *Streptomyces roseosporus* o *Streptomyces lividans* que comprende un cromosoma artificial bacteriano que contiene el cluster génico biosintético de la daptomicina. La solicitud provisional de patente estadounidense 60/272.207, presentada el 28 de febrero de 2001 describe el cluster génico biosintético de la daptomicina a partir de *Streptomyces roseosporus* y los usos del mismo.

40

45

Tras la fermentación, el caldo de fermentación se clarifica por centrifugación, microfiltración o extracción, como se conoce en la técnica o como se describe en la publicación WO 01/53330. En un modo de realización preferido, la clarificación se lleva a cabo mediante microfiltración. Véase, por ejemplo, los Ejemplos 13-16 y las Figuras 11-15. La Figura 11 muestra un proceso de producción a modo de ejemplo que no utiliza cristalización o precipitación.

50

Después de que el caldo de fermentación haya sido clarificado, la concentración de daptomicina en el caldo es aproximadamente de 5-10 %. En un modo de realización de la invención, la preparación de daptomicina es sometida a un método de cristalización/precipitación descrito arriba inmediatamente después de la microfiltración. En un modo de realización, la cristalización o precipitación se lleva a cabo en condiciones estériles. Después de que la cristalización o precipitación haya sido completada, la daptomicina cristalina o similar al cristal es, de manera opcional, recolectada, lavada y secada, como se describe más detalladamente abajo. El fármaco activo seco a granel puede ser utilizado entonces para llenar viales estériles en seco. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 16 y la Figura 12.

55

60

Después de que el caldo de fermentación haya sido clarificado, el lipopéptido se enriquece en la preparación mediante cromatografía de intercambio aniónico, como se conoce en la técnica o como se describe en la publicación WO 01/53330 o aquí. Véase, Ejemplos 13-14 y las Figuras 12-13. Tras la cromatografía de intercambio aniónico, la pureza de la daptomicina en el caldo es aproximadamente del 35-40 %. En un modo de realización de la invención, la preparación de daptomicina es entonces sometida a un método de cristalización o precipitación arriba descrito, posterior a la cromatografía de intercambio aniónico. En un modo de realización, la cristalización o precipitación se lleva a cabo en condiciones estériles. Después de que la cristalización o precipitación haya sido completada, la daptomicina cristalina o similar al cristal, de manera opcional, se recoge, lava y seca como se describe abajo. El

65

fármaco activo seco a granel puede ser usado entonces para llenar viales estériles en seco. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 14 y la Figura 13.

5 En otro modo de realización de la invención, la preparación de daptomicina es sometida a ultrafiltración de exclusión de tamaños tras la cromatografía de intercambio aniónico. La ultrafiltración de exclusión de tamaños se describe en la publicación WO 01/53330. La solicitud publicada el 26 de julio de 2001 describe un método de despirogenizado, filtrado y concentrado de la daptomicina utilizando una membrana de ultrafiltración de peso molecular nominal de 10.000 a 30.000. La solicitud revela un método en el que el lipopéptido pasa a través de una membrana de ultrafiltración mientras las impurezas de gran peso molecular, como las endotoxinas, son retenidas por el filtro.
10 Después de que el lipopéptido haya pasado por la membrana, el pH, la temperatura y/o la concentración de sal de la solución de lipopéptido son alterados de tal manera que los lipopéptidos forman micelas. Después la solución de lipopéptido es filtrada en una membrana de ultrafiltración en condiciones en las que las micelas de lipopéptido son retenidas en la membrana mientras que las impurezas menores pasan a través del filtro. De este modo, el lipopéptido se purifica en mayor medida. La solicitud revela las condiciones bajo las cuales las micelas de lipopéptido pueden formarse y disociarse, así como métodos para filtrar la solución de lipopéptido para obtener una aplicación del lipopéptido más purificada. En un modo de realización aún más preferido, el lipopéptido es daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina. A continuación, la daptomicina se cristaliza, como se describe en el presente documento. Tras la cromatografía de intercambio aniónico y la ultrafiltración de exclusión por tamaños, la pureza de la daptomicina es aproximadamente de un 80-90 %. Como se explica arriba, la preparación de daptomicina es entonces sometida a un método de cristalización o precipitación descrito arriba, preferentemente en condiciones estériles. La daptomicina cristalina es, recogida y puede, opcionalmente, lavarse, secarse y utilizarse para llenar viales en seco como se describe a continuación. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 13 y la Figura 12.

25 En un aspecto de la divulgación, la preparación de daptomicina en bruto es sometida a ultrafiltración de exclusión de tamaños sin cromatografía de intercambio aniónico. Tras la ultrafiltración de exclusión de tamaño, la pureza de la daptomicina es aproximadamente de un 35-40 %. Después, el lipopéptido puede ser cristalizado o precipitado como se describe en el presente documento, preferentemente mediante métodos estériles. Como se ha explicado arriba, la daptomicina cristalina o similar al cristal puede ser recogida, lavada, secada y usada para llenar viales estériles en seco. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 15 y la Figura 14.

35 En un modo de realización alternativo, la preparación de daptomicina es sometida a cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), como se describe en la publicación WO 01/53330, tras la cromatografía de intercambio aniónico o la filtración de exclusión de tamaño. La daptomicina puede entonces ser cristalizado o precipitado como se describe en el presente documento.

Tras la cristalización, la daptomicina cristalina puede ser recogido mediante un método aquí descrito, por ejemplo, mediante filtración o centrifugación. De manera opcional, la daptomicina cristalina se lava opcionalmente para eliminar restos de disolvente de cristalización. Abajo se describe un método de lavado de cristales o material similar al cristal. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 3. El material de cristal lavado, o no lavado puede secarse. El secado puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin carácter limitativo, el secado al vacío, secado por pulverización, en secador de bandejas, o por liofilización. En un modo de realización, el secado se lleva a cabo bajo condiciones estériles. En otro modo de realización, el secado se lleva a cabo mediante secado al vacío. En un modo de realización más preferido, el secado se lleva a cabo utilizando un secador al vacío de doble cono Klein Hastelloy-B de 0,65 m³ o un aparato equivalente. La daptomicina cristalina seca es estable y se almacena fácilmente.

50 En un modo de realización, los viales se llenan con cualquier cantidad conveniente de daptomicina cristalina. En un modo de realización, los viales se llenan en condiciones estériles y después se tapan. En otro modo de realización, los viales se llenan con una cantidad de 50 a 5000 mg cada uno de la daptomicina cristalina, seca. En otro modo de realización, los viales se llenan con una cantidad de 100 a 1000 mg cada uno. En otro modo de realización, los viales se llenan con una cantidad de 200 a 500 mg cada uno. En otro modo de realización, la daptomicina cristalina seca es utilizada para el envasado a granel de la daptomicina. El envasado a granel es normalmente mayor de 5000 mg cada uno de daptomicina cristalina seca. En un modo de realización, el envasado a granel se lleva a cabo en condiciones estériles.

60 En un modo de realización, la fase de cristalización se lleva a cabo en condiciones estériles. En este modo de realización, se utilizan reactivos de cristalización y precipitación estériles y un entorno de trabajo estéril y controlado. En un modo de realización, se filtra la daptomicina en una membrana de ultrafiltración, como se describe arriba, antes de mezclarlo con los reactivos de cristalización estériles. Tras la cristalización, la preparación cristalina es recogida mediante centrifugación o filtración en condiciones estériles. En un modo de realización, la preparación de daptomicina es recogida mediante filtración estéril. En otro modo de realización, la daptomicina cristalina es esterilizada una vez que ha sido recogido. Los métodos de cristalización, precipitación y filtración estériles, así como los métodos de esterilización de un producto farmacéutico final son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company (1995), pp. 1474-1487.

En otro modo de realización, la daptomicina cristalina no es secada. En este modo de realización, la daptomicina cristalina es preferentemente guardada en una solución que preserva la naturaleza cristalina de la daptomicina. Los viales pueden llenarse con la daptomicina y la solución en condiciones estériles o no estériles. En un modo de realización, las condiciones son estériles. Alternativamente, la daptomicina cristalina o y la solución pueden utilizarse para llenar embalaje a granel.

Las Figuras 10 y 11 muestran diagramas que describen un protocolo a modo de ejemplo de producción de daptomicina que utiliza la cristalización. La incorporación de la cristalización estéril al protocolo de producción acorta el protocolo considerablemente y elimina de 3 a 4 fases en el proceso.

Lipopéptidos cristalinos o similares al cristal, composición farmacéutica y métodos de uso de los mismos

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar daptomicina cristalina o sales de los mismos, así como formulaciones farmacéuticas que contengan daptomicina cristalina o sus sales.

Los cristales de daptomicina o partículas similares al cristal, así como otros cristales de lipopéptido o partículas similares al cristal pueden tener la forma de, entre otros, una aguja, una placa, un listón, ecuante, de erizo, o barra. En un modo de realización, los cristales de daptomicina o partículas similares al cristal pueden tener forma de erizo, aguja, o barra. El tamaño de los cristales o las partículas similares al cristal puede variar desde aproximadamente 0,5 μm a más de 100 μm . En un modo de realización, el tamaño de la partícula es al menos de 5 μm o mayor. En un modo de realización más preferido, el tamaño de la partícula es al menos 10 μm o mayor, más preferiblemente al menos 50 μm . En un modo de realización aún más preferido, el tamaño de la partícula es al menos 100 μm .

Además, en un modo de realización, los cristales de daptomicina tienen un patrón de difracción de rayos X como el que se muestra en las Figs. 6, 7 y 8. En otro modo de realización, el cristal de daptomicina presenta un punto de fusión diferente al de la forma amorfa de la daptomicina.

En un modo de realización de la invención, una forma cristalina de daptomicina presenta una estabilidad igual o superior a la de la forma amorfa de la daptomicina. En otro modo de realización preferido, la daptomicina cristalina es estéril. En otro modo de realización preferido, la estabilidad de la daptomicina cristalina es superior a la de la forma amorfa de la daptomicina. La daptomicina cristalina puede presentar una mayor estabilidad al calor, la luz, la degradación o la humedad que la forma amorfa. La estabilidad del lipopéptido puede medirse mediante cualquier medio incluyendo, por ejemplo, actividad antibiótica, degradación del lipopéptido o conversión de la daptomicina en anhidro-daptomicina o el isómero β de la daptomicina. En otro modo de realización de la invención, la forma cristalina de la daptomicina puede ser reconstituida más rápidamente en solución acuosa que la forma amorfa de la daptomicina.

Los lipopéptidos cristalinos o similares al cristal, como la daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina, sales, ésteres, amidas y éteres farmacéuticamente aceptables y formas protegidas de los mismos, pueden ser formulados para su administración oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, en aerosol, tópica o parenteral para el tratamiento terapéutico, empírico y profiláctico de enfermedades, en particular las infecciones bacterianas. Las referencias aquí realizadas a "lipopéptidos cristalinos o similares al cristal" o "daptomicina cristalina o similar al cristal" incluyen sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Los lipopéptidos cristalinos o similares al cristal, como la daptomicina, pueden ser especialmente beneficiosos para las composiciones farmacéuticas porque pueden ser formulados fácilmente como partículas micronizadas de microesferas, lo que permite una preparación simplista de lipopéptidos cubiertos con una capa entérica para su administración oral, de composiciones farmacéuticas para su administración en aerosol a, por ejemplo, al pulmón, y la preparación de formulaciones de lipopéptidos para la liberación sostenida. Los lipopéptidos cristalinos o similares al cristal daptomicina cristalina y la daptomicina cristalina o similar al cristal también podrán ser disueltos en una solución acuosa más fácilmente.

Los lipopéptidos cristalinos o similares al cristal, incluyendo la daptomicina o lipopéptidos relacionados con la daptomicina pueden ser formulados usando cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable que sea compatible con la daptomicina o con los lipopéptidos de interés. Véase, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Additives: An International Guide to More than 6000 Products by Trade Name, Chemical, Function, and Manufacturer, Ashgata Publishing Co., eds., M. Ash y I. Ash 1996; The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, ed. S. Budavari, anual; Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA; Martindale: The Complete Drug Reference, ed. K. Parfitt, 1999; y Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New York, NY, ed. L. S. Goodman et al.; para una descripción general de los métodos para administrar agentes antimicrobianos para terapia humana. Los compuestos de la presente invención pueden mezclarse con vehículos o excipientes farmacéuticos convencionales y usarse en forma de comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, cremas y similares. Los compuestos de la presente invención también pueden ser mezclados con otros agentes y antibióticos terapéuticos, como se ha explicado aquí. Las composiciones que comprenden un compuesto de la presente invención contendrán desde alrededor del 0,1 hasta alrededor del 90 % en peso del compuesto activo, y más generalmente desde alrededor del 10 a alrededor del 30 %.

Las composiciones de la invención puede administrarse mediante sistemas de suministro de liberación controlada (por ejemplo, cápsulas) o sostenida (por ejemplo, matrices bioerodibles). En las patentes estadounidenses números 4.452.775 (concedida a Kent), 5.239.660 (concedida a Leonard), 3.854.480 (concedida a Zaffaroni) se describen ejemplos de sistemas de suministro de liberación retardada para la administración de fármacos que son adecuados para la administración de las composiciones de la invención.

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

Los aglutinantes de comprimidos que se pueden incluir son acacia, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona (Povidone), hidroxipropil metilcelulosa, sacarosa, almidón y etilcelulosa.

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

También pueden usarse agentes saborizantes como menta, esencia de gaulteria, saborizante de cereza o similares. También puede ser conveniente añadir un agente colorante para que su presentación sea más estética en su apariencia o para ayudar a identificar el producto.

Para uso oral, son especialmente útiles las formulaciones sólidas como los comprimidos y cápsulas. También se pueden concebir preparaciones de liberación sostenida o con cubierta entérica. En otro modo de realización, los daptomicina cristalina pueden suministrarse en combinación con una composición de vehículo que aumente la disponibilidad oral de la daptomicina. En un modo de realización preferido, el lipopéptido cristalino o similar al cristal es daptomicina. Para usos pediátricos o geriátricos, las suspensiones, los jarabes y los comprimidos masticables son especialmente convenientes. Para administración oral, las composiciones farmacéuticas se encuentran en forma de, por ejemplo, comprimido, cápsula, suspensión o líquido. La composición farmacéutica se realiza preferiblemente en forma de unidad de dosis que contenga una cantidad terapéuticamente efectiva del ingrediente activo. Son ejemplos de esas unidades de dosis los comprimidos y cápsulas. Para fines terapéuticos, los comprimidos y cápsulas pueden contener, además del ingrediente activo, vehículos convencionales como aglutinantes, por ejemplo, goma arábiga, gelatina, polivinilpirrolidona, sorbitol, o tragacanto; llenadores, por ejemplo, fosfato cálcico, glicina, lactosa, almidón de maíz, sorbitol, o sacarosa; lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, polietilenglicol, sílice, o talco; desintegrantes, por ejemplo, fécula de patata, agentes saborizantes o colorantes, o agentes humectantes aceptables. Las preparaciones líquidas orales se encuentran generalmente en forma de soluciones acuosas u oleosas, suspensiones, emulsiones, jarabes o elixires que pueden contener aditivos convencionales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes no acuosos, conservantes, agentes colorantes y agentes saborizantes. Las preparaciones líquidas orales pueden comprender micelas de lipopéptidos o formas monoméricas del lipopéptido. Los ejemplos de aditivos para preparaciones líquidas incluyen acacia, aceite de almendra, alcohol etílico, aceite de coco fraccionado, gelatina, jarabe de glucosa, glicerina, grasas comestibles hidrogenadas, lecitina, metilcelulosa, para-hidroxibenzoato de metilo o de propilo, propilenglicol, sorbitol, o ácido sórbico.

Para uso intravenoso (IV), una forma soluble en agua de un compuesto de la presente invención puede ser disuelta en cualquiera de los fluidos intravenosos utilizados comúnmente y administrada por infusión. Las formulaciones intravenosas pueden incluir vehículos, excipientes o estabilizantes incluyendo, sin carácter limitativo, calcio, albúmina sérica humana, citrato, acetato, cloruro de calcio, carbonato, y otras sales. Los fluidos intravenosos incluyen, sin carácter limitativo, suero fisiológico, o solución de Ringer. La daptomicina u otros lipopéptidos también pueden colocarse en inyectores, cánulas, catéteres y vías.

Las formulaciones para administración parenteral pueden presentarse en forma de soluciones o suspensiones isotónicas estériles de inyección acuosas o no acuosas. Estas soluciones o suspensiones pueden prepararse a partir de polvos o gránulos estériles que contengan uno o más de los vehículos mencionados para su uso en las formulaciones para administración oral. Los daptomicina cristalina pueden ser disueltos en polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, alcohol bencílico, cloruro sódico y/o varios amortiguadores. Para preparaciones intramusculares, parenterales o intravenosas, puede disolverse una formulación estéril de un compuesto de lipopéptido cristalino o similar al cristal o una forma salina soluble del compuesto adecuada, por ejemplo, sal de hidrocloreto, y administrarse en un diluyente farmacéutico, como agua para inyectables (WFI), suero fisiológico o glucosa al 5 %. También puede prepararse una forma insoluble adecuada del lipopéptido cristalino o similar al cristal y administrarse como una suspensión en una base acuosa o una base de aceite farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un éster de ácidos grasos de cadena larga como oleato de etilo.

Las formas de depósito inyectables pueden fabricarse formando matrices microencapsuladas del lipopéptido cristalino o similar al cristal en polímeros biodegradables, como poliláctico-poliglicólico. Según la proporción de fármaco por polímero y la naturaleza del polímero concreto utilizado, se puede controlar la tasa de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli (ortoésteres) y poli(anhídridos). Las

formulaciones de depósito inyectables también se preparan atrapando el fármaco en microemulsiones que son compatibles con los tejidos orgánicos.

5 Para uso tópico, los compuestos de la presente invención también pueden prepararse en formas adecuadas para su aplicación en la piel, o membranas mucosas de la nariz y garganta, y pueden presentar la forma de cremas, ungüentos, pulverizadores líquidos o inhalantes, pastillas o pinturas de garganta. Estas formulaciones tópicas pueden incluir también compuestos químicos como dimetilsulfóxido (DMSO) para facilitar la penetración superficial del ingrediente activo. Para las preparaciones tópicas, puede administrarse una formulación estéril que contenga un lipopéptido cristalino o similar al cristal, como la daptomicina cristalina, una forma salina adecuada de los mismos, en crema, ungüento, pulverizador u otros apósitos tópicos. Las preparaciones tópicas también pueden presentarse en forma de vendajes que hayan sido impregnados con una composición de lipopéptido.

10 Para su aplicación en los ojos u oídos, los compuestos de la presente invención pueden presentarse en forma líquida o semilíquida formulados en bases hidrofóbicas o hidrofílicas como ungüentos, cremas, lociones, pinturas o polvos.

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

20 Para preparaciones en aerosol, puede usarse una formulación estéril de lipopéptido cristalino o similar al cristal o una forma salina del compuesto en inhaladores, como inhaladores de dosis medida, o nebulizadores. Las formas en aerosol pueden ser especialmente útiles para tratar infecciones respiratorias, como la neumonía e infecciones sinusales.

25 Alternativamente, los compuestos de la presente invención pueden estar en forma cristalina o similar al cristal en polvo para su reconstitución en el vehículo apropiado y farmacéuticamente aceptable en el momento de la administración. En otro modo de realización, la forma de dosificación de unidad del compuesto puede ser una solución del compuesto o una sal del mismo en un diluyente adecuado en ampollas estériles y herméticamente selladas. La concentración del compuesto en la dosificación de unidad puede variar, de un 1 por ciento aproximadamente a un 50 por ciento aproximadamente, dependiendo del compuesto utilizado y su solubilidad y la dosis deseada por el médico. Si las composiciones contienen unidades de dosificación, cada unidad de dosificación contiene preferentemente alrededor de 10-5000 mg del material activo, más preferentemente de 50 a 1000 mg, y aún más preferentemente de 100 a 500 mg. Para el tratamiento de adultos, la dosis empleada oscila preferentemente entre 100 mg y 3 g, al día, dependiendo de la vía y frecuencia de la administración.

30 También se divulga un método de tratamiento de una infección causada por una bacteria Gram positiva en un sujeto. En un aspecto, el método puede utilizarse para tratar una infección causada por una bacteria Gram positiva. El término "tratamiento" se define como la administración, a un sujeto, de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención tanto para prevenir la incidencia de una infección como para controlar o eliminar una infección, por ejemplo, una infección establecida. El término "sujeto", como aquí se describe, se define como un mamífero, una planta o un cultivo celular. Según el uso que aquí se realiza, la frase "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de daptomicina o lipopéptido relacionado con la daptomicina u otro lipopéptido antibacteriano de acuerdo con la presente invención que previene el comienzo, alivia los síntomas, o frena la progresión de una infección bacteriana. En un aspecto, el sujeto es un paciente humano u animal que necesita un tratamiento de lipopéptido. Una infección establecida puede ser una que es aguda o crónica. Una dosis efectiva es generalmente entre alrededor de 0,1 y alrededor de 75 mg/kg de lipopéptido cristalino o similar al cristal, como la daptomicina cristalina o similar al cristal o un lipopéptido relacionado con la daptomicina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Se prefiere una dosis de alrededor de 1 a alrededor de 25 mg/kg de daptomicina cristalina o similar al cristal o de un lipopéptido relacionado con la daptomicina o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Se prefiere más una dosis de alrededor de 1 a 12 mg/kg de daptomicina cristalina o similar al cristal, un lipopéptido cristalino, o similar al cristal, relacionado con la daptomicina o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Se prefiere aún más una dosis de alrededor de 3 a 8 mg/kg de daptomicina cristalina o similar al cristal o un lipopéptido relacionado con la daptomicina o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Se describe un ejemplo de procedimiento para el suministro de un agente antibacteriano en la patente estadounidense de nº 5.041.567, concedido a Rogers y en la publicación internacional PTC WO 95/05384.

35 El lipopéptido cristalino o similar al cristal, por ejemplo, la daptomicina, puede administrarse como una única dosis al día o en múltiples dosis al día. El régimen de tratamiento puede requerir la administración durante periodos prolongados de tiempo, por ejemplo, durante varios días o de dos a cuatro semanas. La cantidad por dosis administrada o la cantidad total administrada dependerá de factores como la naturaleza y gravedad de la infección, la edad, el estado de salud general del paciente, la tolerancia del paciente al lipopéptido y el microorganismo o microorganismos presentes en la infección. Se revela un método de administración en WO 00/18419, publicado el 6 de abril de 2000.

Los métodos divulgados en el presente documento comprenden administrar un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica del mismo, a un paciente que lo necesita en una cantidad que es eficaz reduciendo o eliminando la infección bacteriana Gram positiva. El lipopéptido puede ser administrado por vía oral, parenteral, por inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, o por un depósito implantado, bomba externa o catéter. El lipopéptido puede prepararse para usos oftalmológicos o en aerosol. Los compuestos de la invención o composiciones farmacéuticas del mismo pueden ser inyectados directamente o administrados en un absceso, ventrículo o articulación. La administración parenteral incluye la inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, cisternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. En un aspecto preferido, la daptomicina cristalina o similar al cristal, el lipopéptido relacionado con la daptomicina u otro lipopéptido es administrado por vía intravenosa, subcutánea u oral.

El método divulgado en el presente documento se puede usar para tratar a un paciente que tenga una infección bacteriana en la que la infección se haya causado o agravado por cualquier tipo de bacteria Gram positiva. En un aspecto preferido, la daptomicina cristalina o similar al cristal, el lipopéptido relacionado con la daptomicina u otro lipopéptido, o composición farmacéutica de los mismos, se administran a un paciente según los métodos divulgados en el presente documento. En otro aspecto, la infección bacteriana puede causarse o agravarse por bacterias incluyendo, sin carácter limitativo, estafilococos resistentes a la meticilina y susceptibles a la meticilina (incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, y estafilococos coagulasa negativos), *Staphylococcus aureus* susceptible a escala intermedia al glicopéptido (GISA), estreptococos susceptibles a la penicilina y resistentes a la penicilina (incluyendo *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus sanguis* y estreptococos del grupo C, estreptococos del grupo G y estreptococos del grupo viridans), enterococos (incluyendo cepas resistentes a la vancomicina y susceptibles a la vancomicina como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*), *Clostridium difficile*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium perfringens*, *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 prevotti*, *Peptostreptococcus productus*, *Propionibacterium acnes*, y *Actinomyces spp.*

La actividad antibacteriana de la daptomicina frente a las cepas clásicamente "resistentes" es comparable a la actividad frente a las cepas clásicamente "susceptibles" en experimentos *in vitro*. Además, el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la daptomicina frente a cepas susceptibles es normalmente cuatro veces menor que el de la vancomicina. Por lo tanto, en un aspecto preferido, un compuesto de la invención o una composición farmacéutica de cualquiera de estos daptomicina cristalina son administrados según los métodos divulgados en el presente documento a un paciente que presenta una infección bacteriana resistente a otros antibióticos, incluyendo la vancomicina. Además, a diferencia de los antibióticos glicopéptidos, la daptomicina presenta una actividad bactericida frente a organismos Gram positivos rápida y dependiente de la concentración. Por ello, en un aspecto preferido, los compuestos de la invención o una composición farmacéutica de cualquiera de estos daptomicina cristalina son administrados según los métodos divulgados en el presente documento a un paciente que necesita una terapia antibiótica de rápida actuación.

El método divulgado en el presente documento puede usarse para infecciones bacterianas Gram positivas de cualquier órgano o tejido en el cuerpo. Estos órganos o tejidos incluyen, sin carácter limitativo, el músculo esquelético, la piel, el flujo sanguíneo, los riñones, el corazón, el pulmón y el hueso. El método divulgado en el presente documento puede usarse para tratar, sin carácter limitativo, infecciones de la piel y los tejidos blandos, bacteremia e infecciones del tracto urinario. El método puede usarse para tratar infecciones respiratorias comunitarias, incluyendo, sin carácter limitativo, otitis media, sinusitis, bronquitis crónica y neumonía, incluyendo la neumonía causada por *Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus influenzae* resistentes a los fármacos. El método divulgado en el presente documento puede utilizarse también para tratar infecciones mixtas que comprenden diferentes tipos de bacterias Gram positivas, incluyendo bacterias aerobias, capnofílicas o anaerobias. Estos tipos de infecciones incluyen infecciones intraabdominales, neumonía, infecciones óseas y articulares e infecciones obstétricas y ginecológicas. El método divulgado en el presente documento también puede usarse para tratar una infección incluyendo, sin carácter limitativo, endocarditis, nefritis, artritis séptica y osteomielitis. En un aspecto preferido, cualquiera de las enfermedades descritas arriba puede tratarse mediante daptomicina cristalina o similar al cristal, un lipopéptido relacionado con la daptomicina, un lipopéptido antibacteriano, o composiciones farmacéuticas de cualquiera de estos lipopéptidos cristalinos o similares al cristal.

La daptomicina cristalina o similar al cristal, los lipopéptidos relacionados con la daptomicina u otro lipopéptido pueden ser administrados en la dieta o alimentación de un paciente o animal. Si se administra como parte de una ingesta alimentaria total, la cantidad de daptomicina u otro lipopéptido puede ser menos del 1 % en peso de la dieta y preferentemente no superior del 0,5 % en peso. La dieta para animales puede ser alimentos normales a los que se pueda añadir daptomicina u otro lipopéptido o puede añadirse a una premezcla.

El método divulgado en el presente documento también se puede emplear mientras se administra simultáneamente otra forma de daptomicina u otro antibiótico lipopéptido, por ejemplo, una que no sea cristalina o similar al cristal, o con uno o más agentes antimicóticos, y/o uno o más antibióticos distintos a la daptomicina cristalina o similar al cristal u otros antibióticos lipopéptidos cristalinos o similares al cristal. La coadministración de un agente antimicótico y un antibiótico diferente a la daptomicina cristalina o similar al cristal u otro antibiótico lipopéptido puede resultar útil para infecciones mixtas como las causadas por diferentes tipos de bacterias Gram positivas, o aquellas causadas por ambos bacterias y hongos. Además, la daptomicina cristalina o similar al cristal u otro antibiótico lipopéptido pueden aumentar el perfil de toxicidad de uno o más de los antibióticos coadministrados. Se ha demostrado que la administración de daptomicina y un aminoglucósido puede mejorar la toxicidad renal producida por el aminoglucósido. En un aspecto preferido, el agente antibiótico y/o antimicótico puede administrarse simultáneamente con un compuesto de la presente invención, o una composición farmacéutica que contenga un compuesto de la presente invención.

Los agentes antibacterianos y clases de los mismos que pueden ser coadministrados con un compuesto de la presente invención incluyen, sin carácter limitativo, penicilinas y fármacos relacionados, carbapenems, cefalosporinas y fármacos relacionados, aminoglucósidos, bacitracina, gramicidina, mupirocina, cloranfenicol, tiamfenicol, fusidato de sodio, lincomicina, clindamicina, macrólidos, novobiocina, polimixinas, rifamicinas, espectinomicina, tetraciclina, vancomicina, teicoplanina, estreptograminas, agentes antifolato incluyendo sulfonamidas, trimetoprim, y sus combinaciones y pyrimethamine, antibacterianos sintéticos incluyendo nitrofuranos, mandelato de metenamina e hipurato de metenamina, nitroimidazoles, quinolonas, fluoroquinolonas, isoniazida, etambutol, pirazinamida, ácido paraaminosalicílico (PAS), cicloserina, capreomicina, etionamida, protionamida, thiacetazone, viomicina, everminomicina, glicopéptido, glycylicline, ketolidos, oxazolidinone; imipenen, amikacin, netilmicina, fosfomicina, gentamicina, ceftriaxona, Ziracin, LY 333328, CL 331002, HMR 3647, Linezolid, Synercid, Aztreonam, y Metronidazole, Epiroprim, OCA_983, GV_143253, Senfetrinem sodium, CS_834, Bispenem, A_99058.1, A_165600, A_179796, KA 159, Dinemicina A (Dynemicin A), DX8739, DU 6681; Cefluprenam, ER 35786, Cefoselis, Sanfetrinem celexetil, HPG_31, Cefpirome, HMR_3647, RU_59863, Mersacidin, KP 736, Rifalazil; Kosan, AM 1732, MEN 10700, Lenapenem, BO 2502A, NE_1530, PR 39, K130, OPC 20000, OPC 2045, Veneprem, PD 138312, PD 140248, CP 111905, Sulopenem, ritipenam acoxyl, RO_65_5788, Cyclothialidine, Sch_40832, SEP_132613, Micacocidina A, SB_275833, SR_15402, SUN A0026, TOC 39, carumonam, Cefozopran, Cefetamet pivoxil, y T 3811.

En un aspecto preferido, los agentes antibacterianos que pueden coadministrarse con un compuesto de acuerdo con la presente invención incluyen, sin carácter limitativo, imipenen, amikacin, netilmicina, fosfomicina, gentamicina, ceftriaxona, teicoplanina, Ziracin, LY 333328, CL 331002, HMR 3647, linezolid, Synercid, aztreonam, y metronidazol.

Los agentes antimicóticos que pueden ser coadministrados con un compuesto de acuerdo con la presente invención incluyen, sin carácter limitativo, Caspofungin, Voriconazole, Sertaconazole, IB_367, FK_463, LY_303366, Sch_56592, Sitafloxacin, poliénicos DB_289, como Amphotericin, Nystatin, Primaricin; azoles, como Fluconazol, Itraconazol, y Ketoconazol, alilaminas, como Naftifina y Terbinafina; y antimetabolitos como Flucytosine. Otros agentes antimicóticos incluyen, sin carácter limitativo, aquellos descritos en Fostel et al., Drug Discovery Today 5:25-32 (2000). Fostel et al. divulga compuestos antimicóticos incluyendo Corynecandin, Mer_WF3010, Fusacandin, Artrichitin/LL 15G256, Sordarinas, Cispentacina, Azoxybacillin, Aureobasidina y Khafrefungin.

Los compuestos de la presente invención o una composición farmacéutica de uno o más de cualquiera de los lipopéptidos cristalinos o similares al cristal, puede administrarse según este método hasta que la infección bacteriana sea erradicada o reducida. En un aspecto, el lipopéptido cristalino o similar al cristal es administrado durante un periodo de tiempo de aproximadamente 3 días a aproximadamente 6 meses. En un aspecto preferido, el lipopéptido cristalino o similar al cristal es administrado de 7 a 56 días. En un aspecto más preferido, el lipopéptido cristalino o similar al cristal es administrado de 7 a 28 días. En un aspecto aún más preferido, el lipopéptido cristalino o similar al cristal es administrado de 7 a 14 días. El lipopéptido cristalino o similar al cristal puede administrarse durante un periodo de tiempo más corto o más largo si así se desea. En un aspecto preferido, el lipopéptido es daptomicina o un lipopéptido relacionado con la daptomicina.

Para que esta invención se comprenda más en detalle, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se presentan a modo ilustrativo exclusivamente y no deben interpretarse como un límite al alcance de la invención en modo alguno.

EJEMPLO 1 (Ejemplo de referencia)

Se preparó la daptomicina mediante técnicas convencionales. La preparación de daptomicina era un polvo amorfo amarillo pálido con una solubilidad a 25 °C superior a 1g/mL en agua y una solubilidad de 2,8 g/mL en etanol. La preparación de daptomicina amorfa era higroscópica y descompuesta a 215 °C.

Los ejemplos restantes describen la cristalización o precipitación de lipopéptidos en presencia o ausencia de un precipitante orgánico (por ejemplo, PEG).

EJEMPLO 2 (Ejemplo de referencia)

5 En una cristalización por micro lotes (microbatch), se mezclaron consecutivamente 25µL de una solución madre de daptomicina (20mg/mL en metanol) con 15 µL de solución madre de reactivo (200 mM de acetato de calcio, 0,1 M de cacodilato (pH 6,5), 18 % [p/v] de PEG 8000 y 15 µL de etilenglicol) para dar una solución que era un 27,59 % de componente acuoso, un 45 % de metanol y un 27,5 % de etilenglicol. Se formaron cristales con forma de erizo con un rendimiento del 50 % y una pureza del 98 % medido mediante HPLC.

EJEMPLO 3 (Ejemplo de referencia)

10 Se preparó una solución madre de daptomicina disolviendo 440 mg de daptomicina en 1 mL de un amortiguador que contenía 25 mM de acetato sódico (pH 5,0) y 5 mM de CaCl₂. Se realizó la cristalización mediante el método de difusión de vapor (gota colgante), en el que se añadió 5 µL de la solución madre de daptomicina a 5 µL de 0,1 M de citrato trisódico dihidratado (pH 5,6), y 35 % [v/v] de terc-butanol en agua para formar una gota. La gota fue suspendida sobre una solución de reservorio (0,1 M de citrato trisódico dehidratado (pH 5,6), 35 % [v/v] de terc-butanol en agua) en un entorno hermético hasta que se produce la cristalización. Este método produjo cristales de daptomicina con forma de erizo. Véase, por ejemplo, Fig. 2.

EJEMPLO 4 (Ejemplo de referencia)

20 5 µL de una solución madre de daptomicina preparada como se indica en el Ejemplo 3 fue añadida a 5 µL de una solución que contenía 0,1 M de cacodilato de sodio (pH 6,5), 0,2 M de acetato de calcio y 9 % [p/v] de PEG 8000. Se realizó la cristalización mediante el método de difusión en vapor descrito en el Ejemplo 3. Este método produjo cristales de daptomicina con forma de aguja. Véase, por ejemplo, Fig. 3.

EJEMPLO 5 (Ejemplo de referencia)

25 5 µL de una solución madre de daptomicina preparada como se indica en el Ejemplo 3 fue añadida a 5µL de una solución de 0,1 M de cacodilato de sodio (pH 6,5), 0,2 M de acetato de zinc y 9 % [p/v] de PEG 8000 que contenía 0,1 µL de benzamidina para dar una concentración final de daptomicina de 220 mg/mL. Se realizó la cristalización mediante el método de difusión en vapor descrito en el Ejemplo 3. Este método produjo cristales de daptomicina con forma de barra. Véase, por ejemplo, Fig.4.

EJEMPLO 6 (Ejemplo de referencia)

35 Un mL de daptomicina (97,1 % de pureza determinado mediante HPLC) a una concentración en agua de 20-25 mg/mL fue mezclado consecutivamente con 231 µL de agua, 77 µL de acetato de calcio (pH 6,0), 960 µL de propilenglicol y 231 µL de 50 % [p/v] de PEG 4000. La solución se deja reposar 4-5 horas a 4 °C. Se formaron cristales con forma de erizo con un rendimiento del 75 %. Se lavó la daptomicina cristalina con isopropanol. La daptomicina tenía una pureza del 98,4 % según HPLC.

EJEMPLO 7 (Ejemplo de referencia)

40 La daptomicina (200 mg, pureza del 97,1 %) fue disuelta en 2,54 mL de agua. La solución de daptomicina fue mezclada en orden y consecutivamente con 10,0 mL de metanol, 0,78 mL de 1M de acetato de calcio (pH 6,0), 9,50 mL de propilenglicol y 2,20 mL de 50 % [p/v] de PEG 4000 para dar un volumen final de 25,02 mL. La mezcla fue removida a temperatura ambiente durante 10-14 horas en un mezclador de sangre (Fischer). Los cristales empezaron a aparecer a las pocas horas. El rendimiento final fue de aproximadamente el 70-80 % después de 14 horas. Los cristales fueron recolectados por centrifugación a 1000 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los cristales en 12,5 mL de isopropanol. Se transfirió la suspensión de daptomicina a una columna (Biorad) y se eliminó el isopropanol dejándolo gotear por la gravedad. Se secaron los cristales mediante una corriente de nitrógeno. Durante el procedimiento de secado se rompe cualquier trozo para obtener una muestra seca homogénea. Los cristales preparados por este método presentaban forma de erizo y tenían una pureza del 98,37 %.

EJEMPLO 8 (Ejemplo de referencia)

50 La daptomicina se cristalizó según el Ejemplo 7, excepto que se usó PEG 8000 en lugar de PEG 4000. Las cantidades de reactivos utilizadas son idénticas a las del Ejemplo 7. Los cristales preparados por este método tenían forma de erizo y tenían una pureza del 98,84 %.

EJEMPLO 9 (Ejemplo de referencia)

65 Se analizó la cristalinidad de dos muestras de daptomicina preparadas según el Ejemplo 7 y una muestra amorfa utilizando el test de cristalinidad USP <695>. Se colocaron las partículas de daptomicina en aceite mineral en un portaobjetos de vidrio y después se examinaron mediante microscopía de luz polarizada (PLM). Se determinó que

las partículas eran cristalinas si eran birrefringentes (tenían colores de interferencia) y tenían posiciones de extinción al rotar la platina.

5 La muestra de daptomicina amorfa estaba compuesta de partículas escamosas y similares al encaje (lacy) que no eran birrefringentes. Había algunas áreas similares a la plata en algunos de las escamas que tenían una birrefringencia débil, pero las partículas eran principalmente amorfas. En cambio, las muestras de daptomicina preparadas según el Ejemplo 7 estaban compuestas de partículas policristalinas con una birrefringencia débil y alguna extinción, lo que indicaba que eran fundamentalmente cristalinas. Véase, por ejemplo, Fig. 5.

10 **EJEMPLO 10 (Ejemplo de referencia)**

Se analizó la cristalinidad de dos muestras de daptomicina preparadas según el Ejemplo 7 y una muestra amorfa mediante difracción de rayos X de polvo. Se analizaron las muestras en una Difractómetro de polvo automático Siemens D500 (ORS 1D nº LD-301-4), que fue manejado según el Procedimiento Operativo Estándar (Standard Operation Procedure) ORS EQ-27 Rev. 9. El difractómetro contaba con un monocromador de grafito y una fuente de rayos X: Cu ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) funcionando a 50 kV, 40 mA. Se llevó a cabo la calibración dos-theta (θ) usando un estándar de mica NBS (SRM675). Las muestras fueron analizadas utilizando los siguientes parámetros del instrumento:

20 Rango de medición para 2θ (grados) 4,0 -40,0
 Amplitud del paso (grados) 0,05
 Tiempo de medición por paso (seg) 1,2
 Aperturas del haz $1(1^\circ)$, $2(1^\circ)$, $3(1^\circ)$, $4(0,15^\circ)$, $5(0,15^\circ)$

25 La preparación de muestra se llevó a cabo según el Procedimiento Operativo Estándar ORS MIC-7 Rev.1 utilizando una placa de fondo cero.

30 Todas las muestras se realizaron mediante una fuente de rayos X: Cu ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$). La muestra de daptomicina amorfa no mostró picos por difracción de rayos X de polvo. Véase Fig. 6. En cambio, las dos muestras de daptomicina mostraron picos por difracción de rayos X de polvo. El ángulo de difracción (2θ) de la primera muestra de daptomicina (Fig. 7) era 19,225, 23,242, 23,427 y 23,603 (grados). El ángulo de difracción (2θ) de la segunda muestra de daptomicina (Fig. 8) era 10,966, 19,205 y 23,344 (grados). La primera muestra de daptomicina cristalina también mostró un pequeño pico entre $10-11^\circ$. Véase Fig. 7.

35 **EJEMPLO 11 (Ejemplo de referencia)**

Se disolvió daptomicina en agua. Se añadió acetato sódico para lograr una concentración final de 187 mM. Se añadió cloruro de calcio para lograr una concentración final de 28 mM. Se mezcló la solución de daptomicina y se añadió isopropanol para una concentración final del 78,4 %. La solución fue mezclada e incubada. Tras la incubación, se formó un material precipitado. El material precipitado parecía ser cristales en forma de erizo de aproximadamente $60 \mu\text{m}$ de diámetro por microscopía óptica. Después, se secó el material. El material seco contenía aproximadamente un 30-40 % de sal. Tras el secado, se llevó a cabo una difracción de rayos X de polvo. La difracción de rayos X de polvo no mostró la presencia de cristales en el precipitado de daptomicina seco.

45 **EJEMPLO 12 (Ejemplo de referencia)**

Se añadió un gramo de daptomicina (de una pureza de aproximadamente 91,5 % medida por HPLC) a 16,8 mL de agua destilada y se disolvió. Se añadió 2,5 mL de 1M de acetato de calcio (pH 6,1) y 60 mL de isopropanol. Se colocó la solución en un baño de agua a 27°C , y se permitió que se equilibrara con la temperatura del baño de agua. Se añadió lentamente 5 mL de alícuotas de isopropanol hasta que la solución se volvió turbia (un total de aproximadamente 30 mL de isopropanol). La solución fue incubada durante la noche a 27°C para formar un precipitado. El precipitado parecía contener cristales con forma de erizo de aproximadamente $60 \mu\text{m}$ de diámetro por microscopía óptica. Véase Figura 2.

55 Se vertió el precipitado de daptomicina en un embudo de filtro de presión / de secado y fue filtrado por gravedad. Se lavó el precipitado dos veces con 25 mL cada vez de solución de lavado (80 % de isopropanol y 20 % de solución A, donde la solución A consiste en 18 mL de agua y 2 mL de ácido acético glacial) y se dejó gotear por gravedad durante la noche. Después, se transfirió el precipitado a un desecador y se secó al vacío. Tras el secado, se realizó una difracción de rayos X de polvo. La difracción de rayos X de polvo no demostró la presencia de cristales en el precipitado de daptomicina seco. Sin embargo, un análisis de la pureza del material precipitado mediante HPLC demostró que el material era daptomicina con una pureza del 98,2 %. Apreciablemente, la preparación de daptomicina tras la precipitación contenía significativamente menos anhídrido-daptomicina que la preparación de daptomicina previa a la precipitación.

65 Sin entrar en discusiones técnicas, los solicitantes creen que las condiciones utilizadas para precipitar la daptomicina en los Ejemplos 11 y 12 sí producen una forma cristalina de daptomicina, pero que las fases posteriores de lavado y secado provocan que la daptomicina cristalina vuelva a una forma no cristalina. No obstante, la daptomicina no

crystalina todavía es similar al cristal como se muestra en la Figura 3 mediante la birrefringencia de una muestra de cristal en luz polarizada.

EJEMPLO 13

5 Se lleva a cabo una fermentación controlada de alimentación de ácido decanoico de un cultivo de fermentación de cepa de *S. roseosporus* NRRL 15998 a niveles que optimizan la producción del antibiótico al tiempo que minimizan la producción de contaminantes. Se mide la alimentación de ácido decanoico residual mediante cromatografía de gases y el nivel residual deseado es 10 ppm de ácido decanoico desde el principio de la inducción (aproximadamente en la hora 30) hasta la recolección. Se utiliza la centrifugación del cultivo y el análisis subsiguiente del caldo clarificado para medir la producción de daptomicina mediante HPLC. El patrón de recolección se sitúa normalmente entre 1,0 y 3,0 gramos por litro del caldo de fermentación.

15 El cultivo de fermentación es recolectado mediante microfiltración utilizando un Pall-Sep o un sistema de microfiltración equivalente, o mediante centrifugación a escala industrial y filtro de profundidad. Se aplica el caldo clarificado a una resina de intercambio aniónico, Mitsubishi FP-DA 13, se lava con 30 mM de NaCl a pH 6,5 y se eluye con 300 mM de NaCl a pH 6,0-6,5. Alternativamente, se lava la columna FP-DA 13 con 30 mM de NaCl a pH 6,5 y se eluye con 300 mM de NaCl a pH 6,0-6,5. Se ajusta el pH a 3,0-4,8 y se ajusta la temperatura a 2-15 °C. En estas condiciones, la daptomicina forma una micela. La solución de daptomicina micelar es filtrada-lavada utilizando un ultrafiltro 10.000 NMW (ultrafiltro de fibra hueca AG Technology Corp. O equivalente) en cualquier configuración. Las micelas de daptomicina son retenidas por el filtro, pero se elimina un gran número de impurezas puesto que pasan a través del filtro 10.000 NMW. La ultrafiltración de las micelas de daptomicina aumenta la pureza de la daptomicina a un 80-90 % aproximadamente.

25 La preparación de daptomicina es entonces cristalizada o precipitada en condiciones estériles mediante alguno de los métodos arriba descritos. En un modo de realización preferido, la daptomicina es cristalizada o precipitada según el protocolo descrito en los Ejemplos 7, 8 o 12, excepto que puede aumentarse para preparaciones más grandes de daptomicina. La daptomicina cristalina o similar al cristal es separada de la solución de cristalización/precipitación mediante filtración, preferentemente mediante filtración al vacío. La daptomicina cristalina o similar al cristal es lavada con solución de lavado (véase el Ejemplo 3). Después, la daptomicina cristalina o similar al cristal es secada al vacío en condiciones estériles usando un secador al vacío de doble cono Klein Hastelloy-B de 0,65 m³ o un aparato equivalente. Después se llenan los viales con 250 o 500 mg de daptomicina cristalina seca por vial. La Figura 9 muestra un diagrama de este método de producción.

35 EJEMPLO 14 (Ejemplo de referencia)

Se lleva a cabo la fermentación de *S. roseosporus* y la microfiltración del cultivo de fermentación y la cromatografía de intercambio aniónico tal y como se describe en el Ejemplo 13. La preparación de daptomicina tiene una pureza de aproximadamente el 35-40 % en este punto. Tras la cromatografía de intercambio aniónico, la daptomicina es cristalizada o precipitada según el protocolo descrito en el Ejemplo 13. Después, la daptomicina es lavada y secada según el protocolo expuesto en el Ejemplo 13. La daptomicina cristalina o similar al cristal seca es entonces utilizada para llenar los viales estériles como se describe en el Ejemplo 13. La Figura 6 muestra un diagrama de este método de producción.

45 EJEMPLO 15 (Ejemplo de referencia)

La fermentación de *S. roseosporus* y la microfiltración del cultivo de fermentación se llevan a cabo como se describe en el Ejemplo 13. Tras la microfiltración, el cultivo de fermentación es sometido a ultrafiltración de exclusión de tamaño como se describe en el Ejemplo 13. La preparación de daptomicina tiene una pureza de aproximadamente un 35-40 % en este punto. Tras la ultrafiltración, la daptomicina es cristalizada o precipitada según el protocolo descrito en el Ejemplo 13. La daptomicina es entonces lavada y secada según el protocolo expuesto en el Ejemplo 13. La daptomicina cristalina o similar al cristal seca se usa entonces para llenar los viales estériles como se describe en el Ejemplo 13. La Figura 7 muestra un diagrama de este método de producción.

55 EJEMPLO 16 (Ejemplo de referencia)

La fermentación de *S. roseosporus* y la microfiltración del cultivo de fermentación se llevan a cabo como se describe en el Ejemplo 13. La preparación de daptomicina tiene una pureza en este punto del 5-10 %. Después de la microfiltración, el cultivo de fermentación es cristalizado o precipitado según el protocolo descrito en el Ejemplo 13. Después, se lava la daptomicina y se seca y se utiliza para llenar los viales estériles como se describe en el Ejemplo 13. La Figura 8 muestra un diagrama de este método de producción.

EJEMPLO 17 (Ejemplo de referencia)

5 El CB-131547 (véase Figura x), un lipopéptido cíclico análogo a la daptomicina, fue preparado por vía de una semisíntesis de la daptomicina. El CB-131547 era un polvo amorfo amarillo pálido, con una solubilidad a 25 °C de ~80 mg/mL en solución salina normal.

10 El CB-131547 (60 mg, ~90 % de pureza) es disuelto en 2,5 mL de agua. La solución de CB-131547 es mezclada consecutivamente en orden con 5,0 mL de metanol, 0,2 mL de 1 M de acetato de calcio, (pH 6,0), 2,5 mL de propilenglicol y 1,0 mL de 50 % [p/v] de PEG 4000 para dar un volumen final de 11,2 mL. Se deja reposar la solución de 4 a 24 horas a 4 °C. Se forman los cristales de CB-131547 a un rendimiento de ~70 % con una pureza de ~98,0 % determinado por HPLC.

EJEMPLO 18 (Ejemplo de referencia)

15 El CB-131547 (véase la Figura x), un lipopéptido cíclico análogo a la daptomicina, fue preparado por vía de una semisíntesis de la daptomicina. El CB-131547 era un polvo amorfo amarillo pálido, con una solubilidad a 25 °C de ~80 mg/mL en solución salina normal.

20 Se disuelve el CB-131547 (60 mg, ~90 % de pureza) en 2,5 mL de agua. Se añade 0,2 mL 1 M de acetato de calcio (pH 6,0) y 8 mL de isopropanol. Se deja que la solución se equilibre a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. Se añade lentamente 1 mL de alícuotas de isopropanol hasta que la solución se vuelve turbia. Se guarda la solución a temperatura ambiente durante la noche para que forme cristales.

25 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y con fines de claridad para la comprensión, será evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones de la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de daptomicina, comprendiendo el método:
 - 5 fermentar *Streptomyces roseosporus* para obtener un cultivo de fermentación que contiene daptomicina; clarificar el cultivo de fermentación por centrifugación, microfiltración o extracción; enriquecer la daptomicina por cromatografía de intercambio aniónico después de clarificar el cultivo de fermentación;
 - 10 someter la daptomicina a ultrafiltración por exclusión de tamaño después de cromatografía de intercambio aniónico;
 - 15 cristalizar la daptomicina; en donde dicha cristalización comprende las etapas de:
 - (a) mezclar daptomicina con una sal que comprende un catión monovalente o divalente, un agente de tamponamiento de pH opcional y un alcohol polihídrico o de bajo peso molecular, en donde dicho alcohol de bajo peso molecular es un compuesto orgánico que contiene al menos un grupo funcional alcohol y ocho átomos de carbono o menos; y
 - (b) permitir que la daptomicina cristalice a partir de la solución en las condiciones de temperatura adecuadas; y
 - 20 recolectar la daptomicina cristalina.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la daptomicina cristalina tiene una pureza de al menos el 95 %.
- 25 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la sal se selecciona de: formiato de magnesio o de sodio, sulfato de amonio, dihidrogenofosfato de amonio, acetato de calcio, acetato de cinc, citrato de tri-sodio dihidrato, acetato de magnesio, acetato de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de cadmio, acetato de amonio, cloruro de sodio y sulfato de litio.
- 30 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la sal comprende un catión de calcio, un catión de magnesio o un catión de manganeso.
- 35 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la sal comprende un catión divalente de calcio.
- 40 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la sal tiene capacidad de tamponamiento.
- 45 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que se selecciona el alcohol de bajo peso molecular o polihídrico de: metanol, isopropanol, terc-butanol, 1,6-hexanodiol, etilenglicol, propilenglicol, glicerol, 1,2-propanodiol, 2-metil-2,4-pentanodiol y 1,4 butanodiol.
- 50 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el alcohol de bajo peso molecular o polihídrico es isopropanol.
- 55 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la daptomicina se cristaliza a partir de una solución que se tampona a pH 5,9 a 6,3.
- 60 10. 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el agente de tamponamiento del pH se selecciona de entre: Tris, fosfato, citrato, HEPES, CHES, acetato de sodio, ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES), borato de sodio, cacodilato de sodio, imidazol y citrato de trisódico dihidrato.
- 65 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el tampón de pH se selecciona entre: acetato de calcio pH 6,1, acetato sódico pH 6,1, cacodilato sódico pH 6,5, citrato trisódico dihidrato pH 5,6, HEPES pH 7,5, imidazol pH 8, MES pH 6,0, acetato de calcio pH 6 y Tris-HCl pH 8,5.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la daptomicina se cristaliza a una temperatura de 0 °C-30 °C.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la daptomicina se cristaliza a una temperatura de 20-30 °C.
14. Una composición que comprende la daptomicina cristalina que tiene una pureza de al menos el 98 % y se produce mediante el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

Figura 1

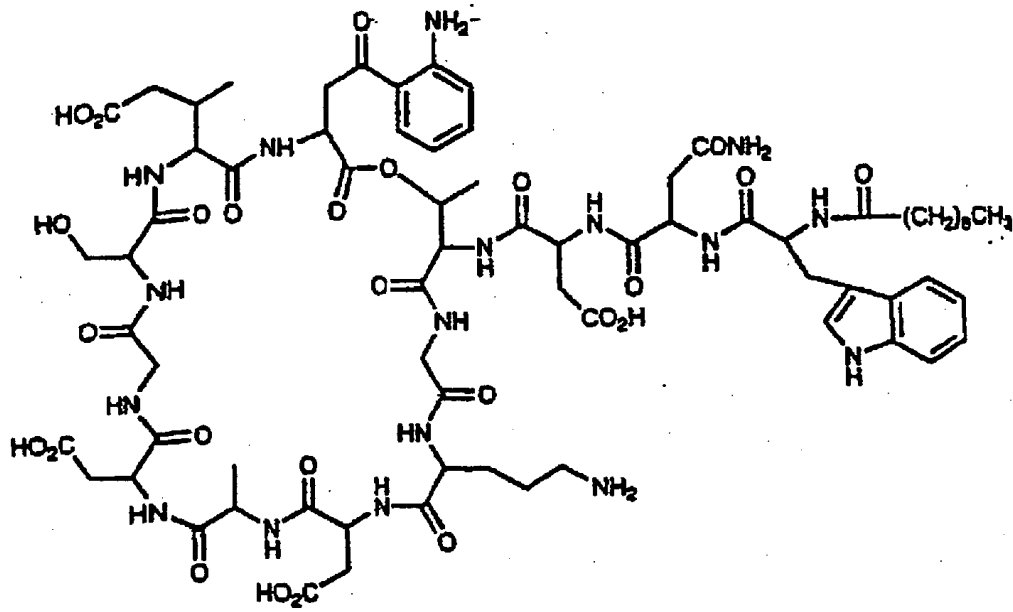


Figura 2

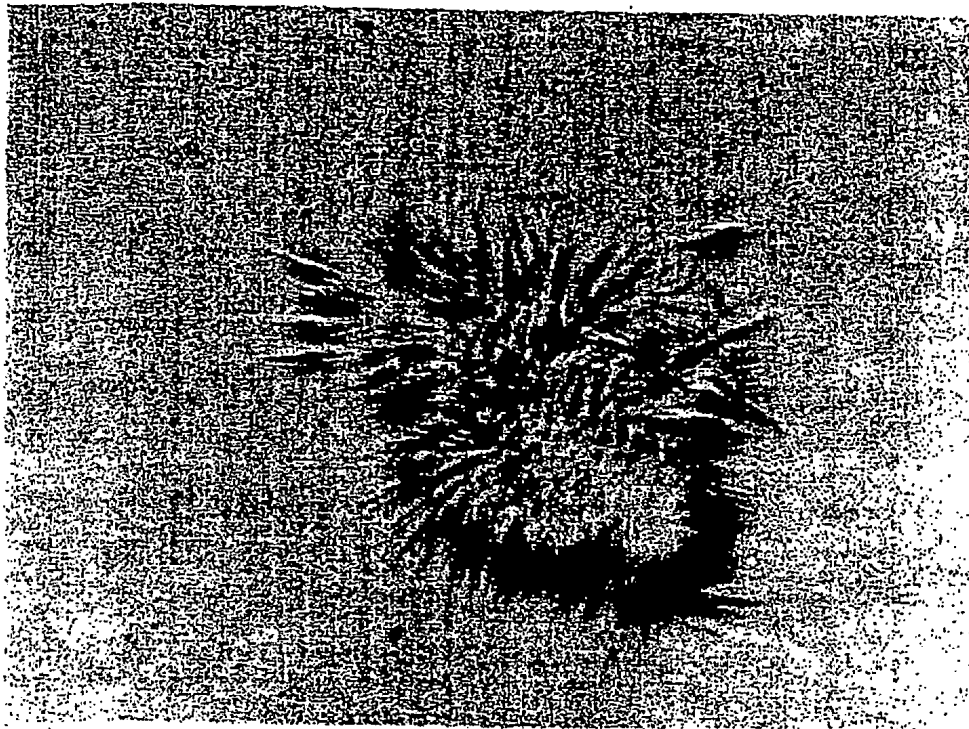


Figura 3

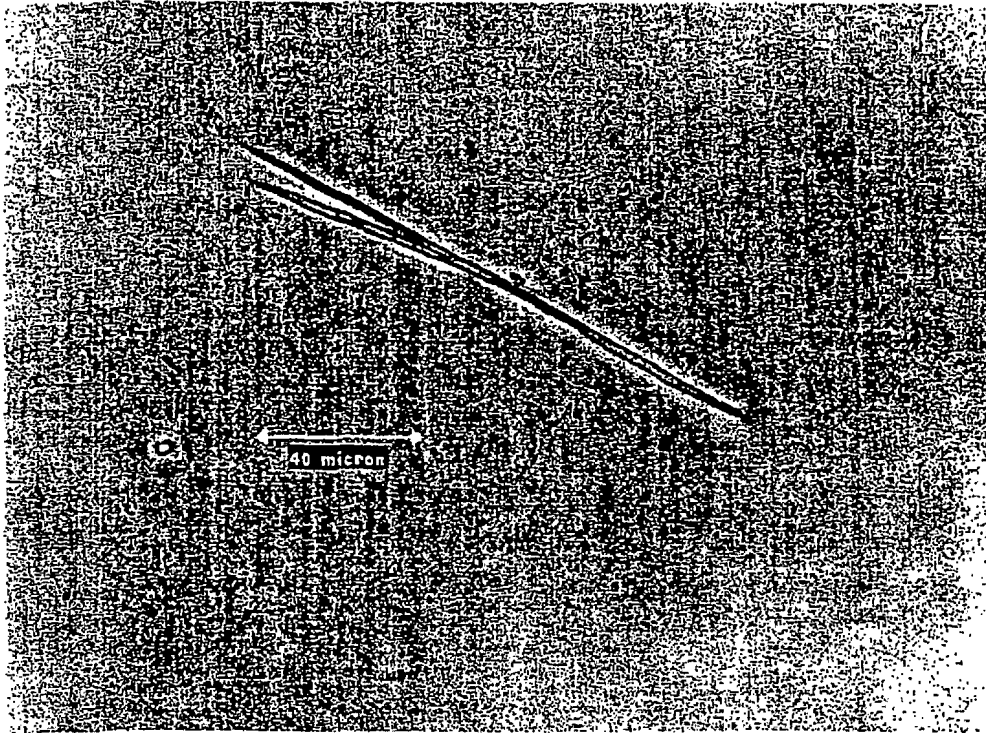


Figura 4

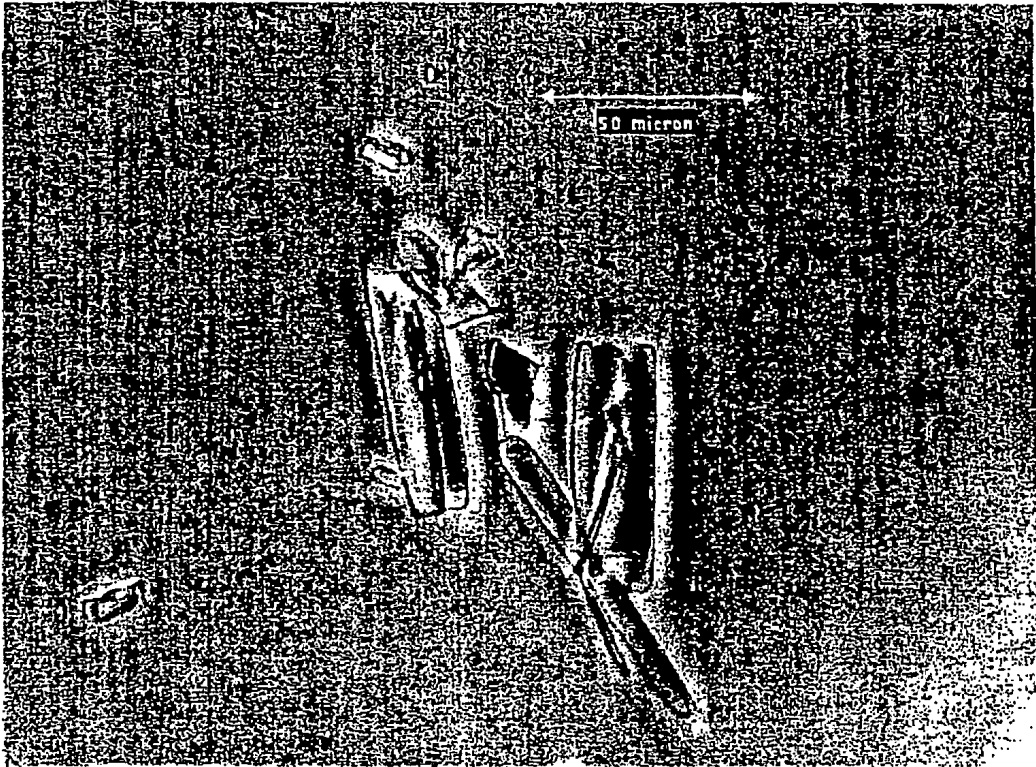


Figura 5

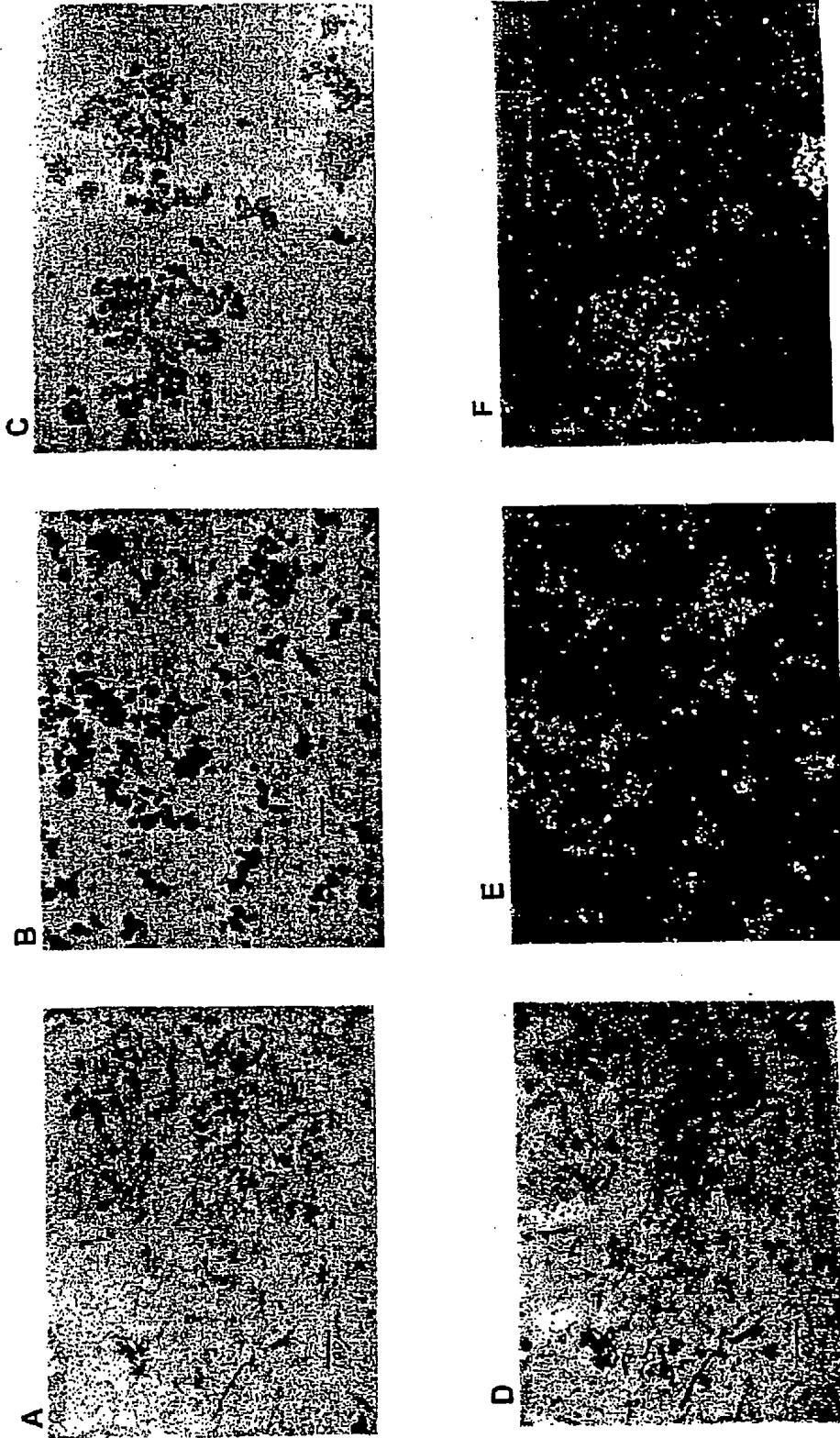


Figura 6

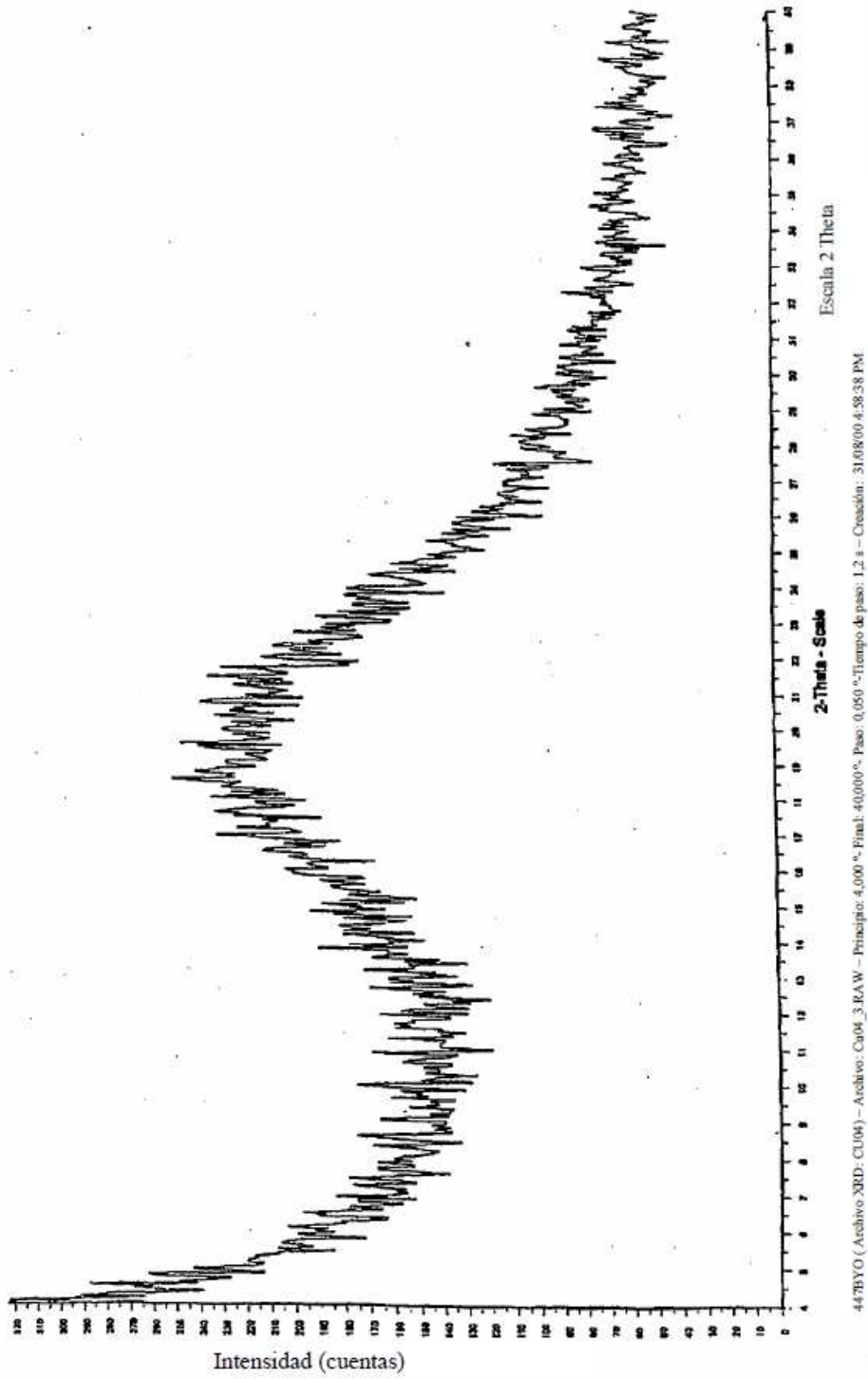


Figura 7

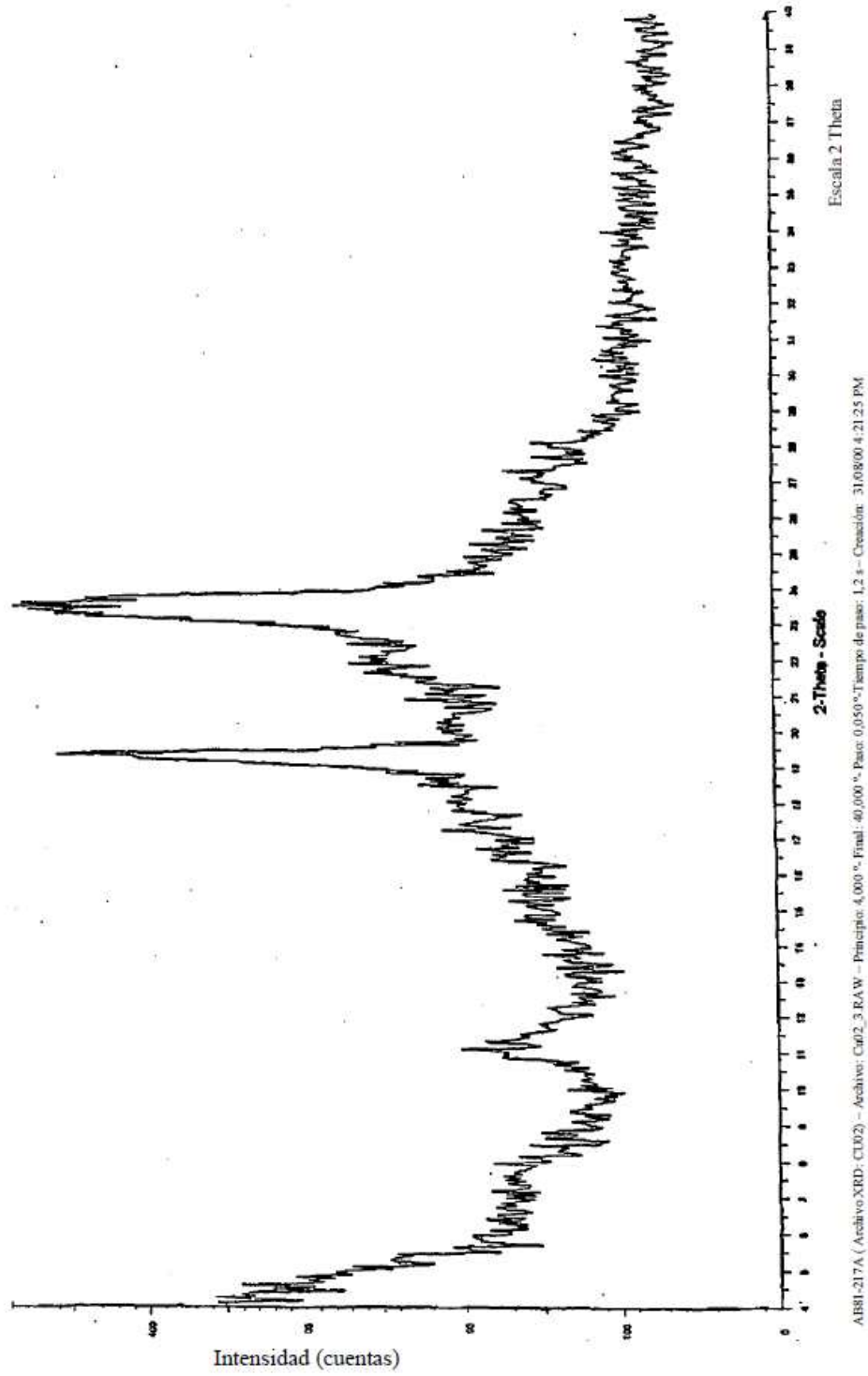


Figura 8

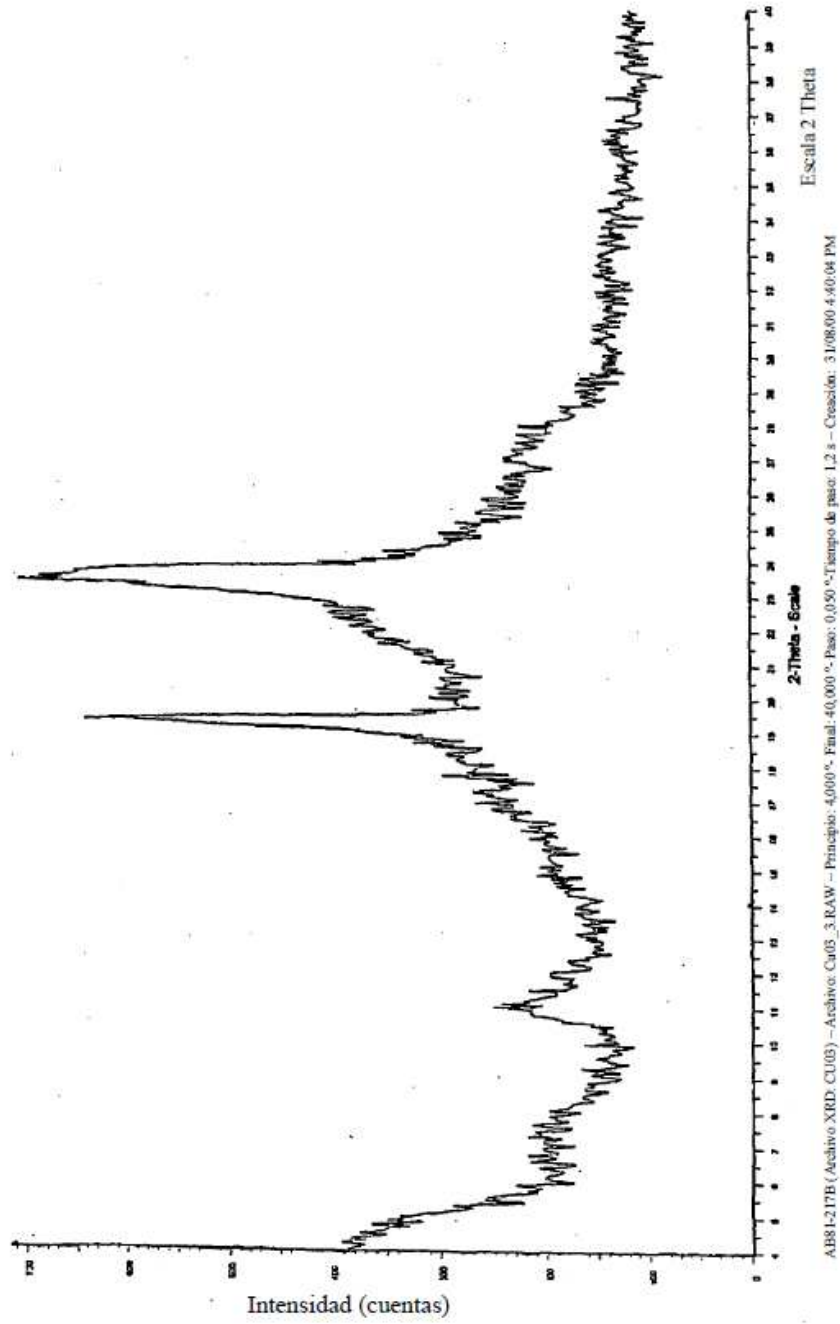
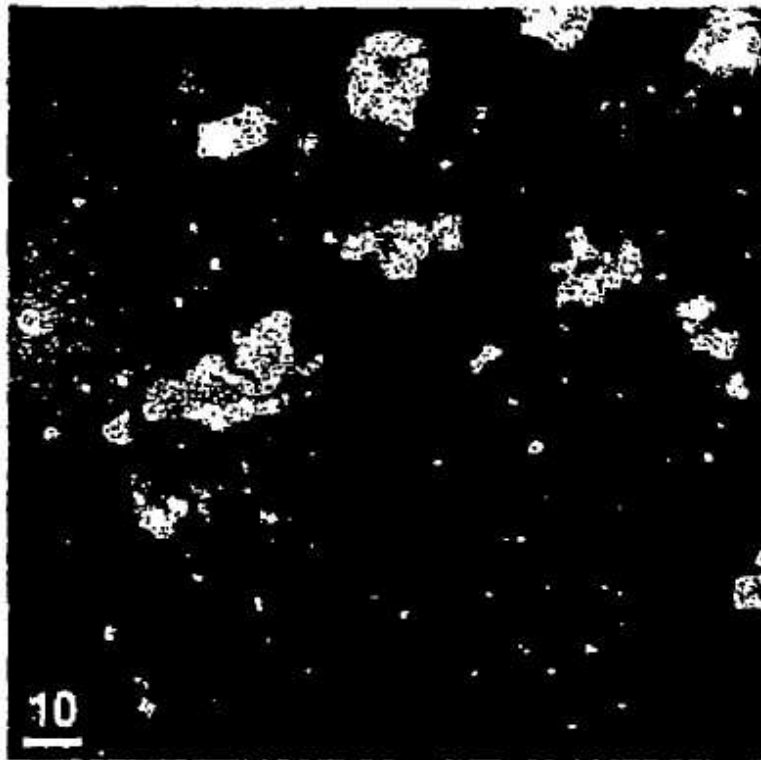


Figura 9



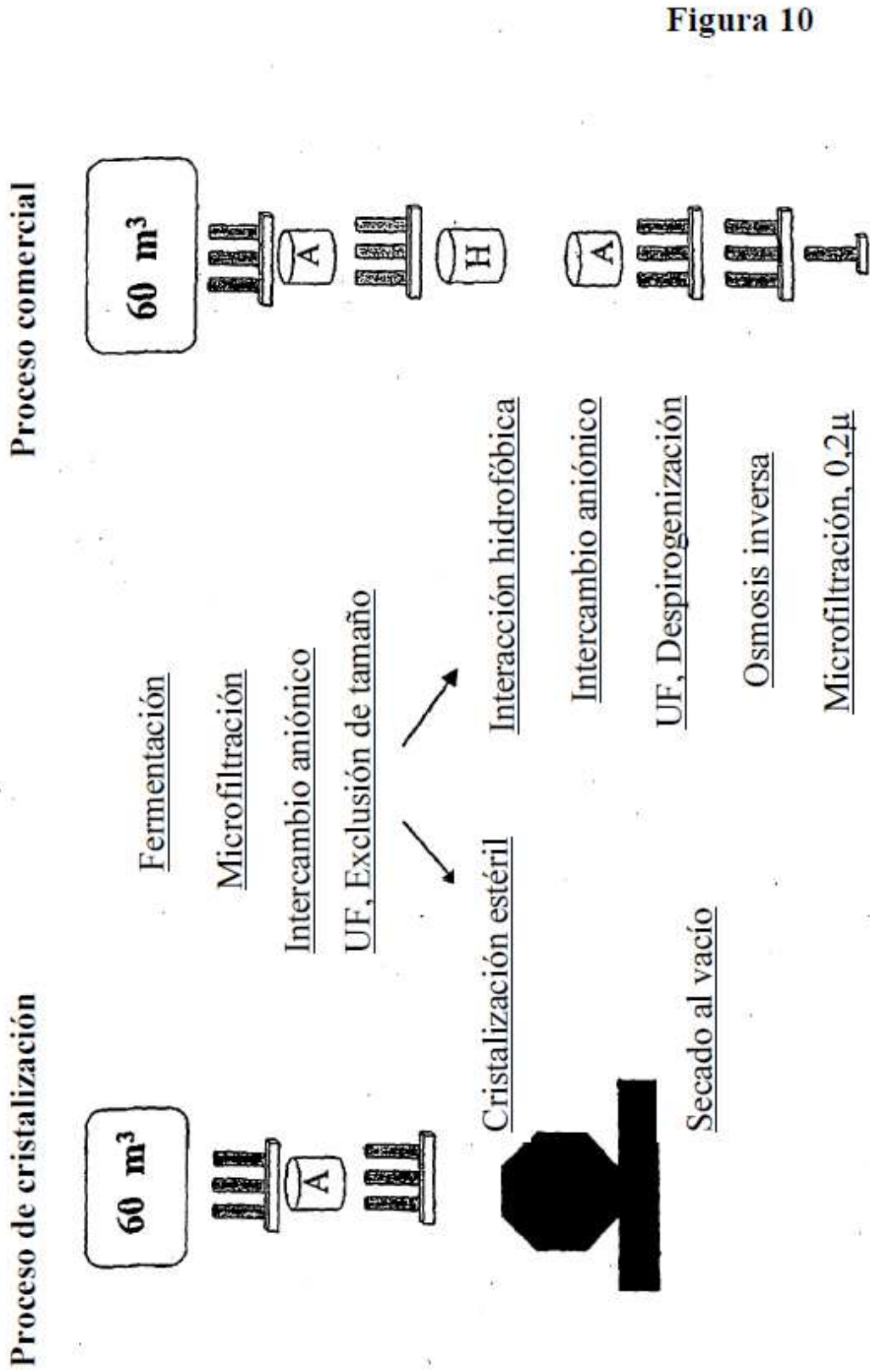


Figura 10

Figura 11

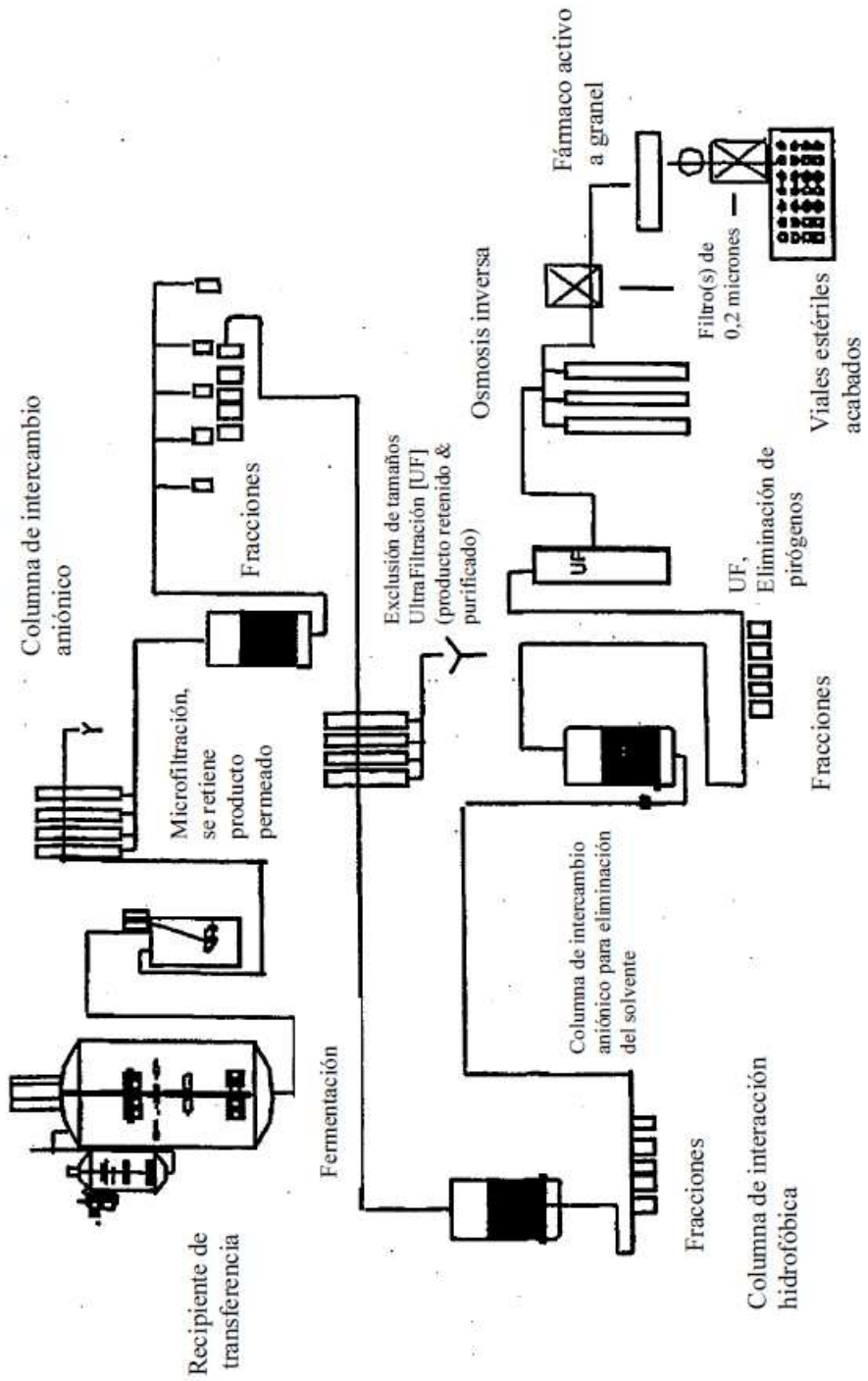


Figura 12

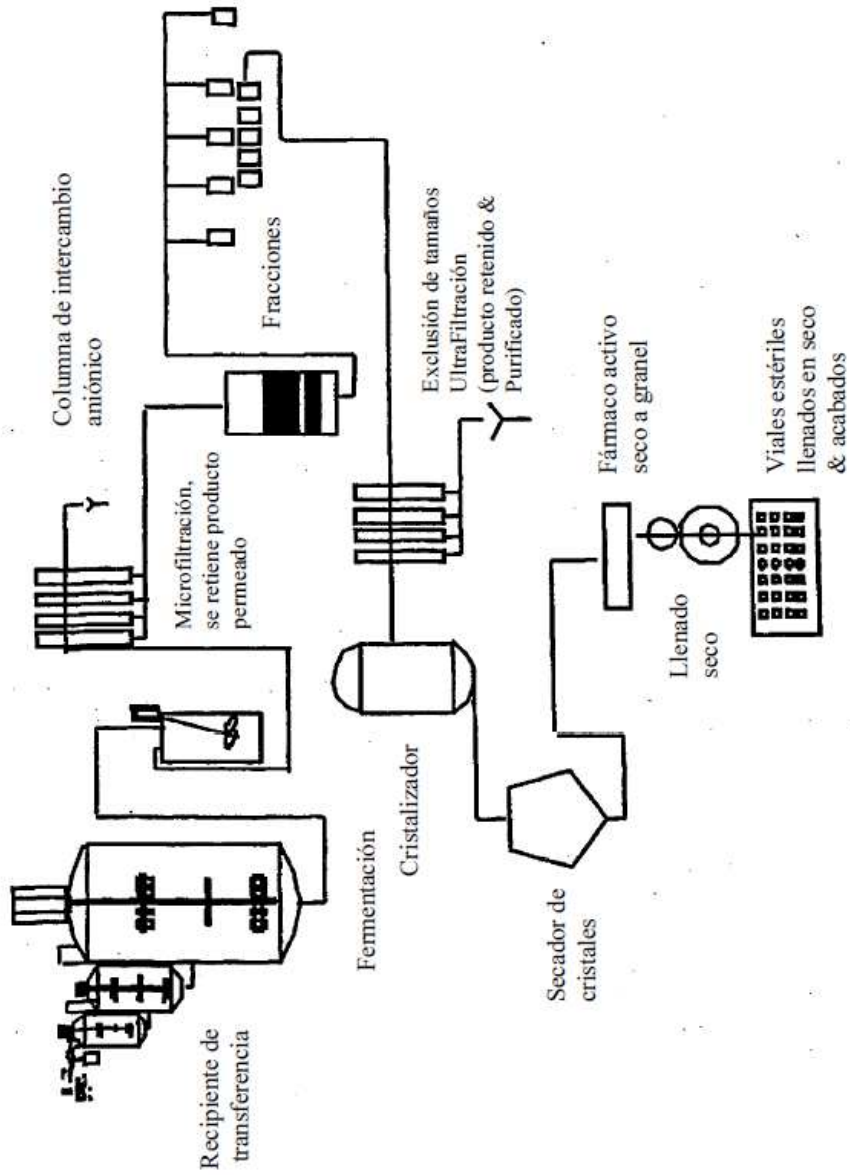


Figura 13

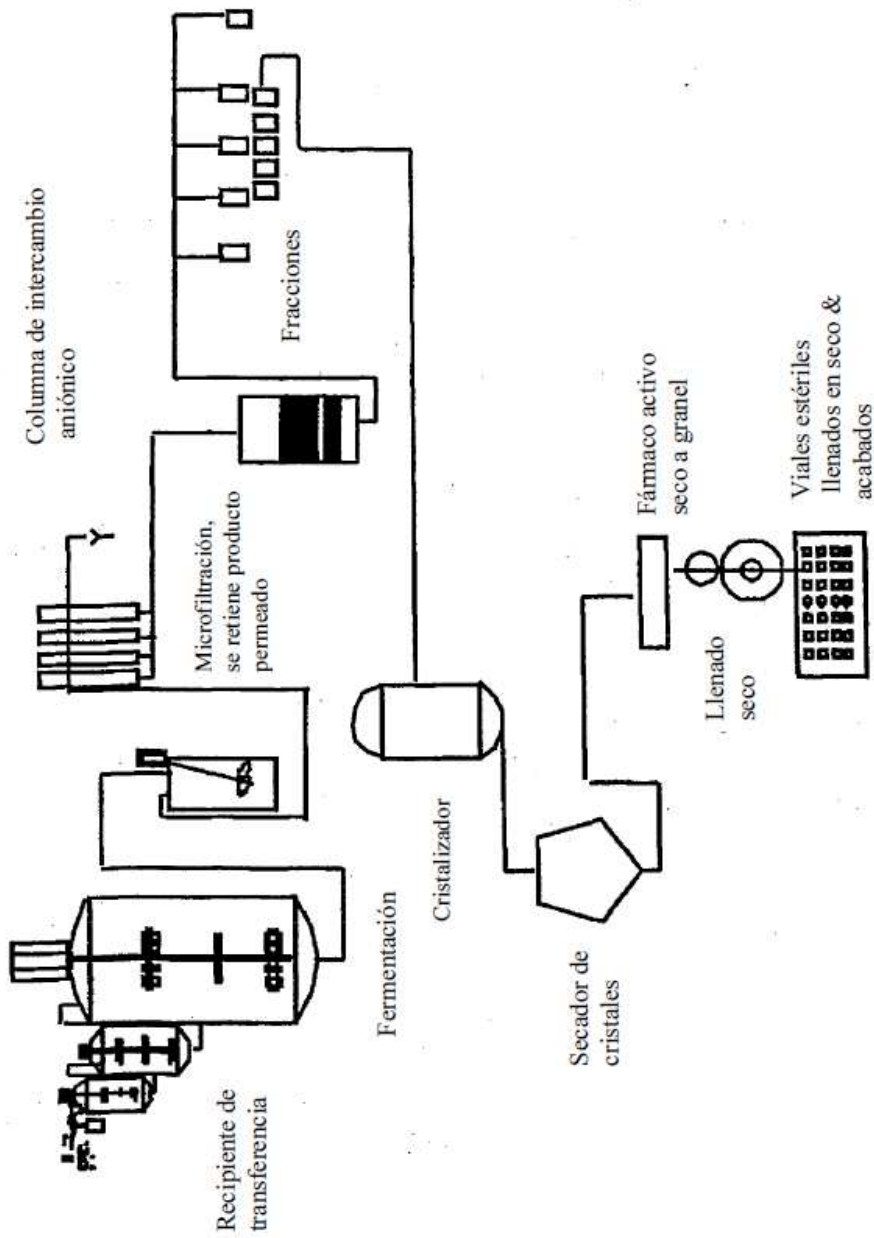


Figura 14

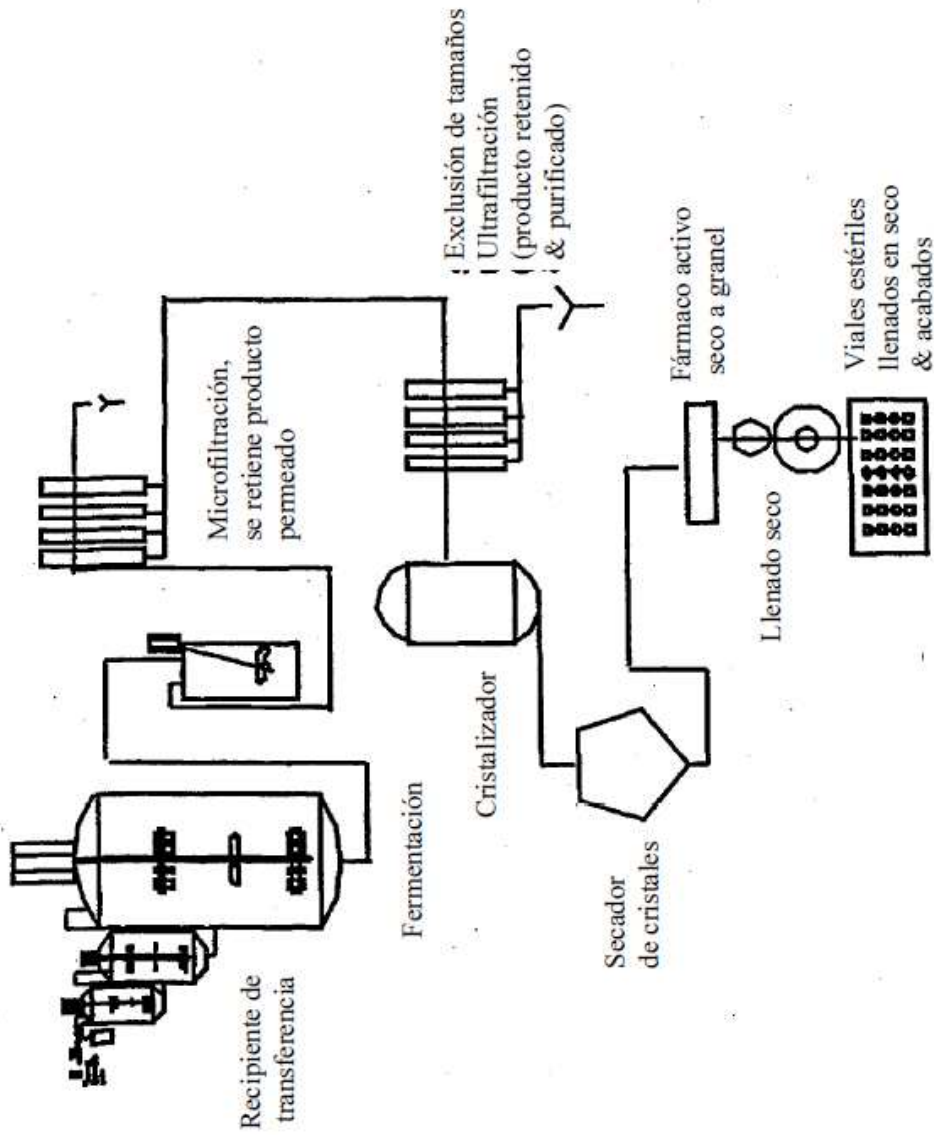


Figura 15

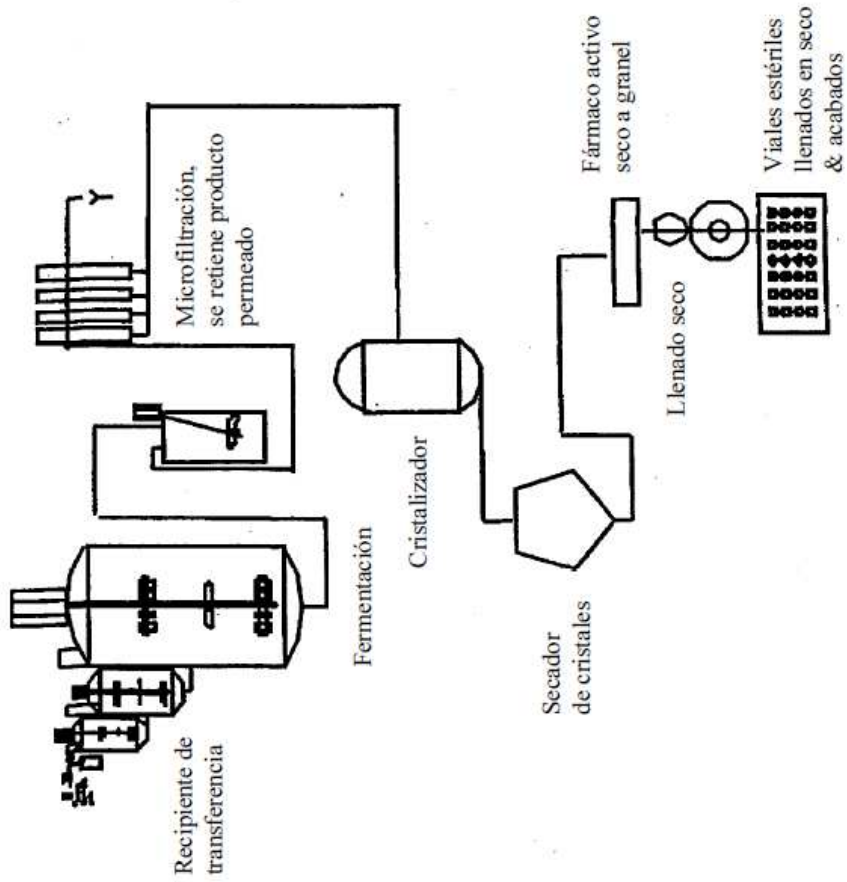


Figura 16

