

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 656**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/14** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2003 PCT/US2003/036127**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2004 WO04045636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2003 E 03789744 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 1565201**

54 Título: **Métodos de administración de dalbavancina para el tratamiento de infecciones bacterianas**

30 Prioridad:

**18.11.2002 US 427654 P**

**08.07.2003 US 485694 P**

**13.08.2003 US 495048 P**

**19.08.2003 US 496483 P**

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

**14.05.2019**

73 Titular/es:

**VICURON PHARMACEUTICALS LLC (100.0%)**

**5 Giralda Farms**

**Madison, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:

**CAVALERI, MARCO;**

**HENKEL, TIMOTHY;**

**JABES, DANIELA;**

**MALABARBA, ADRIANO;**

**MOSCONI, GIORGIO;**

**STOGNIEW, MARTIN y**

**WHITE, RICHARD J.**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 712 656 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

Métodos de administración de dalbavancina para el tratamiento de infecciones bacterianas

5 **Campo de la invención**

Esta solicitud se refiere a composiciones de dalbavancina y a métodos de uso de tales composiciones en métodos de tratamiento de infecciones bacterianas, tal como se define en las reivindicaciones.

10 **Antecedentes de la invención**

Según el Centro para el control y la prevención de enfermedades estadounidense, las infecciones hospitalarias del torrente sanguíneo son una causa de muerte importante en los Estados Unidos. Aproximadamente el cinco por ciento de los siete millones de catéteres venosos centrales (CVC) insertados anualmente en los Estados Unidos se asocian con al menos un episodio de infección del torrente sanguíneo (aproximadamente 350 000 al año). Las infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéteres se producen cuando entran bacterias al torrente sanguíneo a través de un catéter intravenoso y pueden ser potencialmente mortales.

Las infecciones de la piel y tejidos blandos (SSTI) son un estado médico común y a menudo la consecuencia de procedimientos quirúrgicos o traumatismo. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* son los patógenos aislados más frecuentemente de pacientes con infecciones de tejidos profundos, aunque cualquier organismo patógeno, incluyendo aquellos que se encuentran en piel sana, puede provocar infección. Muchas SSTI tienen una gravedad de leve a moderada, permitiendo un tratamiento exitoso con agentes antimicrobianos orales y limpieza local. En cambio, infecciones más graves o complicadas, que frecuentemente se producen en pacientes con factores de riesgo subyacentes (por ejemplo, deterioro vascular, diabetes) y/o infecciones provocadas por bacterias difíciles de tratar o multirresistentes, pueden requerir terapia antimicrobiana intravenosa potente y desbridamiento quirúrgico agresivo.

Los estafilococos son un problema terapéutico y clínico y se han asociado cada vez más con infecciones hospitalarias desde principios de la década de 1960. La especie positiva para coagulasa *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) ha sido problemática durante mucho tiempo tanto en infecciones hospitalarias como extrahospitalarias, y se han reconocido varios estafilococos negativos para coagulasa como patógenos oportunistas en humanos, especialmente en el tratamiento de pacientes enfermos críticos en unidades de cuidados intensivos. Otra causa importante de preocupación clínica es el aislamiento creciente de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina en muchas partes del mundo.

Los antibióticos glicopeptídicos vancomicina y teicoplanina se han usado frente a infecciones hospitalarias graves provocadas por patógenos grampositivos multirresistentes, particularmente MRSA, estafilococos negativos para coagulasa (CoNS) y enterococos. La vancomicina y la teicoplanina se usan para infecciones provocadas por MRSA, y hasta hace poco, todas las cepas aisladas eran susceptibles de manera uniforme. Sin embargo, el aislamiento de cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia o susceptibilidad intermedia a teicoplanina así como a vancomicina se ha notificado ahora con frecuencia creciente. Se han notificado varias cepas resistentes a vancomicina, clasificadas "VanA", "VanB" o "VanC", basándose en el mecanismo de resistencia. Por tanto, se necesitan opciones de tratamiento alternativas.

La teicoplanina es al menos tan activa como la vancomicina frente a la mayoría de bacterias grampositivas y parece provocar menos acontecimientos adversos. Ambas formas de tratamiento requieren al menos dosificación una vez al día para lograr una recuperación completa. Actualmente, las opciones terapéuticas para infecciones graves provocadas por algunos de estos patógenos son bastante limitadas. La resistencia emergente de patógenos grampositivos a vancomicina hace que sea muy deseable la disponibilidad de nuevos antibióticos con potencial de eficacia aumentada.

Además, serían deseables pautas posológicas menos frecuentes que las terapias disponibles actualmente para potenciar el bienestar del paciente, especialmente para administración de antibióticos parenteral, por ejemplo, intravenosa o intramuscular. Se necesitan algunas veces estancias en el hospital por la necesidad de administración de antibióticos varias veces al día por medios parenterales, y sería ventajosa una dosificación menos frecuente para permitir que tal tratamiento se hiciera de forma ambulatoria.

Aunque una dosificación menos frecuente es una característica deseable de una pauta de administración de antibióticos, el "margen farmacéutico", es decir, el perfil de toxicidad, del antibiótico administrado debe ser suficientemente aceptable como para permitir administrar una sola dosis grande sin comprometer el tratamiento provocando reacciones adversas graves en el paciente tratado. Además, incluso cuando un antibiótico muestra un margen farmacéutico adecuado, solo es posible una dosificación menos frecuente si el antibiótico muestra una semivida en suero adecuada para mantener la eficacia terapéutica a lo largo del intervalo de dosificación deseado. La semivida en suero de un antibiótico dicta tanto la longevidad de un fármaco *in vivo* como la duración después de la administración cuando el nivel en suero alcanzará un nivel valle mínimo que todavía es eficaz de manera

bactericida. El nivel valle en suero a lo largo del tiempo después de la administración de una primera dosis de antibiótico dicta cuándo debe administrarse una dosis adicional para conservar un nivel bactericida mínimo del antibiótico *in vivo*.

- 5 En vista de lo anterior, un antibiótico que presente actividad frente a uno o más cepas bacterianas resistentes a antibióticos, particularmente MRSA, que pudiera administrarse en un intervalo de dosificación de una vez cada 5-7 días o más, sería de valor comercial y satisfaría una necesidad largamente sentida en la técnica.

10 Eliopoulos comenta en "*Newer glycopeptides and derivatives for MSRA*" que se ha completado el reclutamiento para un ensayo de fase II en infecciones bacterianas de piel/partes blandas complicadas, con dosificación de dalbavancina una vez a la semana (véase ABSTRACTS OF THE INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND, vol. 42, 2002, página 465, 42.<sup>a</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; San Diego, CA, EE.UU.; 27-30 de Septiembre, 2002, 2002).

15 Dowell *et al.* describen una administración de dalbavancina en una sola dosis en "*The pharmacokinetic and renal excretion of dalbavancin in healthy subjects*" (véase ABSTRACTS OF THE INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND; vol. 42, 2002, página 18, American Society for Microbiology (ASM) Annual Meeting in Infectious Disease; San Diego, CA, EE.UU.; 27-30 de Septiembre, 2002, 2002).

## 20 **Sumario de la invención**

La invención proporciona composiciones y usos de las mismas para tratamiento o prevención de una infección bacteriana con dalbavancina, tal como se define en las reivindicaciones. Sorprendentemente, se ha encontrado que formulaciones estabilizadas de dalbavancina muestran tanto un margen farmacéutico así como una semivida en suero prolongada para permitir pautas de tratamiento de aproximadamente una vez cada 5-7 días o más, mientras se conservan las propiedades antibacterianas *in vivo*.

Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que incluye una dosis unitaria de dalbavancina en una cantidad suficiente para proporcionar un nivel en plasma profiláctica o terapéuticamente eficaz de dalbavancina en un individuo durante al menos cinco días, un estabilizador y un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan generalmente en una forma farmacéuticamente aceptable para su administración a un individuo, tal como una formulación acuosa farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas se administran preferiblemente por vías parenterales, por ejemplo, intravenosa o intramuscular. Por consiguiente, en esta realización preferida, estas composiciones farmacéuticas son normalmente estériles.

En algunas realizaciones, se proporciona una dosis unitaria de dalbavancina en forma de polvo seco (por ejemplo, liofilizado) y se reconstituye en un portador farmacéuticamente aceptable, tal como una formulación acuosa estéril, antes de su administración a un individuo. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable incluye dextrosa al 5 % en agua. Una composición farmacéutica de la invención puede administrarse a un mamífero que necesita tratamiento o prevención de una infección bacteriana, tal como un humano. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede incluir al menos un antibiótico que no es dalbavancina, tal como un antibiótico que es eficaz (por ejemplo, bactericida) contra una bacteria gramnegativa y/o un antibiótico que es eficaz contra especies grampositivas contra las que la dalbavancina no es eficaz, tales como cepas bacterianas resistentes a vancomicina VanA.

Se emplean una o más sustancias estabilizantes para inhibir la degradación de uno o más componentes de dalbavancina durante el almacenamiento como una formulación en polvo seco (por ejemplo, liofilizado) y/o como una formulación acuosa antes de su administración a un individuo. A lo largo del tiempo, la degradación puede dar como resultado la formación indeseable de componentes menos activos y/o inactivos que podrían provocar potencialmente efectos adversos *in vivo*. Los estabilizadores preferidos incluyen componentes aniónicos tales como azúcares o alcoholes de azúcares, por ejemplo, un mono-, di- o polisacárido, o derivado del mismo, tales como, por ejemplo, manitol, lactosa, sacarosa, sorbitol, glicerol, celulosa, trehalosa, maltosa o dextrosa, o mezclas de los mismos.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar una infección bacteriana en un individuo que lo necesita, incluyendo administrar al menos una dosis unitaria de dalbavancina en una cantidad suficiente para proporcionar un nivel en plasma terapéuticamente eficaz de dalbavancina en el individuo durante al menos cinco días, y un portador farmacéuticamente aceptable. Un nivel en plasma terapéuticamente eficaz de dalbavancina es generalmente de al menos de aproximadamente 4 mg de dalbavancina por litro de plasma. En una realización, la cantidad de dosificación de dalbavancina administrada es una cantidad que es clínicamente eficaz y que también ha reducido efectos secundarios adversos en comparación con el tratamiento de referencia con fármacos tales como teicoplanina y vancomicina.

Puede administrarse dalbavancina como una sola dosis o como múltiples dosis. En algunas realizaciones, se administra una sola dosis de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 4000 mg, por ejemplo 3000 mg, de dalbavancina. En diversas realizaciones, una sola dosis de dalbavancina puede incluir al menos aproximadamente

5

cualquiera de 0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 o 3 gramos.

En otras realizaciones, se administran dos dosis con de cinco a diez días de diferencia, tal como aproximadamente una semana de diferencia. La primera dosis puede ser de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 mg de dalbavancina y la segunda dosis puede ser de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 2500 mg de dalbavancina. A menudo, la primera dosis incluye de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3 veces, a menudo al menos aproximadamente dos veces la cantidad de dalbavancina contenida en la segunda dosis. Por ejemplo, la primera dosis puede ser de aproximadamente 1000 mg y la segunda dosis puede ser de aproximadamente 500 mg de dalbavancina. En métodos en los que se administran dos dosis, el nivel valle en plasma de dalbavancina en un individuo antes de la administración de la segunda dosis es generalmente de al menos aproximadamente 4 mg, a menudo al menos aproximadamente 10 mg, a menudo al menos aproximadamente 20 mg, más a menudo al menos aproximadamente 30 mg de dalbavancina por litro de plasma, y todavía más a menudo al menos aproximadamente 40 mg de dalbavancina por litro de plasma.

10

15

A menudo, los métodos de la invención incluyen administración parenteral, por ejemplo administración intravenosa. En algunas realizaciones, la administración es intravenosa con la velocidad de administración controlada de manera que la administración se produce durante al menos aproximadamente 30 minutos o más.

20

Pueden usarse métodos de la invención para tratar una infección bacteriana grampositiva, tal como, por ejemplo, una infección de piel y tejido blando por *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*. En algunas realizaciones, la infección es resistente a penicilina y/o multiresistente.

25

En otro aspecto, se proporciona un método para prevenir una infección bacteriana que incluye administrar al menos una dosis unitaria de dalbavancina en una cantidad suficiente para proporcionar un nivel en plasma profilácticamente eficaz de dalbavancina en el individuo durante al menos aproximadamente un día, tres días, cinco días, una semana, o diez días o más, y un portador farmacéuticamente aceptable. La dosificación de dalbavancina puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1000 mg. En algunas realizaciones, se administra dalbavancina antes, durante o posteriormente a un procedimiento médico o una estancia en el hospital.

30

Los métodos terapéuticos o profilácticos de la invención pueden incluir la administración de al menos un antibiótico que no es dalbavancina, preferiblemente un antibiótico que es eficaz contra una bacteria gramnegativa y/o un antibiótico que es eficaz contra cepas grampositivas contra las que la dalbavancina no es eficaz, tales como cepas VanA.

35

En otro aspecto, se divulgan kits que incluyen al menos una dosis unitaria de dalbavancina en una cantidad suficiente para proporcionar un nivel en plasma terapéuticamente eficaz durante al menos aproximadamente cinco días o un nivel en plasma profilácticamente eficaz de dalbavancina durante al menos aproximadamente un día en un individuo, e instrucciones para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de una infección bacteriana. Un kit puede contener dos dosificaciones unitarias, incluyendo una primera dosificación de 1,5 a 3 veces, a menudo al menos aproximadamente dos veces la cantidad de dalbavancina incluida en una segunda dosificación. Los kits también pueden incluir un antibiótico que no es dalbavancina, preferiblemente eficaz contra una bacteria gramnegativa.

40

45

En una realización, se divulgan kits que incluyen un primer recipiente que contiene una composición de dalbavancina en polvo seco (por ejemplo, liofilizado) y un segundo recipiente que contiene una cantidad predeterminada de una disolución acuosa fisiológicamente aceptable para mezclar con la composición de dalbavancina. Tales disoluciones son preferiblemente disoluciones acuosas estériles. En una realización, los kits incluyen un medio de suministro para administrar la composición de dalbavancina a un individuo, por ejemplo un medio de administración intravenosa o jeringa.

50

### 55 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 representa la concentración en plasma de dalbavancina frente al tiempo tras una sola infusión intravenosa de 1000 mg de dalbavancina.

60

La figura 2 representa datos de calorimetría de valoración isotérmica para la unión de dalbavancina a albúmina sérica humana (parte superior) y una representación gráfica de los datos ajustados a una curva determinada a partir de un modelo de unión 2:1 de dalbavancina:proteína (parte inferior).

La figura 3 representa un espectro de masas con ionización por electrospray de dalbavancina.

65

La figura 4 es un gráfico de concentración de dalbavancina frente a razón de población de multímeros con respecto

a monómeros de dalbavancina y representa un aumento de la razón de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina con concentración creciente de dalbavancina.

5 La figura 5 es un gráfico de pH frente a razón de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina y representa un aumento de la razón de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina con pH creciente.

10 La figura 6 representa un espectro de masas con ionización por electrospray de dalbavancina en una disolución de pH 5 de formiato de amonio 5 mM.

La figura 7 representa un espectro de masas con ionización por electrospray de dalbavancina en una disolución de pH 5 de formiato de amonio 50 mM.

15 La figura 8 representa un espectro de masas con ionización por electrospray de dalbavancina en una disolución de pH 5 de formiato de amonio 100 mM.

La figura 9 representa un espectro de masas con ionización por electrospray de teicoplanina (50 µg/ml) en agua.

20 La figura 10 representa un espectro de masas con ionización por electrospray de teicoplanina (100 µg/ml) en agua.

La figura 11 representa el efecto de HSA sobre la constante de disociación aparente para la unión dalbavancina/tripéptido a 26 °C (pH 7,4).

25 La figura 12 representa una comparación de datos de calorimetría isotérmica (ITC) para la unión de tripéptido a vancomicina y dalbavancina en condiciones idénticas, usando la misma disolución de tripéptido.

30 Las figuras 13A y 13B representan la posible interacción de monómeros y multímeros de dalbavancina (incluyendo dímeros) con ligando de tripéptido y HSA. La figura 13A representa dalbavancina en equilibrio de monómero-dímero en disolución, que se une como monómero a dos sitios diferenciados en HSA. La figura 13B representa la unión de ligando a dímero de dalbavancina en disolución y más débilmente a monómeros de dalbavancina unidos a HSA.

### Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona pautas posológicas mejoradas y nuevas composiciones de dalbavancina, y métodos mejorados de tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos. En particular, la invención proporciona composiciones de dalbavancina que tienen actividad frente a uno más cepas de bacterias resistentes a antibióticos, tales como MRSA, que pueden administrarse en una pauta posológica de una vez cada 5-7 días o más.

40 La dalbavancina, a la que también se hace referencia en la bibliografía científica como BI 397 o VER001, es una mezcla de glicopéptidos semisintéticos, cuyas propiedades se han notificado en las patentes estadounidenses n.º 5.606.036, 5.750.509, 5.843.679 y 5.935.238.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "dalbavancina" se refiere a composiciones que comprenden uno o más, preferiblemente dos o más, homólogos estrechamente relacionados, denominados "A<sub>0</sub>", "A<sub>1</sub>", "B<sub>0</sub>", "B<sub>1</sub>", "C<sub>0</sub>" y "C<sub>1</sub>", tal como se describe a continuación, o monómeros, multímeros (es decir, dímero o multímero de orden superior), tautómeros, ésteres, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, "dímero" o "multímero" se refiere a o bien un homodímero o bien un homomultímero, es decir, un dímero o multímero compuesto de monómeros del mismo homólogo de dalbavancina, o un heterodímero o heteromultímero, es decir, un dímero o multímero compuesto de monómeros de al menos dos homólogos de dalbavancina diferentes. La dalbavancina incluye a menudo "MAG", una variante no homóloga descrita a continuación. Individualmente, los homólogos de dalbavancina y MAG se denominan algunas veces en el presente documento "componentes de dalbavancina".

50 La dalbavancina se prepara mediante modificación química del complejo glicopeptídico natural A-40.926 tal como se describe en Malabarba y Donadio (1999) *Drugs of the Future* 24(8):839-846. El componente predominante de la dalbavancina es factor B<sub>0</sub>, que representa >75 % de todo el complejo.

55 La cantidad de cada uno de los componentes presentes en una composición de dalbavancina viene dictada por una variedad de factores, incluyendo, por ejemplo, las condiciones de fermentación empleadas en la preparación del complejo glicopeptídico natural A-40926, que es el precursor de dalbavancina (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.843.679), las condiciones empleadas para recuperar A-40926 del caldo de fermentación, las reacciones químicas empleadas para esterificar selectivamente el grupo carboxilo del resto de azúcar de A-40926, las condiciones empleadas para amidar el grupo peptidilcarboxilo, las condiciones empleadas para saponificar el éster del grupo carboxilo de la función ácido N-acilaminoglucurónico, las condiciones empleadas para recuperar la dalbavancina de la mezcla de síntesis, y similares.

En realizaciones preferidas, las composiciones de dalbavancina comprenden al menos de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 98 % en peso del componente B<sub>0</sub>. En realizaciones particularmente preferidas, la dalbavancina comprende las siguientes cantidades de B<sub>0</sub>:

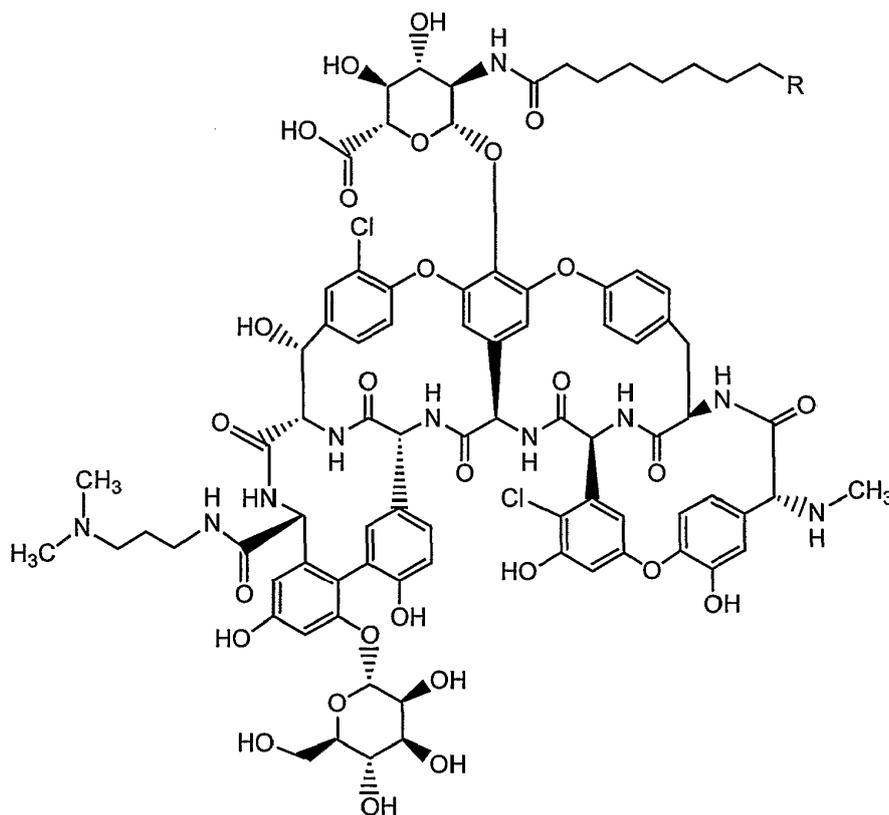
5 Tabla 1. Cantidades preferidas de componente B<sub>0</sub> en la composición de dalbavancina

Preferida <sup>1</sup>	Más preferida <sup>1</sup>	Incluso más preferida <sup>1</sup>
80-98	80-97	80-96
81-98	81-97	81-96
82-98	82-97	82-96
83-98	83-97	83-96
84-98	84-97	84-96
85-98	85-97	85-96
86-98	86-97	86-96
87-98	87-97	87-96
88-98	88-97	88-96
89-98	89-97	89-96
90-98	90-97	90-96

1 cada intervalo representa el % en moles de B<sub>0</sub> en relación con los componentes totales de dalbavancina presentes en la composición de dalbavancina incluyendo MAG

10

La estructura química de varios de los componentes de dalbavancina se representa en la fórmula I a continuación:



I

Componente de dalbavancina	R	Peso molecular
A <sub>0</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1802,7
A <sub>1</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1802,7
B <sub>0</sub>	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1816,7
B <sub>1</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1816,7
C <sub>0</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1830,7
C <sub>1</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1830,7

15

Todos los componentes anteriores de dalbavancina son activos de manera bactericida frente a varias bacterias

grampositivas. Sin embargo, un componente de dalbavancina no homólogo, denominado "MAG", que carece de un resto acilglucoronamina presente en otros componentes, es menos eficaz de manera bactericida, tanto *in vivo* como *in vitro*, que otros componentes de dalbavancina. Se cree que MAG es un producto de descomposición de uno o más de los otros componentes de dalbavancina. Por consiguiente, en una realización preferida, la cantidad de MAG en dalbavancina es menor de aproximadamente el 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1 o 0,5 por ciento en moles de todos los componentes de dalbavancina presentes, incluyendo MAG.

Se cree que la dalbavancina inhibe la biosíntesis de la pared celular bacteriana mediante unión a precursores que terminan en D-alanil-D-alanina de peptidoglicanos. Multímeros diméricos o de orden superior de dalbavancina pueden presentar propiedades antibacterianas adicionales por interacción de las cadenas laterales lipófilas con la membrana citoplasmática de bacterias. Véase, por ejemplo, Malabarba y Ciabatti, *et al.* (2001) *Current Medicinal Chemistry* 8:1759-1773. Una elaboración adicional de multímeros de dalbavancina puede encontrarse en el documento estadounidense con n.º de serie 10/\_, titulado "DALBAVANCIN COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS" (Composiciones de dalbavancina para el tratamiento de infecciones bacterianas), presentado simultáneamente con el presente documento como n.º de expediente del apoderado 34231-20052.00.

Datos clínicos, no clínicos e *in vitro* indican que la dalbavancina es beneficiosa para el tratamiento de infecciones grampositivas graves provocadas por MRSA y CoNS, y todas las especies enterocócicas distintas de VanA y estreptocócicas, incluyendo fenotipos VanB y VanC escasamente susceptibles o resistentes a vancomicina.

La dalbavancina es más activa *in vitro* frente a estafilococos (incluyendo algunas cepas resistentes a teicoplanina) que la teicoplanina y vancomicina. La dalbavancina tiene mejor actividad frente a estreptococos, incluyendo cepas resistentes a penicilina, que la teicoplanina o vancomicina. La dalbavancina es activa *in vitro* e *in vivo* frente a varias bacterias grampositivas, incluyendo la mayoría de cepas resistentes a fármacos.

La dalbavancina se administra normalmente a un individuo como una composición de dalbavancina. Tal como se usa en el presente documento, el término "composición de dalbavancina" o "formulación de dalbavancina" se refiere a una composición, normalmente una composición farmacéutica que comprende dalbavancina, tal como se definió anteriormente, y uno o más componentes distintos de dalbavancina tales como, por ejemplo, un portador farmacéuticamente aceptable, un estabilizador, tampones u otros componentes similares.

Tal como se muestra en el ejemplo 1, la dalbavancina es eficaz a intervalos de dosis de una semana. Por tanto, una ventaja de la dalbavancina frente a otras opciones de tratamiento es la capacidad para administrar este antibiótico una vez a la semana, maximizando de ese modo la adhesión al tratamiento del paciente y minimizando potencialmente la necesidad de o disminuyendo la duración de una estancia en el hospital para la administración parenteral de antibióticos. Una dosificación menos frecuente permite a menudo el tratamiento de forma ambulatoria, disminuyendo por tanto los costes de tratamiento. Tal como se muestra adicionalmente en el ejemplo 1, una segunda dosis de dalbavancina aproximadamente una semana después de la administración de la primera dosificación, donde la segunda dosis es aproximadamente la mitad de la primera dosis, proporciona inesperadamente una mejora significativa en la eficacia de tratamiento.

#### Métodos de uso

Se proporcionan métodos para la administración de dalbavancina a un individuo que necesita tratamiento para una infección bacteriana. El tratamiento puede incluir profilaxis, terapia o cura. Los métodos incluyen la administración de una o más dosis unitarias de dalbavancina en una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz.

Tal como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de dalbavancina que producirá un resultado terapéuticamente deseado (por ejemplo, reducción o eliminación de una infección bacteriana). Una cantidad terapéuticamente eficaz puede administrarse en una o más dosis. Una "cantidad profiláctica eficaz" se refiere a una cantidad de dalbavancina suficiente para prevenir o reducir la gravedad de una futura infección bacteriana cuando se administra a un individuo que es susceptible de y/o que puede contraer una infección bacteriana, por ejemplo, en virtud de un procedimiento médico o estancia en el hospital, o exposición a un individuo con una infección bacteriana. La dalbavancina se administra generalmente en un portador farmacéuticamente aceptable.

La dalbavancina se proporciona a menudo como una sal de clorhidrato, que es libremente soluble en agua.

Normalmente, la dalbavancina se administra como una "dosis unitaria" en una formulación de dalbavancina que incluye una cantidad de dalbavancina suficiente para proporcionar un nivel en plasma profiláctica o terapéuticamente eficaz de dalbavancina durante varios días, a menudo al menos aproximadamente 5 días, una semana o 10 días, cuando se administra a un individuo.

Tal como se usa en el presente documento, "individuo" se refiere a un vertebrado, normalmente un mamífero, a menudo un humano.

5 Todos los homólogos de dalbavancina descritos anteriormente muestran una semivida en plasma prolongada, a menudo 9 días o más, aunque se cree que MAG tiene una semivida más corta que otros homólogos. La semivida larga permite intervalos entre dosificaciones más largos que la vancomicina o teicoplanina. Tal como se describe en el ejemplo 1, la dosificación semanal de dalbavancina es eficaz para el control de infecciones bacterianas, en  
10 contraste con la pauta posológica de dos veces al día que se usa a menudo para vancomicina o la pauta de una vez al día usada generalmente para teicoplanina. La dosificación menos frecuente de dalbavancina ofrece ventajas de tratamiento significativas con respecto a vancomicina y teicoplanina, particularmente con respecto a la comodidad y adhesión al tratamiento del paciente mejoradas con la pauta de tratamiento. Sorprendentemente pueden administrarse dosis altas (es decir, que dan como resultando niveles en suero altos y duraderos sorprendentes), y  
15 con menor frecuencia que otras opciones de tratamiento disponibles. La nueva pauta posológica disponible para dalbavancina da como resultado eficacia mejorada porque a las concentraciones requeridas para lograr una dosificación menos frecuente, la dalbavancina muestra efectos adversos mínimos *in vivo*, evidenciando un gran margen farmacéutico, y además porque los niveles en sangre de dalbavancina se mantienen por encima de niveles bactericidas mínimos durante todo el protocolo de tratamiento, evidenciando una semivida en suero prolongada para dalbavancina. La combinación del gran margen farmacéutico acoplado con la semivida en suero prolongada permite una dosificación menos frecuente de dalbavancina.

20 Además, la dalbavancina se formula preferiblemente con un estabilizador que inhibe la degradación de uno o más de los componentes de la dalbavancina. En una realización preferida, se formula dalbavancina con una razón en peso 1:2 de manitol:dalbavancina. En otra realización preferida, se formula dalbavancina con una razón en peso 1:1.4 de manitol:lactosa:dalbavancina.

25 En algunas realizaciones, se administra una formulación de dalbavancina a una dosificación que da como resultado niveles en plasma terapéuticamente eficaces (es decir, bactericidas) del fármaco durante varios días, a menudo al menos de 5 a 10 días, a menudo al menos aproximadamente una semana. Generalmente, la dalbavancina se mantiene en el plasma a o por encima de la concentración bactericida mínima de aproximadamente 4 mg/l durante al menos 5 días. A menudo, la dalbavancina se mantiene a un nivel en plasma de al menos aproximadamente 5 mg/l, a menudo al menos aproximadamente 10 mg/l, a menudo al menos aproximadamente 20 mg/l, a menudo al menos aproximadamente 30 mg/l, a menudo al menos aproximadamente 40 mg/l, durante al menos 5 días, a  
30 menudo al menos aproximadamente una semana o más. Pueden medirse los niveles en plasma de dalbavancina mediante métodos que se conocen bien en la técnica, tales como cromatografía de líquidos, espectrometría de masas o bioensayo microbiológico. Un ejemplo de un método para cuantificar dalbavancina en plasma se proporciona en el ejemplo 5.

35 Los límites superiores para los niveles de concentración en plasma de dalbavancina vienen dictados generalmente por las dosificaciones que inhiben efectos adversos inaceptables en la población de pacientes tratada.

40 Pueden administrarse composiciones de dalbavancina en una sola dosis o en múltiples dosis. Cuando se administra como una sola dosis, la composición de dalbavancina se formula preferiblemente para que contenga cantidades suficientes de dalbavancina para lograr propiedades antibacterianas *in vivo* durante al menos 5 días, preferiblemente al menos 7 días y más preferiblemente al menos 10 días.

45 Cuando se emplean múltiples dosis, puede administrarse dalbavancina semanalmente durante dos o más semanas. En una realización, se administra dalbavancina en al menos dos dosis, a menudo en dos dosis con de 5 a 10 días de diferencia, más a menudo una vez a la semana durante dos semanas. Tal como se muestra en el ejemplo 1, una pauta posológica de este tipo proporciona ventajas significativas con respecto a protocolos de tratamiento con antibióticos convencionales.

50 También pueden administrarse composiciones de dalbavancina en múltiples dosis con dos o más días o al menos una semana de diferencia o en una o más dosis bisemanalmente. En algunas realizaciones, se administra una composición de dalbavancina semanalmente, seguido de administración bisemanal o mensual. En algunas realizaciones, se administra dalbavancina en intervalos semanales durante 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas.

55 De la manera más ventajosa, no se requiere dosificación diaria porque se usan dosis superiores, menos frecuentes. Las dosis múltiples o individuales pueden oscilar, por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 5 gramos. Una sola dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 gramos, por ejemplo, de aproximadamente 3 gramos, puede administrarse para diversos tratamientos contra infecciones. Si se administran múltiples dosis, por ejemplo, semanalmente, cada dosis puede oscilar, por ejemplo, desde aproximadamente 0,25 hasta aproximadamente 5,0 gramos.

60 Para realizaciones en las que se administra una sola dosis para tratar una infección, la cantidad de la dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 gramos, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 gramos, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3,5 gramos, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 gramos por ejemplo, aproximadamente 3 gramos. En algunas realizaciones, una sola dosis de aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5 o 3 gramos se administra para el tratamiento de una infección bacteriana. Para  
65 realizaciones en las que se administra una sola dosis para profilaxis, la cantidad de la dosis puede ser, por ejemplo,

de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 gramos, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 gramo, por ejemplo, aproximadamente 0,5 o aproximadamente 0,25 gramos.

5 En programas de dosificación que incluyen múltiples dosificaciones, se administra una primera dosis más alta, es decir, por ejemplo, de aproximadamente 1,5 a 3 veces mayor, que una o más dosis posteriores. Por ejemplo, la primera dosis puede ser de aproximadamente 0,5 gramos a aproximadamente 5 gramos y la segunda dosis de aproximadamente 0,25 gramos a aproximadamente 2,5 gramos, la primera dosis puede ser de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 2 g y la segunda dosis de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1 gramo, o la primera dosis puede ser de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 3 g y la segunda dosis de aproximadamente 0,2 a 1,5 g.

10 En algunas realizaciones, se administran al menos dos dosificaciones en las que la primera dosificación incluye aproximadamente el doble de dalbavancina que dosificaciones posteriores. En una realización, una primera dosificación incluye aproximadamente 1 gramo de dalbavancina y una dosificación posterior incluye aproximadamente 0,5 gramos. En otra realización, una primera dosificación incluye aproximadamente 0,5 gramos de dalbavancina y una dosificación posterior incluye aproximadamente 0,25 gramos.

15 En algunas realizaciones, se administra una composición de dalbavancina en dos dosis con al menos aproximadamente una semana de diferencia. A menudo, dos dosis de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1,5 gramos de dalbavancina se administran con de 5 a 10 días de diferencia, más a menudo aproximadamente 1 semana de diferencia. En una realización, una primera dosificación de aproximadamente 1 gramo de dalbavancina y una segunda dosificación de aproximadamente 0,5 gramos de dalbavancina se administran con aproximadamente 1 semana de diferencia.

20 En una pauta posológica múltiple, el tiempo entre las dosis pueden oscilar, por ejemplo, entre 5 y 10 días, a menudo aproximadamente una semana. La frecuencia de dosis puede ser, por ejemplo, dos dosis semanales, o múltiples dosis semanales. El intervalo de dosificación, o tiempo entre dosis, puede ser, por ejemplo, cualquiera de 5, 6, 7, 8, 9, 10 días. El número de dosis administradas, puede ser, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más dosis, administrándose cada dosis después de la dosis inicial tras el intervalo de dosificación seleccionado.

25 En un programa de dosificación múltiple, a menudo el "nivel valle", o el nivel de dalbavancina en plasma después de una primera dosis de dalbavancina y justo antes de la administración de una segunda dosis, es al menos de aproximadamente 4 mg/l. Preferiblemente, el nivel valle al final de un intervalo de dosificación tal como de aproximadamente una semana es al menos de aproximadamente 20 mg/l, más preferiblemente al menos aproximadamente 30 mg/l e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 40 mg/l.

30 Puede administrarse dalbavancina por vía parenteral, por ejemplo, por vía intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) o intratecal (i.t.). La pauta posológica y dosificación real administrada puede variar dependiendo de factores tales como la naturaleza y gravedad de la infección, la edad, el peso y la salud general del paciente y la tolerancia de un paciente particular a dalbavancina, pero los profesionales de la salud lo podrán determinar. En una realización, a una dosis intravenosa de un gramo de dalbavancina le sigue una dosis intravenosa de 0,5 gramos una semana más tarde.

35 La administración y el suministro del fármaco al paciente, por ejemplo, por vía intravenosa, pueden realizarse a una velocidad controlada, de modo que la concentración en la sangre no aumenta demasiado rápido ni provoca que se produzca precipitación. En algunas realizaciones, se administra dalbavancina a una velocidad apropiada de manera que el fármaco forma un complejo con proteína(s) endógena(s) en el torrente sanguíneo. Sin pretender restringirse a una teoría particular, se cree que proteína endógena, tal como albúmina sérica humana, puede formar un complejo *in vivo* con una o dos moléculas de monómeros homólogos de dalbavancina. Cuando está presente una cantidad suficiente de dalbavancina, se cree que se unirán hasta dos moléculas de homólogo de dalbavancina a la proteína endógena y se cree además que este complejo se forma uniendo moléculas homólogas diferenciadas de dalbavancina en dos sitios de unión diferentes. Alternativamente, es posible que dalbavancina dimérica se una a un solo sitio de unión en la proteína endógena. Una elaboración adicional en los complejos de dalbavancina-proteína endógena comentados anteriormente puede encontrarse en el documento estadounidense con n.º de serie 10/\_, titulado "COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING BACTERIAL INFECTIONS WITH PROTEIN-DALBAVANCIN COMPLEXES" (Composiciones y métodos para tratar infecciones bacterianas con complejos de proteína-dalbavancina), presentado simultáneamente con el presente documento como n.º de expediente del apoderado 34231-20053.00.

40 La duración de la infusión puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 horas. Por ejemplo, puede usarse una duración de infusión de aproximadamente 30 minutos cuando la dosis es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 gramo. La administración intravenosa en condiciones de velocidad controlada puede generar concentraciones de dalbavancina en el cuerpo que están en gran exceso de lo que puede conseguirse en la fase de disolución a pH fisiológico *in vitro*. Aunque no se desea limitarse por la teoría, esto puede deberse a la formación de un complejo de dalbavancina con proteína(s) endógena(s) tal(es) como seroalbúmina, lo que puede aumentar la capacidad del plasma para absorber dalbavancina.

La formación de un complejo de dalbavancina *in vitro* o *ex vivo* puede permitir una administración más rápida, tal como al menos aproximadamente 1 minuto, al menos aproximadamente 10 minutos o al menos aproximadamente 20 minutos. Un complejo de este tipo puede conseguirse mezclando albúmina sérica humana y/u otra proteína endógena con dalbavancina, formando de ese modo el complejo *in vitro* o *ex vivo*, y administrando entonces este complejo al paciente tratado. Alternativamente, la albúmina sérica humana u otra proteína endógena puede obtenerse de fuentes autólogas o mediante expresión de un microorganismo modificado para que contenga el gen para la proteína.

La cantidad de dalbavancina administrada puede ser cualquiera de las dosificaciones divulgadas en el presente documento. La dosis de dalbavancina se elige generalmente de manera que el fármaco permanecerá en un nivel en plasma profiláctica o terapéuticamente eficaz (es decir, bactericida) durante un periodo de tiempo extendido, a menudo al menos 5 días, más a menudo aproximadamente una semana o más. Se prefiere la administración de una dosis de dalbavancina que produce y mantiene concentraciones bactericidas durante al menos aproximadamente una semana (o de 5 a 10 días). Una concentración bactericida se define como la concentración de dalbavancina requerida para destruir al menos el 99 % de las bacteria presentes al inicio de un experimento *in vitro* a lo largo de un período de 24 horas. Una concentración bactericida mínima de dalbavancina en plasma es normalmente de aproximadamente 4 mg/l.

Los ejemplos de indicaciones que pueden tratarse incluyen infecciones de piel y tejido blando (SSTI) tanto complicadas como sin complicaciones, infecciones del torrente sanguíneo (BSI), infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéteres (CRBSI), osteomielitis, infecciones de articulaciones protésicas, profilaxis quirúrgica, endocarditis, neumonía hospitalaria o extrahospitalaria, neumonía neumocócica, tratamiento empírico de neutropenia febril, infecciones del espacio articular e infecciones por dispositivos (por ejemplo, marcapasos y desfibriladores cardíacos internos). Pueden tratarse infecciones bacterianas grampositivas o resistentes a antibióticos, tales como una infección por el género *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, o *Clostridium*, en particular *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* Grupos A y C, *Neisseria gonorrhoeae* o *Clostridium difficile*.

La invención proporciona métodos para tratamiento de infecciones de piel y tejido blando (SSTI). Los pacientes que pueden beneficiarse de este tratamiento pueden tener infecciones o bien profundas o bien superficiales. SSTI puede implicar a tejido blando más profundo y/o requerir intervención quirúrgica significativa, tal como por ejemplo un absceso serio, úlcera infectada, quemadura seria o celulitis extensa y profunda. También pueden tratarse heridas quirúrgicas infectadas.

La presentación clínica de la infección de piel y partes blandas puede variar de foliculitis leve a fascitis necrosante grave. El modo de contraerla puede también variar con infecciones de piel y partes blandas extrahospitalarias, que a menudo están precedidas por lesiones que resultan de actividades recreativas o de exposición laboral, y se asocian habitualmente con una diversidad mayor de patógenos. Las infecciones de piel y partes blandas hospitalarias se asocian generalmente con procedimientos quirúrgicos, el desarrollo de úlceras de decúbito y cateterización. Las infecciones posquirúrgicas son la tercera infección hospitalaria más frecuente y representan el 17 % de todas las infecciones hospitalarias notificadas al Sistema nacional de vigilancia de infecciones hospitalarias (NNIS). La fuente más frecuente de infección es la flora endógena del paciente. Los patógenos aislados más frecuentemente de SSTI son *Staphylococcus aureus*, estafilococos negativos para coagulasa y *Enterococcus spp.*

Los síntomas de infecciones SSTI pueden incluir eritema, dolor a la palpación o dolor, calor o efusión localizado, secreción o supuración, hinchazón o induración, enrojecimiento o fluctuación. Los pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con los métodos de la invención incluyen aquellos con infecciones profundas o complicadas o infecciones que requieren intervención quirúrgica, o pacientes con enfermedad vascular periférica o diabetes *mellitus* subyacente. Estas infecciones a menudo están provocadas por bacterias grampositivas tales como especies de *Staphylococcus* o *Streptococcus*, tales como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*. Los métodos para el tratamiento de una infección bacteriana de piel o tejido blando incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dalbavancina a un individuo que necesita tratamiento, en una cantidad y según una pauta posológica tal como se comentó anteriormente. En algunas realizaciones, se administra una composición de dalbavancina por vía intravenosa en dos dosis, a menudo con de 5 a 10 días de diferencia, más a menudo con aproximadamente 1 semana de diferencia. En algunas realizaciones, la primera dosificación incluye al menos el doble de dalbavancina que la segunda dosificación. En una realización, la primera dosificación es de aproximadamente 1000 mg y la segunda dosificación es de aproximadamente 500 mg.

La invención también proporciona métodos para la prevención profiláctica de la aparición de una infección bacteriana, por ejemplo una infección provocada por *Staphylococcus aureus*, o por una bacteria del género de *Neisseria* o *Clostridium*. En un método profiláctico de la invención, se administra una cantidad profilácticamente eficaz de dalbavancina a un individuo que puede ser susceptible de contraer una infección bacteriana, por ejemplo, a través de un procedimiento médico. A menudo, se administra dalbavancina en una cantidad suficiente para proporcionar un nivel en plasma profilácticamente eficaz durante al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días o al menos aproximadamente una semana o más. Pueden administrarse composiciones de dalbavancina, por ejemplo, por vía parenteral, por ejemplo, inyección por

vía intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), subcutánea (s.c.), o intratecal (i.t.), previa o posteriormente a la cirugía como etapa preventiva contra la infección. Pueden administrarse composiciones de dalbavancina de manera inmediatamente previa o posterior a, 1 o más días o aproximadamente una semana previa o posteriormente a, o durante un procedimiento médico invasivo tal como cirugía o una estancia en un centro de cuidados médicos tal como un hospital para prevenir una infección. Puede usarse un método profiláctico en cualquier situación en la que es posible o probable que un individuo pueda contraer una infección bacteriana, incluyendo situaciones en la que un individuo se ha expuesto o es probable que se haya expuesto a un individuo infectado de manera bacteriana. Para métodos profilácticos, pueden administrarse composiciones de dalbavancina o bien como una sola dosis o bien como dos o más dosis de igual o diferente cantidad que se administran con de varios días a aproximadamente una semana de diferencia. En una realización, puede administrarse una composición de dalbavancina previa a o simultáneamente con la inserción de un catéter intravenoso con el fin de prevenir una infección relacionada con el torrente sanguíneo.

Para métodos profilácticos, pueden administrarse composiciones de dalbavancina en múltiples dosis, según cualquiera de los programas de dosificación descritos anteriormente. A menudo, se administra una composición de dalbavancina como una sola dosis que comprende de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 gramos, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 gramo, por ejemplo, aproximadamente 0,25 gramos o aproximadamente 0,5 gramos. En una realización, se administra una sola dosis de aproximadamente 0,25 gramos por vía intravenosa a lo largo de un lapso de tiempo de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 1 hora, por ejemplo, aproximadamente 30 minutos. En otra realización, la composición de dalbavancina se administra por vía intravenosa simultáneamente con la administración de otro tratamiento farmacéutico (por ejemplo, antibiótico).

En cualquiera de los métodos terapéuticos o profilácticos descritos anteriormente, la composición de dalbavancina puede administrarse o bien simultáneamente o bien secuencialmente con al menos otro antibiótico. En algunas realizaciones, se administra además de dalbavancina, al menos otro antibiótico que es eficaz (por ejemplo, bactericida) frente a una o más especies bacterianas gramnegativas y/o una cepa bacteriana grampositiva frente a la que la dalbavancina no es eficaz. En algunas realizaciones, se administran dalbavancina y al menos un antibiótico que es eficaz (por ejemplo, bactericida) frente al menos una especie bacteriana gramnegativa como una mezcla en la composición de dalbavancina.

#### *Composiciones farmacéuticas*

La invención proporciona composiciones farmacéuticas formuladas para la administración de dalbavancina según los métodos descritos anteriormente. Las composiciones farmacéuticas de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, pueden estar en forma de una dosis unitaria de dalbavancina que incluye una cantidad de dalbavancina suficiente para proporcionar un nivel en plasma profiláctica o terapéuticamente eficaz de dalbavancina durante varios días, a menudo al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días o al menos aproximadamente una semana o más cuando la composición se administra a un individuo, y un portador farmacéuticamente aceptable. Generalmente, un nivel en plasma profiláctica o terapéuticamente eficaz de dalbavancina es al menos de aproximadamente 4 mg por litro de plasma. Pueden medirse niveles en plasma de dalbavancina mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como aquellos descritos anteriormente.

La dalbavancina puede estar opcionalmente en una forma farmacéuticamente aceptable para su administración a un individuo, opcionalmente como una sal no tóxica, farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos de sales adecuadas de dalbavancina incluyen sales formadas mediante reacción convencional tanto con ácidos orgánicos como inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, tricloroacético, succínico, cítrico, ascórbico, láctico, maleico, glutámico, canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, metanosulfónico, bencenosulfónico, sórbico, pícrico, benzoico, cinámico, y similares. Los ejemplos representativos de bases que pueden formar sales con dalbavancina incluyen hidróxidos de metales alcalinos o metales alcalinotérreos tales como hidróxido de sodio, potasio, calcio, magnesio y bario, amoníaco y aminas orgánicas aromáticas, alicíclicas o alifáticas tales como metilamina, dimetilamina, dietilamina, etanolamina y picolina. (Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.606.036.)

En algunas realizaciones, se proporciona una formulación acuosa farmacéuticamente aceptable de dalbavancina que es adecuada para administración parenteral, tal como, por ejemplo, inyección intravenosa. Para preparar una formulación acuosa de este tipo, pueden usarse métodos bien conocidos en la técnica, y puede usarse cualquier portador, diluyente, excipiente u otros aditivos farmacéuticamente aceptables normalmente usados en la técnica. En una realización, una formulación acuosa farmacéuticamente aceptable para inyección intravenosa incluye dextrosa al 5 %.

Una composición farmacéutica para administración parenteral incluye dalbavancina y un diluyente fisiológicamente aceptable tal como agua desionizada, solución salina fisiológica, dextrosa al 5 %, disolvente miscible con agua (por ejemplo, alcohol etílico, polietilenglicol, propilenglicol, etc.), vehículo no acuoso (por ejemplo, aceite tal como aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuate y aceite de sésamo), u otros diluyentes usados de manera común. La formulación puede incluir adicionalmente un agente de solubilización tal como polietilenglicol,

5 polipropilenglicol u otro agente de solubilización conocido, tampones para estabilizar la disolución (por ejemplo, citratos, acetatos y fosfatos) y/o antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico o bisulfito de sodio). (Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.143.739.) Otros portadores farmacéuticos adecuados y sus formulaciones se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tal como se conoce en la técnica, también pueden prepararse preparaciones farmacéuticas de la invención para que contengan niveles aceptables de materiales particulados (por ejemplo, libres de partículas) y para que no sean pirogénicos (por ejemplo, que cumplan los requisitos de un inyectable en la farmacopea estadounidense).

10 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica disolviendo una dosis secada (por ejemplo, liofilizada) de dalbavancina, que contiene un estabilizador o mezcla de estabilizadores, en una cantidad de agua y preferiblemente agua desionizada en un volumen suficiente para su solubilización. Normalmente, la cantidad de agua suficiente para su solubilización es de aproximadamente 10 ml y el pH resultante de la disolución de dalbavancina está por encima de 3,0, y aproximadamente de 3,5 a 4,5. La dilución de esta disolución añadiéndola a una segunda cantidad de un diluyente acuoso, que contiene a menudo dextrosa al 5 %, tal como una cantidad  
15 contenida en una bolsa de goteo para administración intravenosa, eleva el pH de la disolución de dalbavancina hasta de aproximadamente 5 a 5,5. En otra realización, el pH de la disolución de dalbavancina en una bolsa de goteo es de aproximadamente 4,5. La segunda cantidad de disolución acuosa puede ser desionizada o estéril, o tanto desionizada como estéril. En una realización, el diluyente acuoso es dextrosa al 5 %.

20 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral pueden constituirse en viales estériles que contienen una o más dosis unitarias de dalbavancina en una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz tal como se describió anteriormente, incluyendo opcionalmente un excipiente, en condiciones en las que la eficacia bactericida de la dalbavancina se conserva. La composición puede estar en forma de un polvo seco (por ejemplo, liofilizado). Antes de su uso, puede añadirse un diluyente fisiológicamente aceptable y retirarse la disolución por  
25 medio de una jeringa para su administración a un paciente. Una formulación farmacéutica tal como se describió anteriormente puede esterilizarse por cualquier medio aceptable incluyendo, por ejemplo, métodos de esterilización por radiación gamma o de haz de electrones, o mediante filtración estéril.

30 Una formulación típica para la administración parenteral puede incluir dalbavancina en una concentración tal como de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 mg de dalbavancina por ml de preparación final.

35 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica según la invención incluye una mezcla de dalbavancina y uno o más antibióticos adicionales. Preferiblemente, al menos un antibiótico distinto de dalbavancina en la mezcla es eficaz (por ejemplo, bactericida) frente a una o más especies de bacterias gramnegativas, tal como, por ejemplo, aztreonam, y/o frente a una o más cepas bacterianas grampositivas frente a las que la dalbavancina no es eficaz, tal como, por ejemplo, linezolid o daptomicina. La mezcla también puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable tal como se describió anteriormente.

40 Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una o más sustancias estabilizantes que inhiben la degradación de uno o más de los componentes de dalbavancina a materiales inactivos o menos activos, por ejemplo, MAG. Tal como se usa en el presente documento, "sustancia estabilizante" o "estabilizador" se refiere a una sustancia que estabiliza el nivel de uno o más de los componentes constitutivos de dalbavancina, por ejemplo, B<sub>0</sub>, en la composición. Una "cantidad eficaz de estabilización" se refiere a una cantidad de un estabilizador suficiente para potenciar estabilidad a largo plazo de uno o más componentes de una composición de dalbavancina. En algunas realizaciones, puede proporcionarse una cantidad eficaz de estabilización mediante una mezcla de dos o más sustancias estabilizantes, cada una de las cuales por sí sola no está presente en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto estabilizante.

45 Los ejemplos de estabilizadores incluyen, por ejemplo, sustancias no iónicas tales como azúcares, por ejemplo, mono-, di- o polisacáridos, o derivados de los mismos, alcoholes de azúcares o polioles. Tales sustancias estabilizantes incluyen, por ejemplo, manitol, lactosa, sacarosa, sorbitol, glicerol, celulosa, trehalosa, maltosa, rafinosa, o mezclas de los mismos.

50 En una realización, la composición farmacéutica incluye una razón en peso de manitol: dalbavancina 1:2. En otra realización, la composición farmacéutica incluye una razón en peso de manitol:lactosa: dalbavancina 1:1:4. Sorprendentemente, se ha encontrado que una combinación de manitol y lactosa proporciona un efecto estabilizante mayor que cualquier sustancia sola. A menudo, el pH de una composición farmacéutica de la invención es, por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, por ejemplo aproximadamente 3,5 o aproximadamente 4,5.

55 En algunas realizaciones, pueden emplearse uno o más procedimientos para reducir la formación de MAG. Por ejemplo, puede emplearse liofilización de dalbavancina en presencia de una sustancia estabilizante, tal como manitol, para reducir la cantidad de MAG formada.

60 El almacenamiento de composiciones de dalbavancina es a menudo por debajo de la temperatura ambiental, tal

como a aproximadamente 5 °C, para potenciar la estabilidad.

#### *Eficacia mejorada y efectos secundarios reducidos*

5 La dosificación semanal de dalbavancina a niveles de dosificación altos (es decir, que dan como resultando niveles en suero altos y duraderos sorprendentes) muestra un perfil de seguridad sorprendentemente bueno, similar a, o mejor que, el observado con la terapia de referencia de dosis más bajas de antibióticos convencionales administrados diariamente o incluso 2-4 veces diariamente, tal como se demuestra mediante los ejemplos en el presente documento. Una dosificación sorprendentemente alta (es decir, que da como resultado niveles en suero altos y duraderos sorprendentes) de dalbavancina puede administrarse, con menos frecuencia que otros antibióticos, y sin efectos secundarios adversos, permitiendo adhesión al tratamiento del paciente y eficacia mejoradas.

10 Tal como se comentó en el ejemplo 1, el tratamiento con dalbavancina da como resultado una baja incidencia de acontecimientos adversos. Acontecimientos adversos graves incluyen cualquier experiencia adversa con fármacos que se produce a cualquier dosis que da como resultado un fallecimiento, es potencialmente mortal, da como resultado hospitalización o prolongación de una hospitalización existente, o discapacidad o incapacidad persistente o significativa. En el ensayo de fase II descrito en el ejemplo 1, el 90 % de las reacciones adversas, tales como diarrea, náuseas, hiperglucemia, dolor de extremidades, vómitos y estreñimiento, tuvieron una gravedad de leve a moderada. El uso de dalbavancina en el ensayo del ejemplo 1 no dio como resultado acontecimientos adversos graves relacionados con el tratamiento del fármaco en estudio.

#### *Kits*

25 También se divulgan kits para su uso en métodos de tratamiento o profilaxis de infecciones bacterianas. Los kits incluyen una composición farmacéutica de la invención, por ejemplo que incluye al menos una dosis unitaria de dalbavancina, e instrucciones que proporcionan información a un profesional sanitario en cuanto a su uso para tratar o prevenir una infección bacteriana. Pueden proporcionarse instrucciones en forma impresa o en forma de un medio electrónico tal como un disquete, CD o DVD, o en forma de una dirección de un sitio web de donde pueden obtenerse tales instrucciones. A menudo, una dosis unitaria de dalbavancina incluye una dosificación de manera que cuando se administra a un individuo, se mantiene en el individuo un nivel en plasma profiláctica o terapéuticamente eficaz de dalbavancina durante al menos 5 días. En algunas realizaciones, un kit incluye dos dosificaciones unitarias que van a administrarse con al menos 5 días de diferencia, a menudo con aproximadamente una semana de diferencia, a menudo incluyendo una primera dosificación de dalbavancina que es de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3 veces mayor que la segunda dosificación. A menudo se incluye la dalbavancina como una composición farmacéutica acuosa estéril o composición de polvo seco (por ejemplo, liofilizada).

35 Se proporciona un envasado adecuado. Tal como se usa en el presente documento, "envasado" se refiere a un material o matriz sólido usados habitualmente en un sistema y capaz de contener dentro de los límites fijados una composición de dalbavancina adecuada para su administración a un individuo. Tales materiales incluyen frascos de vidrio y plástico (por ejemplo, polietileno, polipropileno y policarbonato), viales, papel, plástico y envolturas laminadas de plástico-papel de aluminio y similares. Si se emplean técnicas de esterilización de haz de electrones, el envasado debería tener una densidad suficientemente baja como para permitir la esterilización del contenido.

40 Los kits también pueden incluir opcionalmente equipo para la administración de dalbavancina, tal como, por ejemplo, jeringas o equipo para administración intravenosa, y/o una disolución estéril, por ejemplo, un diluyente tal como dextrosa al 5 %, para preparar una composición en polvo seco (por ejemplo, liofilizada) para su administración.

45 Los kits pueden incluir, además de dalbavancina, un antibiótico distinto de dalbavancina o mezcla de antibióticos distintos de dalbavancina, para su uso con dalbavancina tal como se describió en los métodos anteriores.

50 En los ejemplos a continuación, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Si una abreviatura no está definida, tiene el significado generalmente aceptado.

55 AcOH = ácido acético

AcONa = acetato de sodio

ac. = acuoso

60 AST = aspartato aminotransferasa

ALT = alanina aminotransferasa

BV = volumen de lecho

65 CV = coeficiente de variación

	d = diámetro
	D = dalton
5	DCC = dicitohexilcarbodiámidá
	DMEPA = 3-(dimetilamino)-propilamina
10	DMSO = dimetilsulfonamida
	eq = equivalentes
	EU = unidades de endotoxina
15	g = gramo
	CG = cromatografía de gases
20	HCl = ácido clorhídrico
	H <sub>2</sub> O = agua
	HOBT = 1-hidroxibenzotiazol hidratado
25	HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = ácido sulfúrico
30	IPA = isopropilamina
	UI = unidad internacional
	KF = fluoruro de potasio
35	kg = kilogramo
	l = litro
40	CL/EM/EM = cromatografía de líquidos/espectrometría de masas/espectrometría de masas
	LDH = lactato deshidrogenasa
	LSC = recuento por centelleo líquido
45	m <sup>3</sup> = metro cúbico
	MeOH = metanol
50	mg = miligramo
	ml = mililitro
	mol = molar
55	PM = peso molecular
	N = normal
60	NaOH = hidróxido de sodio
	NMP = N-metil-2-pirrolidona
	QTD = distribución tisular cuantitativa
65	tR = tiempo de retención

d.e. = desviación estándar

TEA = trietilamina

5

Los ejemplos siguientes tienen la finalidad de ilustrar la invención.

**Ejemplos**

10 Ejemplo 1. Eficacia y seguridad de dalbavancina una vez a la semana en infecciones de piel y tejido blando profundas

Este estudio controlado, aleatorizado evaluó la seguridad y eficacia de dos pautas posológicas de dalbavancina. Pacientes adultos con infecciones de piel y tejido blando (SSTI) que implican estructuras de piel profundas o que requieren intervención quirúrgica se aleatorizaron en tres grupos: el grupo de estudio 1 recibió 1100 mg de dalbavancina por medio de inyección intravenosa (i.v.) el día 1; el grupo de estudio 2 recibió 1 g de dalbavancina i.v. el día 1 y 500 mg de dalbavancina i.v. el día 8; el grupo de estudio 3 recibió "tratamiento de referencia". Se valoraron los acontecimientos adversos y la respuesta microbiológica y clínica.

15

20 *Poblaciones para análisis*

Había 62 pacientes aleatorizados en el estudio; todos recibieron al menos una dosis del medicamento del estudio. Se evaluaron cuatro poblaciones del estudio para determinar la seguridad y eficacia y se definieron tal como sigue: La población de intención de tratar (ITT) incluyó todos los pacientes que recibieron al menos una dosis de fármaco del estudio (todos los sujetos del estudio aleatorizados). La población de intención de tratar microbiológica (MITT) eran todos pacientes ITT que tenían un patógeno grampositivo confirmado por cultivo inicialmente. Se definió la población evaluable clínicamente como aquellos que 1) cumplieron todos los criterios de entrada al estudio, 2) no tuvieron cambios en la terapia antimicrobiana para infección grampositiva tras el día 4, excepto para terapia decreciente oral (solo aplicada al grupo de tratamiento de referencia), 3) volvieron para la visita de valoración de seguimiento (FU) (a menos de un fallo de tratamiento) y 4) no recibieron un antimicrobiano concomitante no aprobado en el protocolo (a menos de un fallo de tratamiento). La población evaluable microbiológicamente era el subconjunto de pacientes evaluables clínicamente que tenían un patógeno grampositivo confirmado por cultivo inicialmente.

25

30

35 Las poblaciones del estudio se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Poblaciones del estudio para tratamiento de SSTI con dalbavancina

Poblaciones	Brazo de estudio 1 1100 mg de dalbavancina el día 1	Brazo de estudio 2 1000 mg de dalbavancina el día 1, 500 mg el día 8	Brazo de estudio 3 "Tratamiento de referencia"
ITT aleatorizada	20	21	21
Tratados	20 (100 %)	21 (100 %)	21 (100 %)
Estudio completado	18/20 (90 %)	20/21 (95,2 %)	21/21 (100 %)
Eval. clínicamente en EOT	16/20 (80 %)	17/21 (81 %)	21/21 (100 %)
Eval. clínicamente en FU	13/20 (65 %)	17/21 (81 %)	21/21 (100 %)
MITT	14/20 (70 %)	13/21 (61,9 %)	14/21 (66,7 %)
Eval. micro. en EOT	13/20 (65 %)	11/21 (52,4 %)	14/21 (66,7 %)
Eval. micro. en FU	11/20 (55 %)	11/21 (52,4 %)	14/21 (66,7 %)

40

ITT - intención de tratar  
MITT - subconjunto de población de ITT con infección grampositiva confirmada por cultivo  
EOT - fin de tratamiento  
FU - seguimiento

45

La mediana de edad de los sujetos era de 50-55 años (intervalo 18-86 años). No había diferencias aparentes en la edad en los grupos de tratamiento. Había diferencias de sexo en los grupos de tratamiento, pero globalmente el estudio reclutó el mismo número de hombres y mujeres. La población de pacientes era predominantemente de raza blanca. Estos resultados concordaban para las poblaciones tanto de ITT como clínicamente evaluables.

50

Se reclutaron 62 pacientes, 20 en el grupo de estudio 1 y 21 cada uno de los grupos de estudio 2 y 3. Los comparadores más comunes para el tratamiento de referencia eran clindamicina, ceftriaxona, vancomicina y

cefazolina. La duración media del tratamiento en el grupo de estudio 3 fue de 15 días.

*Patógenos iniciales y susceptibilidad*

5 De los 62 pacientes de ITT, el 66 % (14 con una sola dosis de dalbavancina, 13 con dos dosis de dalbavancina, 14 con tratamiento de referencia) tenían una terapia previa contra un patógeno grampositivo aislado (población de MITT). El patógeno más común era *S. aureus*. La distribución de patógenos iniciales se muestra en la tabla 3.

10 Tabla 3. Patógenos grampositivos iniciales e intervalo de MIC de dalbavancina para la población de MITT

Número con patógeno (MIC)	Una sola dosis de dalbavancina (1100 mg) (N = 14)	Dos dosis de dalbavancina (1000/500 mg) (N = 13)	Pautas de tratamiento de referencia (N = 14)
Todos <i>S. aureus</i>	13 (0,12)	11 (0,12)	10 (0,016-0,25)
Sensible a meticilina	7	6	8
Resistente a meticilina	6	5	2
Estreptococo de grupo B	0	2 (0,016)	2 (0,016)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	1 (0,016)	1 (0,016)
<i>Streptococcus</i> variados y cepas no tipificables	3 (0,016)	2 (0,016)	4 (0,016)

*Respuestas microbiológicas y clínicas*

15 La eficacia de las tres pautas de tratamiento se determinó valorando la respuesta clínica de los pacientes y las respuestas microbiológicas documentadas o supuestas. El criterio de valoración de eficacia primario fue la respuesta clínica en la visita de seguimiento para la población clínicamente evaluable. Se categorizó la respuesta clínica, para las visitas de tanto EOT como FU, como éxito (cura o mejora) o fracaso (incluyendo resultados indeterminados). Los pacientes clasificados como éxitos no deben haber recibido tratamiento antibacteriano sistémico adicional para su infección. Se definió el fracaso como la persistencia de uno o más signos y síntomas sistémicos o locales de SSTI de manera que se requirió tratamiento con agentes antibacterianos sistémicos nuevos o adicionales para las SSTI.

20 Se valoró el desenlace microbiológico, una variable de eficacia secundaria, en la subpoblación de pacientes que tenían SSTI documentadas microbiológicamente (es decir, al menos un patógeno inicial identificado). Se valoró una respuesta microbiológica para cada patógeno grampositivo identificado inicialmente (es decir, erradicación, supuesta erradicación, persistencia, supuesta persistencia). Para pacientes para los que no se realizaron cultivos de seguimiento, las respuestas microbiológicas para patógenos iniciales se supusieron basándose en la respuesta clínica. La respuesta microbiológica por paciente en las visitas de EOT y FU se catalogó como éxito (es decir, todos los organismos grampositivos erradicados o supuestamente erradicados) o fracaso (es decir, al menos un organismo grampositivo persistía o se supuso que ha persistido, múltiples patógenos con erradicación parcial). Tanto en las visitas de EOT como FU, se valoraron la colonización y la superinfección. En la visita de FU, una respuesta bacteriológica del paciente podría incluir también recaída.

*Eficacia clínica*

35 Las tasas de éxito clínico se muestran en la tabla 4. En la población evaluable clínicamente, el 61,5 % de los pacientes en grupo de una sola dosis de dalbavancina, el 94,1 % del grupo de dos dosis de dalbavancina y el 76,2 % del grupo de tratamiento de referencia se clasificaron como éxitos en el momento de la valoración de FU. En un subanálisis exploratorio de aquellos pacientes categorizados con SSTI profunda o complicada inicialmente, la terapia con dos dosis de dalbavancina también proporcionó una tasa de éxito clínico mayor (93,8 %), en comparación con las terapias con una sola dosis de dalbavancina y de tratamiento de referencia, el 58,3 % y el 73,7 %, respectivamente.

45 Se encontraron tasas de éxito similares en las valoraciones tanto de EOT como de FU en las poblaciones evaluables microbiológicamente y de ITT de apoyo con una tendencia constante hacia una respuesta más favorable tras tratamiento con dos dosis de dalbavancina (tabla 3). Para la población de MITT, las tasas de éxito clínico en la valoración de FU para aquellos con *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) fueron del 50 % (3/6) para una sola dosis de dalbavancina, el 80 % (4/5) para dos dosis de dalbavancina y el 50 % (1/2) para pacientes tratados con una pauta de tratamiento de referencia.

50 Tabla 4. Tasas de éxito clínico por grupo de tratamiento y población de análisis

Población	Una sola dosis de dalbavancina (1100 mg)	Dos dosis de dalbavancina (1000/500 mg)	Pautas de tratamiento de referencia
ITT en EOT	15/20 (75,0)	19/21 (90,5)	17/21 (81,0)
ITT en FU	12/20 (60,0)	19/21 (90,5)	16/21 (76,2)

MITT en EOT	10/14 (71,4)	12/13 (92,3)	10/14 (71,4)
MITT en FU	7/14 (50,0)	12/13 (92,3)	9/14 (64,3)
Clínicamente evaluable en EOT	13/16 (61,5)	16/17 (94,1)	17/21 (81,0)
Clínicamente evaluable en FU	8/13 (61,5)	16/17 (94,1)	16/21 (76,2)
Microbiológicamente evaluable en EOT	10/13 (76,9)	10/11 (90,9)	10/14 (71,4)
Microbiológicamente evaluable en FU	6/11 (54,5)	10/11 (90,9)	9/14 (64,3)

#### Eficacia microbiológica

5 Las tasas de éxito de las diferentes pautas de tratamiento con respecto a diferentes patógenos se muestra en la tabla 5. Para la población evaluable microbiológicamente, las tasas de erradicación/supuesta erradicación en la valoración de FU para todos los organismos fue del 58,3 % (7/12) para una sola dosis de dalbavancina, del 92,3 % (12/13) para dos dosis de dalbavancina y del 70,6 % (12/17) para pacientes en el grupo de tratamiento de referencia. Para cepas aisladas que persistían, no hubo cambio en MIC de dalbavancina. En FU, las tasas de erradicación de *S. aureus* fueron mayores para el grupo de dos dosis de dalbavancina (90 %) en comparación con tratamientos de una sola dosis de dalbavancina (50 %) y tratamiento de referencia (60 %). Se observaron hallazgos similares para la población de MITT; dos dosis de dalbavancina erradicaron el 80 % de las cepas aisladas de MRSA (tabla 5).

Tabla 5. Tasas de éxito por patógeno para la población de ITT microbiológicamente en la valoración de FU

	Una sola dosis de dalbavancina (1100 g)	Dos dosis de dalbavancina (1000/500 mg)	Pautas de tratamiento de referencia
Organismos totales	7/16 (43,8 %)	14/16 (87,5 %)	12/17 (70,6 %)
Todos <i>S. aureus</i>	5/13 (38 %)	9/11 (82 %)	6/10 (60 %)
Sensible a meticilina	2/7 (29 %)	5/6 (83 %)	5/8 (63 %)
Resistente a meticilina	3/6 (50 %)	4/5 (80 %)	1/2 (50 %)
Especies de estreptococo variadas	2/3 (67 %)	4/4 (100 %)	5/7 (71 %)

15 Para las poblaciones de MITT y evaluables microbiológicamente, se resumen las tasas de éxito microbiológico en EOT y FU en la tabla 6. Se notificaron tasas de éxito microbiológico comparables en ambas visitas para pacientes tratados con dos dosis de dalbavancina y pautas de tratamiento de referencia (aproximadamente del 64 % al 77 %), mientras que aquellos a los que se les dio una sola dosis de dalbavancina tuvieron tasas de éxito menores (<40 %). Las tasas de éxito microbiológico en EOT/FU en la población evaluable microbiológicamente igualaron a los hallazgos de respuesta clínica: el 38,5 %/27,3 % para una sola dosis de dalbavancina, el 72,7 %/72,7 % para dos dosis de dalbavancina y el 71,4 %/64,3 % para terapia de tratamiento de referencia. Se observaron hallazgos similares para la población de MITT (datos no mostrados).

25 Tabla 6. Tasas de éxito microbiológico

	Una sola dosis de dalbavancina (1100 g)	Dos dosis de dalbavancina (1000/500 mg)	Pautas de tratamiento de referencia
Población de MITT			
EOT	5/14 (35,7)	10/13 (76,9)	10/14 (71,4)
FU	3/14 (21,4)	9/13 (69,2)	9/14 (64,3)
Población evaluable microbiológicamente			
EOT	5/13 (38,5)	8/11 (72,7)	10/14 (71,4)
FU	3/11 (27,3)	8/11 (72,7)	9/14 (64,3)

#### Análisis farmacocinético

30 Para pacientes aleatorizados a los grupos de tratamiento de dalbavancina, se obtuvieron 5 ml de sangre el día 8 para la determinación de las concentraciones de dalbavancina en plasma. Para pacientes aleatorizados para recibir una dosis de 500 mg de dalbavancina el día 8, se obtuvo sangre justo antes de la administración de la segunda dosis. Se obtuvieron muestras de 5 ml de sangre adicionales los días 10 y 24 para pacientes que se aleatorizaron al grupo de una sola dosis de dalbavancina y los días 20 y 34 para aquellos que recibieron dos dosis de dalbavancina.

35 Se determinaron concentraciones en plasma de dalbavancina usando métodos de cromatografía de líquidos y espectrofotómetro de masas validados. El límite inferior de cuantificación era de 500 ng/ml para plasma.

Las concentraciones de dalbavancina medias recogidas en los días del estudio 8, 10 y 24 en la pauta una sola dosis fueron de  $31,1 \pm 7,1$ ,  $25,2 \pm 4,8$  y  $10,2 \pm 3,5$  mg/l (media  $\pm$  D.E.), respectivamente. Las concentraciones de dalbavancina tras la pauta de dos dosis los días del estudio 8 (antes de la segunda dosis), 20 y 34 fueron de  $30,4 \pm 8,2$ ,  $21,2 \pm 10,0$  y  $9,0 \pm 4,4$  mg/l, respectivamente. Tal como se esperaba, todos los pacientes tenían concentraciones de dalbavancina de más de 20 mg/l a lo largo de la primera semana tras la primera dosis, y se mantuvieron niveles por encima de 20 mg/l durante una semana adicional con una dosis adicional de 500 mg i.v. el día 8. Generalmente, las concentraciones bactericidas mínimas son de aproximadamente 4 a 10 mg/l.

*Evaluación de seguridad*

Se evaluó a cada paciente que recibió al menos una dosis de fármaco del estudio (población de ITT) para determinar la seguridad de fármacos a través de la monitorización de acontecimientos adversos (AA), incluyendo resultados de prueba de laboratorio clínico anómalos y signos vitales. Se evaluaron los AA por el investigador según su gravedad (leves, moderados, graves, potencialmente mortales), y por la relación con el fármaco del estudio (no relacionado, probablemente no relacionado, posiblemente relacionado o probablemente relacionado).

Se presenta un resumen de los datos de AA en la tabla 7. La mayoría de las reacciones adversas (90 %) se consideró que tenían una gravedad de leve a moderada. Todas las reacciones adversas graves (8 acontecimientos en 5 pacientes) no estaban relacionadas con el tratamiento del fármaco de estudio. Aproximadamente el 59 % de todos los pacientes que notificaron al menos un AA emergente del tratamiento (19 de una sola dosis de dalbavancina, 16 de dos dosis de dalbavancina, 21 de tratamiento de referencia) experimentaron un acontecimiento que el investigador categorizó como posible o probablemente relacionado con el fármaco del estudio. Específicamente, se notificaron AA relacionados con el fármaco en 11 pacientes (55 %) de una sola dosis de dalbavancina, 10 (48 %) de dos dosis de dalbavancina y 12 (57 %) de tratamiento de referencia. Los AA relacionados con el fármaco notificados más frecuentemente en grupos tanto de dalbavancina como de tratamiento de referencia fueron diarrea y náuseas. En la tabla 8 se presenta un resumen de tipos de AA observados para los diferentes grupos de tratamiento.

Ningún paciente tratado con dalbavancina abandonó el tratamiento prematuramente debido a un AA. Tres de 21 (14 %) pacientes en una pauta de tratamiento de referencia abandonaron el tratamiento prematuramente debido a un AA, incluyendo un paciente que desarrolló urticaria el día 1 que estaba probablemente relacionada con el fármaco y dos pacientes que tuvieron AA no relacionados con el fármaco del estudio (superinfección con *P. aeruginosa* y nivel valle de vancomicina elevado).

Tabla 7. Resumen de datos de acontecimientos adversos (AA)

	Una sola dosis de dalbavancina (N = 20)	Dos dosis de dalbavancina (N = 21)	Tratamiento de referencia (N = 21)
$\geq 1$ AA	95 %	76,2 %	100 %
% de AA graves	15 %	9,5 %	4,8 %
$\geq 1$ AA posible/probablemente relacionados con el tratamiento	55 %	48 %	57 %
AA que conducen a abandono del medicamento del estudio	0	0	14,3 %
$\geq 1$ AA grave	2 (10 %)	2 (9,5 %)	1 (4,8 %)

Tabla 8. Acontecimientos adversos más comunes

	Una sola dosis de dalbavancina (N = 20)	Dos dosis de dalbavancina (N = 21)	Tratamiento de referencia (N = 21)
Diarrea	20 %	9,5 %	28,6 %
Náuseas	10 %	28,6 %	9,5 %
Hiper glucemia	5 %	14,3 %	19 %
Dolor de extremidades	10 %	9,5 %	9,5 %
Vómitos	10 %	14,3 %	4,8 %
Estreñimiento	5 %	4,8 %	14,3 %

*Discusión*

Este ensayo de fase II aleatorizado, abierto, muestra que la dalbavancina es eficaz para el tratamiento de adultos con SSTI. La mayoría de los pacientes reclutados tenían infecciones profundas o complicadas (>90 %) e infecciones que requerían intervención quirúrgica (~70 %), mientras que aproximadamente el 45 % tenían diabetes *mellitus*

subyacente.

Dos dosis semanales de dalbavancina tuvieron una tasa de respuesta clínica numéricamente mayor que o bien una sola dosis de dalbavancina o la pauta de tratamiento de referencia. Datos de poblaciones tanto de ITT como evaluables clínicamente sugieren que una pauta de dos dosis inyectables semanales secuenciales de dalbavancina (1000 mg, 500 mg semanalmente) es eficaz en el tratamiento de SSTI. El grupo de tratamiento de referencia se trató durante una mediana de duración de 13 días. En el seguimiento, se consideró éxitos clínicos al 94 % de los pacientes clínicamente evaluables tratados con dos dosis de dalbavancina, frente al 76 % de aquellos a los que se les administró una pauta de tratamiento de referencia y el 61,5 % de pacientes que recibieron una sola dosis de dalbavancina.

El organismo aislado más frecuentemente aislado inicialmente fue *S. aureus*. En este ensayo, aproximadamente el 83 % de los pacientes estaban infectados con *S. aureus* y el 38 % de todas las cepas de *S. aureus* eran MRSA. Un único patógeno provocó la mayoría de las infecciones (80 %). Los MIC para dalbavancina contra cepas aisladas grampositivas, incluyendo MRSA, oscilaron entre 0,016 y 0,25 mg/l.

Las tasas de éxito microbiológico igualaron a las de respuesta clínica para la población evaluable clínicamente. Para todos los organismos combinados, el tratamiento con la pauta de dos dosis de dalbavancina semanalmente proporcionó mayores tasas de erradicación en la valoración 2 semanas tras la terapia (92 %) en comparación con terapias de una sola dosis de dalbavancina (58 %) y tratamiento de referencia (71 %). Globalmente, se observaron tasas de erradicación de *S. aureus* en el 90 %, el 50 % y el 60 % de los pacientes, respectivamente. Para la población de MITT, las tasas de erradicación para MRSA fueron del 80 % para la pauta de dos dosis de dalbavancina frente al 50 % tanto para las terapias de una sola dosis de dalbavancina como de tratamiento de referencia.

Las concentraciones de dalbavancina obtenidas al final de los periodos de tratamiento de una sola dosis y dos dosis semanalmente (día 10 o día 20, respectivamente) fueron similares, sugiriendo poca acumulación de fármaco tras la segunda dosis semanal. La mayor tasa de éxito clínico observada con la pauta de dos dosis sugiere destrucción dependiente de tiempo en la que se proporcionaron niveles sostenidos de fármaco o exposición a fármaco con dos dosis de dalbavancina separadas por una semana. Los niveles en plasma de dalbavancina medidos al final del intervalo de dosificación semanal fueron sustancialmente mayores que el MIC<sub>90</sub> notificado para patógenos responsables de la mayoría de SSTI (<0,03 a 0,5 mg/l), incluyendo los encontrados en este ensayo. Estos niveles también estaban por encima de las concentraciones bactericidas mínimas de 4 a 10 mg/l.

La tasa global de reacciones adversas era similar para tanto las pautas de dalbavancina como el grupo de tratamiento de referencia. Los acontecimientos adversos gastrointestinales relacionados con fármacos (es decir, diarrea y náuseas) fueron los más comúnmente notificados en los tres grupos de tratamiento. La mayoría de estos acontecimientos fueron leves y autolimitados. Ningún paciente tratado con dalbavancina se retiró del estudio de manera temprana debido a una reacción adversa, ni se notificó ningún acontecimiento adverso grave atribuible al glicopéptido, sin embargo el 14 % del grupo de tratamiento de referencia se retiró debido a efectos adversos. Por tanto, la nueva pauta posológica tuvo efectos secundarios reducidos adversos en comparación con el tratamiento de referencia. Los datos de este ensayo no encontraron evidencia de que dalbavancina induzca algún grado de hepatotoxicidad o nefrotoxicidad clínicamente significativas.

El tratamiento de dos dosis de dalbavancina parece eficaz para tratamiento de pacientes con SSTI complicadas. En este ensayo clínico se toleró bien dalbavancina a ambas dosis, con un perfil de acontecimientos adversos similar al del grupo de tratamiento de referencia.

#### Ejemplo 2. Farmacocinética y excreción renal de dalbavancina en sujetos sanos

Los objetivos principales de este estudio fueron caracterizar la farmacocinética de dalbavancina y calcular la magnitud de la excreción renal en sujetos sanos que reciben una dosis terapéutica del fármaco. Fue un estudio no comparativo, abierto.

##### *Tratamiento con fármaco del estudio*

Se les administró a sujetos sanos masculinos o femeninos de entre 18 y 65 años de edad una sola dosis i.v. de 1000 mg de dalbavancina infundida durante 30 minutos.

Se reclutaron seis sujetos, una mujer y cinco varones, recibieron medicamento del estudio y completaron todos los aspectos del estudio. Tres sujetos eran de raza blanca y tres sujetos eran afroamericanos. La edad media era de 29,8 años (intervalo de 22 a 63). La altura media era de 68,6 pulgadas (intervalo de 63 a 75) y el peso medio era de 179,6 libras (de 140 a 244).

##### *Farmacocinética*

Se recogieron sangre y orina (recogidas de 24 h) en los días de estudio 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 y 42. Se extrajeron muestras de sangre en tubos heparinizados y se centrifugaron. Se separó el plasma y se almacenó congelado a -20 °C hasta el momento del ensayo. Se sometieron a ensayo muestras de plasma y orina para determinar dalbavancina usando métodos de CL/EM/EM validados. El límite inferior de cuantificación del ensayo era de 500 ng/ml para orina y plasma.

Se estimaron los parámetros farmacocinéticos de dalbavancina mediante métodos no compartimentales usando el software WinNonlin™ (Pharsight Corporation). Los valores de concentración máxima ( $C_{max}$ ) se obtuvieron directamente a partir de los datos observados. El área bajo la curva (AUC) de concentración en plasma-tiempo se calculó usando la regla trapezoidal lineal. El aclaramiento (CL) se calculó como dosis/AUC. La semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) se estimó mediante regresión lineal de la parte log-lineal de la curva de concentración logarítmica frente al tiempo. Se calcularon estimaciones del volumen de distribución ( $V_z$ ) usando los parámetros de regresión, mientras que el volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{ss}$ ) se calculó a partir del área bajo el primer momento de la curva (AUMC) multiplicado por la dosis y dividido entre AUC. La cantidad acumulada de dalbavancina excretada en orina se determinó integrando la tasa de excreción de orina (AURC). El  $CL_R$ , o aclaramiento renal, se calculó como la razón:  $CL_R = AURC/AUC$ .

Las concentraciones en plasma de dalbavancina frente al tiempo se muestran para todos los sujetos en la figura 1. Se presentan parámetros farmacocinéticos en la tabla 9. Las concentraciones eran similares en todos los sujetos. Las concentraciones máximas en plasma eran de aproximadamente 300 mg/l y se lograron inmediatamente tras el final de la infusión. La dalbavancina muestra un volumen de distribución aparente de más de 10 l y se supone que está bien distribuida en el líquido extracelular.

La dalbavancina se eliminó lentamente con una  $t_{1/2}$  de 9-12 días. El aclaramiento total del fármaco era de  $0,0431 \pm 0,0074$  l/h. La fracción estimada de fármaco excretado inalterado en orina era del 42 % de la dosis administrada, y el aclaramiento renal se estimó como 0,018 l/h. La variabilidad observada en los sujetos fue baja con un coeficiente de variación menor del 22 % en todos los parámetros farmacocinéticos.

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos

	$C_{max}$ mg/l	$t_{1/2}$ h	AUC mg.h/l	$V_z$ l	CL l/h	$V_{ss}$ l	AURC mg	% de excreción renal	$CL_R$ l/h
Media	301	257	23843	16,0	0,0431	11,5	419	41,9	0,0181
D.E.	65	21	4526	3,1	0,0074	2,13	27	2,7	0,0036
% de CV	21,6	8,1	19,0	19,5	17,1	18,6	6,4	6,4	20,1
Mín.	243	227	19844	11,7	0,0332	8,58	379	37,9	0,0130
Máx.	394	282	30100	19,6	0,0504	13,9	448	44,8	0,0226

#### Valoraciones de seguridad

Se registraron y valoraron acontecimientos adversos según su gravedad y relación con el fármaco de estudio. Se recogieron datos de laboratorio (análisis químicos, CBC con diferencial, análisis de orina) y se valoraron los cambios desde los valores iniciales y fuera de intervalo. Se obtuvieron ECG, examen físico y signos vitales, y se valoraron los cambios desde el nivel inicial.

La dalbavancina se toleró bien en este estudio. No se notificaron muertes o acontecimientos adversos graves de sujetos durante este estudio y ningún sujeto se retiró prematuramente de este estudio debido a un AA.

Todos los voluntarios notificaron al menos un AA, todos de intensidad leve. Tres voluntarios notificaron AA que estaban posiblemente relacionados con el medicamento del estudio: ALT elevada (valor de 46 UI/l, límite superior de la normalidad 40 UI/l) en un sujeto; eosinofilia (valor  $0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ , límite superior de la normalidad  $0,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ ), LDH elevado (valor 303 UI/l, límite superior de la normalidad 90 UI/l), ALT elevada (valor 54 UI/l, límite superior de la normalidad 40 UI/l), AST elevada (valor 42 UI/l, límite superior de la normalidad 40 UI/l) todo en un sujeto; y acúfenos en un sujeto.

No se observaron tendencias en los resultados de ECG, signos vitales, analíticas y hematología tras el nivel inicial.

#### Discusión

Se toleró bien una sola dosis i.v. de 1000 mg de dalbavancina. Tras una sola infusión intravenosa de 1000 mg, se mantienen concentraciones en plasma de dalbavancina por encima de 45 mg/l durante al menos siete días. Esto está por encima de las concentraciones que se sabe que son bactericidas (4-32 mg/l). Esto apoya el uso de dalbavancina como pauta una vez a la semana. El perfil de eliminación urinaria indica que la excreción renal es una ruta de eliminación importante, con aproximadamente el 40 % excretado en orina. Este hallazgo es consecuente con observaciones en animales. Ya que los riñones no son la ruta de eliminación exclusiva, puede que no sea necesario

un ajuste de la dosificación de dalbavancina en pacientes con disfunción renal.

### Ejemplo 3. Unión a proteínas de dalbavancina usando microcalorimetría de valoración isotérmica

5 Se midió la unión de dalbavancina a proteínas mediante microcalorimetría de valoración isotérmica (ITC) en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 a 25 y 37 °C usando un instrumento de Microcal VP-ITC. En un experimento típico, se inyectaron 25 × 10 µl de proteína (~150 µM) en una celda de calorímetro que contenía disolución de dalbavancina (~5 µM). Se determinaron las concentraciones de dalbavancina y proteína reales midiendo la absorbencia a 280 nm. Los experimentos de control incluyeron inyecciones de proteína en tampón (en ausencia de dalbavancina) para explicar los calores de dilución de proteína en condiciones idénticas. Para comparación, se realizaron experimentos similares con algunas modificaciones necesarias usando teicoplanina.

15 Se llevaron a cabo experimentos con dalbavancina con cada una de las siguientes proteínas: albúmina humana; albúmina de perro; albúmina de rata; albúmina bovina; y α-glicoproteína humana. La teicoplanina se estudió con albúmina y α-glicoproteína humanas. Se muestra una comparación de afinidades de unión a dos temperaturas diferentes en la tabla 10.

Tabla 10. Comparación de afinidades de unión aparentes ( $K_a$ , × 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>)

	25 °C	37 °C
<u>Dalbavancina</u>		
Albúmina humana	1,35 (± 0,2)	1,33 (± 0,15)
Albúmina de rata	3,1 (± 0,5)	2,8 (± 1,8)
Albúmina de perro	0,62 (± 0,09)	0,50 (± 0,13)
Albúmina bovina	1,38 (± 0,14)	
α-Glicoproteína	1,84 (± 0,36)	4,8 (± 2,3)
<u>Teicoplanina</u>		
Albúmina humana	0,96 (± 0,08)	
α-Glicoproteína	0,07 (± 0,01)	

20

Los ± errores entre paréntesis son las desviaciones estándar obtenidas de la rutina de ajuste.

25 Se analizaron efectos térmicos integrados, después de la corrección para calores de dilución, mediante regresión no lineal usando un modelo de unión a un solo sitio simple con el paquete de software convencional Microcal ORIGIN. Se integraron los datos en bruto (µcal/s) para cada inyección para dar el efecto térmico total por adición, entonces se dividió entre la cantidad de inyectante para dar kcal/mol de inyectante. Se aplicó la misma integración para efectos de dilución de control, y esto se restó de los datos de valoración reales. Esto proporcionó un diferencial de la curva de unión en la que la magnitud de unión es proporcional al calor total liberado (o absorbido). Entonces, se analizó esto mediante métodos de regresión no lineal en cuanto a diversos modelos de unión convencionales. El modelo más simple supone equilibrio de unión no competitiva simple, y proporciona tres parámetros:

30

$K_a$  (= 1/ $K_{dis}$ ) es la asociación de unión (constante de disociación)

35

$\Delta H$  = la entalpía de unión (el tamaño de señal relacionada con unión)

N = número de sitios de unión (asumiendo que el modelo de unión es correcto)

40 Asumiendo unión no competitiva, N es el número (relativo) de moles de inyectante requeridos para saturar todos los sitios de unión disponibles en la muestra. Para los experimentos de dalbavancina, dalbavancina es la "muestra" y la proteína (HSA, etc.) es el "inyectante". Estos resultados preliminares indican que la unión es relativamente débil y, debido a la escasa solubilidad de la dalbavancina, es difícil determinar la estequiometría de unión (N) inequívocamente. Sin embargo, tal como se observa en la figura 2, en todos los casos, los datos se ajustan bien con N<1 (es decir, menos de uno a uno de proteína respecto a dalbavancina). En consecuencia, un valor de N = 0,5 significa que solo son necesarios la mitad de los moles de proteína para unir toda la dalbavancina de lo que cabría esperar. Dicho de otro modo, cada proteína se une aparentemente a dos moléculas de dalbavancina. Es posible que la dalbavancina forme un dímero que se une 1:1 con una proteína. Los resultados de modelado de estequiometría de unión sugieren que dos moléculas dalbavancina se unen a una molécula de proteína, a diferencia de teicoplanina, que muestra unión 1:1.

50 La tabla 11 presenta el porcentaje calculado unido para concentraciones de antibiótico en el intervalo 1-500 µM, suponiendo concentraciones fisiológicas de albúmina sérica humana (6 × 10<sup>-4</sup> M) y α-glucopéptido (1,5 × 10<sup>-5</sup> M). Para relacionar esto con la situación clínica, la concentración máxima de dalbavancina en el hombre es aproximadamente de 300 mg/l, o 165 µM.

55

Tabla 11. Porcentaje calculado de unión de teicoplanina y dalbavancina a proteínas plasmáticas

Concentración de antibiótico ( $\mu\text{M}$ )	Dalbavancina	Teicoplanina
Albúmina humana		
1	98,8	98,3
10	98,8	98,3
100	98,7	98,0
165	98,6	ND
250	98,5	ND
500	98,0	ND
$\alpha$ -Glicoproteína humana		
1	73,0	9,6
10	68,2	9,1
100	26,2	6,0
165	16,9	ND
250	11,4	ND
500	5,9	ND

ND = no realizado

- 5 En estos experimentos, la unión de dalbavancina a albúmina sérica humana supera el 98 %. La fracción unida es bastante constante en el intervalo seleccionado de concentraciones de dalbavancina, es decir 1-500  $\mu\text{M}$ . Este intervalo abarca las concentraciones terapéuticas en el hombre. La unión de dalbavancina a  $\alpha$ -glicoproteína es mucho mayor que la de teicoplanina. La dalbavancina demuestra alta capacidad y baja afinidad por proteínas plasmáticas de diferente origen, con valores de  $K_a$  similares en proteínas de todas las especies sometidas a prueba.
- 10 Estos resultados ayudan a explicar algunas de las características farmacocinéticas únicas de la dalbavancina. La unión y formación de un complejo de dalbavancina:proteína 2:1 también explica la semivida prolongada, y el volumen de distribución aparente, que se aproxima al volumen de agua extracelular. La baja afinidad ayuda a explicar la actividad *in vivo* observada, que supera enormemente lo que cabría esperar para un compuesto con una fracción libre cercana al 1 %. La alta capacidad de las proteínas plasmáticas ayuda a explicar las concentraciones
- 15 en plasma relativamente altas logradas a pesar de la escasa solubilidad del compuesto a pH fisiológico.

#### Ejemplo 4. Atributos farmacocinéticos y distribución tisular de dalbavancina en ratas

- 20 Se realizaron dos estudios en ratas a las que se les administró una sola infusión i.v. de 20 mg/kg de [ $^3\text{H}$ ]-dalbavancina. Se recogieron excrementos y más de 40 tejidos diferentes a lo largo de 70 días tras la administración, y se determinó la distribución tisular y farmacocinética de la radioactividad derivada del fármaco.

- 25 Para estos estudios, se usó [ $^3\text{H}$ ]-dalbavancina purificada por HPLC. El fármaco radiomarcado se preparó mediante intercambio de tritio y se purificó por HPLC.

#### *Estudio de balance de masa en ratas*

- 30 Se llevaron a cabo estudios de balance de masa para determinar el patrón de excreción de dalbavancina tras una sola infusión intravenosa (i.v.) de dalbavancina en ratas macho.

- 35 Quince ratas Sprague-Dawley macho recibieron una sola dosis i.v. de  $^3\text{H}$ -dalbavancina (20 mg/kg, 100  $\mu\text{Ci}$ /rata). Tras la administración de la dosis, se recogieron orina y heces a intervalos de 24 horas hasta 14, 36 y 70 días después de la dosis (3 ratas/tiempo de recogida final). También se recogieron lavados de jaula con agua y metanol. Se analizaron los cadáveres al final del periodo de recogida. Todas las muestras se analizaron para determinar su contenido de radioactividad total mediante recuento de centelleo líquido (LSC).

- 40 Tras la administración i.v. de  $^3\text{H}$ -dalbavancina en ratas, se eliminó la radioactividad derivada de fármaco tanto en orina ( $\sim 2/3$  de radioactividad excretada) como en heces ( $\sim 1/3$  de radioactividad excretada). Aproximadamente la mitad de la radioactividad administrada se eliminó en la orina y heces en el plazo de la primera semana, lo que concuerda con una  $t_{1/2}$  en plasma de aproximadamente 1 semana. A los 70 días después de la dosis, solo el 4,5 % de la dosis permanecía en el cadáver. Se recuperó radioactividad despreciable en los lavados de jaula. Prácticamente toda la radioactividad administrada (orina, heces, cadáver, lavados de jaula e intercambio de tritio) se explicó durante el estudio.

#### *Estudio de distribución tisular cuantitativa (QTD) en ratas*

- 45 Se llevaron a cabo estudios de distribución tisular cuantitativa para valorar la distribución tisular de dalbavancina tras una sola infusión i.v. de dalbavancina a ratas macho.

- 50 Cuarenta y una ratas Sprague-Dawley macho recibieron una sola infusión i.v. de  $^3\text{H}$ -dalbavancina (20 mg/kg,

50 ( $\mu\text{Ci/rata}$ ). Las ratas (3 por punto de tiempo) se sometieron a eutanasia a las 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 336, 840, 1176 y 1680 horas después de la dosis para la recogida de sangre, plasma y tejidos (incluyendo cadáver). Todas las muestras se analizaron por LSC.

5 Se determinaron los perfiles concentración-tiempo para más de 40 tejidos, incluyendo riñón, hígado, bazo, sangre, plasma, pulmón y piel. Las concentraciones y valores  $t_{1/2}$  de la radioactividad derivada de fármaco en tejidos, incluyendo piel, fueron comparables a los observados en plasma. Se encontró que la dalbavancina se distribuyó rápida y ampliamente teniendo todos los tejidos concentraciones cuantificables de radioactividad derivada de fármaco en un plazo de 12 horas después de la post-infusión. La mayoría de tejidos alcanzaron la concentración máxima ( $C_{\text{max}}$ ) en un plazo de 24 h después de la dosis. La radioactividad recuperada después de 5 días era de <5 % de la dosis en cualquier tejido individual. A los 70 días después de la dosis, solo el cadáver conservaba >1 % (2,34 %) de la radioactividad administrada. Por tanto, la dalbavancina no se acumuló en ningún tejido, órgano o componente celular sanguíneo individual. Las concentraciones de radioactividad en el SNC eran bajas pero detectables en este modelo animal sano. Se encontró que la dalbavancina penetra en la piel con concentraciones de radioactividad derivada de fármaco que eran tal altas como o mayores que en plasma. La razón en sangre con respecto a plasma de radioactividad derivada de fármaco permaneció relativamente constante a lo largo del tiempo y era <1.

20 Como parte de los estudios de QTD, se recogieron muestras de bilis de ratas con el conducto biliar canulado (4 animales) durante 384 h (16 días) después de la dosis. Casi el 11 % de la dosis se recuperó en la bilis a lo largo de 384 h después de la dosis. Esto representa la mayoría de la radioactividad derivada de fármaco hallada en heces.

#### Ejemplo 5. Determinación cuantitativa de dalbavancina en plasma mediante HPLC-EM/EM

25 Se desarrolló un método de HPLC-EM/EM para la medición cuantitativa de dalbavancina en plasma, tal como se describe a continuación.

#### *Preparación de patrones de control de calidad y calibración de dalbavancina*

30 Se prepararon disoluciones madre de dalbavancina disolviendo dalbavancina en agua desionizada para preparar una disolución de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , seguido de diluciones en serie en agua desionizada para preparar disoluciones de 500, 50 y 10  $\mu\text{g/ml}$ .

35 Se prepararon patrones de calibración de concentración de dalbavancina de 100, 60 y 40  $\mu\text{g/ml}$  realizando adiciones conocidas en plasma humano de volúmenes apropiados de una disolución madre de dalbavancina de 1000  $\mu\text{g/ml}$  preparada tal como se describió anteriormente. Se prepararon patrones de calibración de concentración 20 y 10  $\mu\text{g/ml}$  realizando adiciones conocidas en plasma humano de volúmenes apropiados de una disolución madre de dalbavancina de 500  $\mu\text{g/ml}$ , y se preparó un patrón de calibración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  realizando adiciones conocidas en plasma humano de un volumen apropiado de una disolución madre de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

40 Se prepararon patrones de control de calidad de 90 y 30  $\mu\text{g/ml}$  de dalbavancina realizando adiciones conocidas en plasma humano de un volumen apropiado de una disolución madre de dalbavancina de 1000  $\mu\text{g/ml}$  preparada tal como se describió anteriormente. Se preparó un patrón de control de calidad de 1,5  $\mu\text{g/ml}$  realizando adiciones conocidas en plasma humano de un volumen apropiado de una disolución de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

#### *Preparación de disolución de trabajo de patrón interno*

50 Se preparó tal como sigue una disolución de trabajo de 30  $\mu\text{g/ml}$  de patrón interno BI-K0098, que es el derivado de dietilaminopropilamino de A-40926. Se disolvieron aproximadamente 10 mg de BI-K0098 en aproximadamente 10 ml de fase móvil A (el 80 % de formiato de amonio/ácido fórmico 10 mM, pH 3 (v/v), el 10 % de acetonitrilo (v/v) y el 10 % de 2-propanol (v/v)) para preparar una disolución madre de patrón interno de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Entonces, la disolución madre (300 ml) se diluyó hasta un volumen de 10 ml con fase móvil A para preparar una disolución de patrón interno de 30  $\mu\text{g/ml}$ .

#### *Preparación de muestras para análisis*

60 Se prepararon muestras tal como sigue para la determinación cuantitativa de la concentración de dalbavancina en plasma. A 50  $\mu\text{l}$  de patrones de calibración o de control de calidad preparados tal como se describió anteriormente, se les añadieron 100  $\mu\text{l}$  de disolución normalizada de trabajo de patrón interno y se mezclaron. Se dejó que la mezcla se equilibrara durante cinco minutos a temperatura ambiente, seguido de adición de 250  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo. Entonces se agitó la mezcla en vórtex durante 10 segundos, seguido de centrifugación durante 1 minuto a aproximadamente 10 000 rpm en una microcentrífuga 4214 de ALC. Se transfirió el sobrenadante a tubos limpios y se evaporó hasta sequedad en un sistema Savant Speed-Vac a aproximadamente 40 °C. Entonces se resuspendieron las muestras en 150  $\mu\text{l}$  de fase móvil A.

65

*Método analítico*

Se inyectaron muestras de 50 µl preparadas para análisis tal como se describió anteriormente en una columna Fenomenex Jupiter C<sub>18</sub> (50 × 2 mm, C<sub>18</sub> 5 µm 300 Å), y se analizaron en condiciones de HPLC en gradiente a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Las condiciones en gradiente eran: inicial, el 80 % de fase móvil A/el 20 % de fase móvil B (el 20 % de formiato de amonio/ácido fórmico 10 mM, pH 3 (v/v), el 40 % de acetonitrilo (v/v), el 40 % de 2-propanol (v/v)); 1 minuto, el 20 % de fase móvil A/el 80 % de fase móvil B; 2 minutos, el 20 % de fase móvil A/el 80 % de fase móvil B; 2,5 minutos, vuelta a condiciones iniciales.

El sistema de HPLC se acopló con un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple PE SCIEX API-2000, con turboión spray operando en un modo de ionización positivo. Se usó aire para generar un spray en la fuente de iones. Se fijó la temperatura de sonda a 500 °C con nitrógeno como gas cortina. Se empleó monitorización de reacciones múltiples (MRM) usando nitrógeno como gas de colisión. Los analitos se detectaron por monitorización de las siguientes transiciones de iones: 909,3 Da → 1429,3 Da para dalbavancina, y 923,3 Da → 1457,3 Da para el patrón interno (BI-K0098). Para evitar la contaminación del espectrómetro de masas, se realizó una derivación del flujo después de columna en el primer minuto y 2,5 minutos después del comienzo del ciclo cromatográfico.

Se usó el software Sample Control 1.4 para la adquisición de análisis de datos y se usó el software MacQuan 1.6 para la integración de picos cromatográficos y evaluación de datos estadísticos.

*Curvas de calibración*

Se valoró la linealidad del método de ensayo sometiendo a ensayo patrones de calibración para generar una curva de calibración. La concentración de dalbavancina en una muestra de plasma se determinó calculando la razón de áreas de pico entre dalbavancina y el patrón interno.

Se construyeron curvas de calibración para las concentraciones de dalbavancina a lo largo de un intervalo analítico de 0,5-100 µg de dalbavancina/ml de plasma humano usando la ecuación  $y = A + Bx$  (ponderado  $1/x$ ), donde A representa la ordenada en el origen de la curva, B representa la pendiente de la curva, x representa la concentración de dalbavancina del patrón de calibración (µg/ml) e y representa la razón de áreas de pico de dalbanvancina con respecto al patrón interno. Se construyeron tres curvas de calibración independientes. Los resultados mostraron que la razón de áreas de dalbavancina/patrón interno y las concentraciones de dalbavancina variaban linealmente a lo largo del intervalo analítico. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) era de 0,5 µg de dalbavancina por ml de plasma humano. Las pendiente de las curvas de calibración eran reproducibles y sus coeficientes de correlación eran mayores de 0,9995.

*Estabilidad de dalbavancina en plasma*

La estabilidad de dalbavancina en muestras de plasma se sometió a prueba analizando tres patrones de control de calidad por duplicado de muestras de plasma humano, preparadas tal como se describió anteriormente, a dos concentraciones diferentes, 1,5 y 90 µg/ml. La concentración de dalbavancina detectable era estable después de tres ciclos de tratamiento de congelación-descongelación. La concentración de dalbavancina en muestras procesadas era estable después de 24 horas a temperatura ambiente. No se observó reducción en la concentración de dalbavancina con respecto a las muestras de tiempo cero.

Ejemplo 6. Análisis por espectroscopía de masas de dalbavancina.

Se investigó la naturaleza de multímeros de dalbavancina en disolución y se determinaron las condiciones que influyen en la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros de dalbavancina mediante espectroscopía de masas por electrospray (ESI-EM).

Se realizaron los experimentos usando un espectrómetro de masas API III+ de Applied Biosystem dotado de una fuente de turboión spray, un analizador de cuadrupolo triple, operando en modo de iones positivos. Se notifican las condiciones optimizadas en la tabla 12 a continuación.

Tabla 12: Condiciones instrumentales para análisis de dalbavancina en espectrómetro de masas API III+ de Applied Biosystem.

Fuente de ionSpray:		Analizador de EM:	
Tensión de ionSpray	5000 V	Tensión de placa de interfase	650 V
Tensión de placa de orificios	80 V	Tensión de compensación de Road en Q0	40 V
Flujo de gas cortina	0,6 l/min	Masa de Park en Q1	1000
Flujo de gas nebulizador	1,2 l/min	Resolución en Q1	120,8

Flujo de líquido	5 $\mu$ l/min	Diferencia de masa en Q1	0,2
Calentador de interfase	60 °C	Tensión de compensación de Road en Q1	27 V
		Tensión de lente 7	-50 V
		Tensión de compensación de Road en Q2	-50 V
Condiciones de barrido (barrido Q1):		Masa de Park en Q3	1000
		Resolución en Q3	110
		Diferencia de masa en Q3	0
Paso	0,1 $\mu$ m	Tensión de compensación de Road en Q3	-70 V
		Tensión de lente 9	-250 V
Tiempo de permanencia	1 ms	Tensión de placa de Faraday	-250 V
		Tensión de multiplicador de electrones en canal	-3800 V

### *Dalbavancina en disolución*

Se ajustaron los parámetros instrumentales en una disolución de dalbavancina que contenía 0,1 mg/ml de dalbavancina disuelta en una disolución de agua:isopropanol 8:2. Se adquirió un espectro de dalbavancina en disolución en el intervalo de 500-2000 uma tras inyección directa de la disolución. El espectro resultante, tal como se observa en la figura 3, indica la presencia de multímeros de dalbavancina. Como ejemplo no limitativo, se atribuye un perfil del espectro al homomultímero de  $B_0$ , que está presente como especie iónica ( $2nM + y^{+3}$ ), donde  $n$  es un número entero positivo que indica la multiplicidad del homomultímero, por ejemplo,  $n = 1$  cuando el multímero es un homodímero y  $n = 2$  cuando el multímero es un homotetrámero,  $M$  indica la masa del monómero,  $y = n y^{+3}$  indica una carga iónica de más tres. Por ejemplo, se proporciona el homodímero de  $B_0$  cuando  $n = 1$ ,  $y = 1$ , y  $M =$  masa de  $B_0$ . Esta especie de homodímero se asigna a un perfil iónico ( $2M^{+3}$ ) en el espectro de masas.

### *Influencia de la concentración de dalbavancina sobre la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros*

La influencia de la concentración de dalbavancina sobre la razón de población de multímeros con respecto a monómeros se evaluó mediante espectroscopía de masas usando las condiciones descritas anteriormente. Los espectros se adquirieron mediante infusión directa de disoluciones de dalbavancina en concentraciones de 20, 40, 60 y 80  $\mu$ g/ml. Se notificaron las intensidades de los picos principales como función de la concentración de dalbavancina y se determinaron las razones de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina, tal como se muestra en la figura 4.

Los datos indican que la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros de dalbavancina aumenta con concentración creciente. Esto puede ayudar a explicar las altas capacidades de carga de fármaco que pueden administrarse a un individuo. La función del multímero como depósito del monómero puede disminuir la tendencia de las muestras de concentración mayor a formar precipitados y potenciar las concentraciones que pueden administrarse a un individuo. La presencia de multímeros también puede permitir una rápida administración de una dosis de dalbavancina a un individuo.

Se proporciona un ejemplo no limitativo de un método de determinación de la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros, por ejemplo, determinando la razón entre intensidades de pico de iones A y B tal como se muestra en la figura 3. Dividir la intensidad de pico A entre la intensidad de pico B proporciona una medida de la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros.

### *Influencia del pH sobre la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros*

Se evaluó la influencia del pH de disolución sobre la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros en las condiciones instrumentales descritas anteriormente y a los siguientes valores de pH de disolución: 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 y 5,5. Se determinó la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros a cada uno de los valores de pH y se representó gráficamente frente al pH, tal como se observa en la figura 5. Se determinó que la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros aumenta con pH creciente.

Aunque sin estar limitado a la teoría, se cree que los grupos iónicos, tales como un grupo carboxilato en un primer monómero de dalbavancina, ayudan en la estabilización de multímeros de dalbavancina formando interacciones iónicas con iones de carga opuesta, tales como grupos nitrógeno terciario, en un segundo monómero de dalbavancina. El pH puede influir en tales interacciones iónicas. Se cree que la tendencia creciente de la dalbavancina a estar presente como multímero a pH mayores indica que las interacciones iónicas son importantes en la estabilización de multímeros. En particular, se cree que los multímeros de dalbavancina se desestabilizan a pH

inferior, presumiblemente debido a la interrupción de las interacciones iónicas que contribuyen a la estabilidad de multímeros ya que ciertos grupos funcionales, tales como grupos carboxilato, pueden protonarse a valores de pH inferiores.

5 *Influencia de la fuerza iónica en disolución sobre la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros*

Se determinó la influencia de la fuerza iónica en disolución sobre la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros mediante espectrometría de masas. Los espectros de masas se obtuvieron en modo positivo de electrospray en un instrumento de trampa de iones Finnigan LCQDeca previamente ajustado y calibrado en modo de electrospray usando Ultramark 1621, cafeína y MRFA (L-metionil-arginil-fenilalanil-arginina). Todos los espectros de masas se registraron usando las condiciones enumeradas en la tabla 13. Los parámetros de muestra que se investigaron se enumeran en la tabla 14.

15 Tabla 13. Condiciones de EM

<i>Condiciones de entrada de muestra:</i>	
Temperatura capilar (°C):	200
Gas protector (N <sub>2</sub> , unidades arbitrarias):	40
<i>Parámetros de tensión de entrada de muestra:</i>	
Polaridad:	positiva
Tensión de fuente (kV):	4,70
Tensión capilar (V):	34
Compensación de lente tubular (V):	-60
<i>Condiciones de barrido completo:</i>	
Intervalo de barrido (uma):	500-2000
Número de microbarridos:	3
Tiempo de ion máximo (ms):	200
<i>Condiciones de barrido ampliado:</i>	
Intervalo de barrido (uma):	1218-1228
Número de microbarridos:	5
Tiempo de ion máximo (ms):	50

Tabla 14. Parámetros de muestra

Muestra	µg/ml	Disolvente	pH
Dalbavancina	100	COO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 5 mM	5
	100	COO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 5,0 mM	5
	100	COO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 100 mM	5

20 Se infundieron las disoluciones acuosas de muestra a 10 µl/min mediante una bomba de jeringa Harward y se obtuvieron los espectros de masas tal como se observa en las figuras 6-8.

25 Los espectros obtenidos indican que la fuerza iónica influye en la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros. Se encontró que un aumento de concentración de tampón se corresponde con una disminución en los perfiles de masas de multímeros y por tanto una disminución en la razón de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros.

30 Tal como se mencionó, se cree que las interacciones iónicas son importantes en la estabilidad de multímeros de dalbavancina. El hecho de que aumentar la fuerza iónica estuviera correlacionado con la disminución de intensidad de perfiles de masas de multímeros prueba el papel de las interacciones iónicas en la estabilidad de multímeros. Sin embargo, ya que los perfiles de masas de multímeros estaban presentes incluso a fuerza iónicas mayores, otra segunda interacción puede estar implicada en la estabilización de multímeros.

35 Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que las interacciones hidrófobas son importantes para estabilizar las especies de multímeros de dalbavancina. Si la estabilización de estos multímeros no covalentes de dalbavancina se debiera únicamente a interacciones iónicas, se esperaría que un aumento en la fuerza iónica diera como resultado una pérdida total de especies de masas de multímeros. Es decir, se esperaría que a medida que aumente la fuerza iónica de la disolución, las interacciones iónicas que estabilizan el multímero se alterarían debido a la población aumentada de iones en disolución, con los que los monómeros se asociarían más fácilmente. En consecuencia, la fuerza iónica de la disolución conduciría a que los multímeros se disocien en componentes de monómero y los espectros de masas resultantes estarían libres de cualquier perfil de masas de multímeros. Sin embargo, incluso a una fuerza iónica de disolución alta (tal como formiato de amonio 100 mM), se detecta la presencia de multímeros de dalbavancina en el espectro de masas. Por consiguiente, se considera que los multímeros de dalbavancina se estabilizan, al menos en parte, mediante interacciones hidrófobas.

*Compuesto similar estructuralmente*

Se cree que la eficacia mejorada de la dalbavancina se debe al menos en parte a su capacidad para formar multímeros. Se cree que incluso compuestos muy similares estructuralmente no comparten su característica única. Se investigó la capacidad para formar multímeros de un compuesto con una estructura química similar a dalbavancina mediante análisis por espectroscopía de masas. Se obtuvieron los espectros de masas en modo positivo de electrospray en un instrumento de trampa de iones Finnigan LCQ<sup>Deca</sup> previamente ajustado y calibrado en modo de electrospray usando Ultramark 1621, cafeína y MRFA (L-metionil-arginil-fenilalanil-arginina). Todos los espectros de masas se registraron usando las condiciones enumeradas en la tabla 15. Los parámetros de muestra que se investigaron se enumeran en la tabla 16. Se infundieron las disoluciones acuosas de muestra a 10 µl/min mediante una bomba de jeringa Harvard y se obtuvieron espectros de masas tal como se observa en las figuras 9 y 10.

Tabla 15. Condiciones de espectros de masas

<i>Condiciones de entrada de muestra:</i>	
Temperatura capilar (°C):	200
Gas protector (N <sub>2</sub> , unidades arbitrarias):	40
<i>Parámetros de tensión de entrada de muestra:</i>	
Polaridad:	positiva
Tensión de fuente (kV):	4,70
Tensión capilar (V):	34
Compensación de lente tubular (V):	-60
<i>Condiciones de barrido completo:</i>	
Intervalo de barrido (uma):	500-2000
Número de microbarridos:	3
Tiempo de ion máximo (ms):	200
<i>Condiciones de barrido ampliado:</i>	
Intervalo de barrido (uma):	1218-1228
Número de microbarridos:	5
Tiempo de ion máximo (ms):	50

Tabla 16. Parámetros de muestra

Muestra	µg/ml	Disolvente	pH
Teicoplanina	50	H <sub>2</sub> O	n.a.
	100	H <sub>2</sub> O	n.a.

n.a. = no ajustado

Un antibiótico glicopeptídico similar (teicoplanina) no muestra complejos multiméricos en disolución a diversas concentraciones. Esto apoya la indicación de que compuestos similares estructuralmente no pueden formar especies multiméricas en disolución, y que este fenómeno puede desempeñar un papel importante en la actividad de la dalbavancina.

Ejemplo 7. Espectroscopía de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF) de complejos proteína-dalbavancina

Se mezclaron 10 µl de HSA, 0,150 mM con 10 µl de disolución de dalbavancina (de 0,075 mM, 0,15 mM, 0,3 mM y 1,5 mM) y se incubaron durante 60 min a 37 °C. Se prepararon las muestras para análisis usando la técnica de gota secada. Se obtuvieron espectros en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo BRUKER FLEX III, previamente ajustado y calibrado usando albúmina sérica bovina patrón, adquiriendo y calculando el promedio de los espectros generados por 200 disparos de láser. Matriz: 9 partes de DHB-9 (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) saturado en acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (50:50), 1 parte de ácido sinapínico saturado en acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (50:50). 0,5 µl de disolución de muestra y 0,5 µl de disolución matriz se mezclaron y situaron en la diana del láser.

La dalbavancina se une a la proteína como monómero (1 HSA + 1 dalbavancina). A razones muy altas de dalbavancina con respecto a proteína (1:2, 1:10), puede observarse la presencia de complejos que contienen 2 moléculas de dalbavancina por molécula de proteína.

Ejemplo 8. Calorimetría de valoración isotérmica de unión de la unión de dalbavancina a N,N'-diacetil-Lys-D-Ala-D-Ala en presencia de albúmina sérica humana

La unión de dalbavancina a N,N'-diacetil-Lys-D-Ala-D-Ala, un péptido análogo de dianas de pared celular de

dalbavancina, se investigó mediante calorimetría de valoración isotérmica (ITC) en presencia de HSA a lo largo de un intervalo de concentraciones (hasta 600  $\mu\text{M}$ ) a 25 °C, con algunas mediciones adicionales a 37 °C. HSA aumentó la solubilidad de la dalbavancina y redujo su afinidad de unión por el ligando tripeptídico. Se compararon los resultados con los de vancomicina. Los efectos observados se alcanzaron una meseta a concentraciones de HSA relativamente bajas, consecuente con un modelo de unión no competitiva que permite la unión de ligando a dalbavancina ambos libres en disolución y (más débilmente) al complejo dalbavancina-HSA.

Experimentos preliminares demostraron que, en ausencia de proteínas séricas, dalbavancina y vancomicina muestran perfiles de unión similares: ambas dan unión exotérmica a *N,N'*-diacetil-Lys-D-Ala-D-Ala, pero sin evidencia de unión a dipéptido (D-Ala-D-Ala) o a Lys-D-Ala-D-lactato. Para la interacción dalbavancina/tripeptido, los datos eran consecuentes con la unión con  $K_{\text{dis}} = 1\text{-}10 \mu\text{M}$ , dependiendo de la temperatura, similar a vancomicina en las mismas condiciones. En presencia de HSA, la solubilidad de dalbavancina aumenta significativamente y la afinidad de unión por el tripeptido se reduce de una manera consecuente con unión competitiva o no competitiva de HSA para el antibiótico. Los experimentos descritos en este ejemplo se diseñaron con el fin de: (a) comparar mediciones de dalbavancina/tripeptido a diferentes temperaturas (25 °C y 37 °C) y diferentes concentraciones de HSA; (b) usar estos datos para construir un modelo de unión para comparar con los números observados.

Biosearch Italia suministró la dalbavancina. Otros reactivos eran de Sigma: clorhidrato de vancomicina (Sigma V-2002, fw 1485,7), *N,N'*-diacetil-Lys-D-Ala-D-Ala (Sigma D-9904, fw 372,4), albúmina humana (HSA; Sigma A-3782; mw 69,366).

Se disolvieron antibióticos y péptidos en tampón acuoso (fosfato de Na 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) que contenía HSA, con agitación suave inmediatamente antes de cada experimento. Las concentraciones de péptidos se determinaron en peso. Las concentraciones de dalbavancina se determinaron o bien en peso o bien por absorbancia UV usando los coeficientes de extinción molar  $\epsilon = 12430$  (dalbavancina,  $A_{280}^{1\%} = 68,42$ ),  $\epsilon_{280} = 6690$  (vancomicina). Las concentraciones de HSA se determinaron por absorbancia UV (HSA,  $\epsilon_{280} = 37\,700$ ;  $A_{280}^{1\%} = 5,44$ ). Los espectros se registraron a temperatura ambiente en cubetas de cuarzo con paso óptico de 1 cm usando espectrofotómetros Shimadzu UV-160A o UV-1601, con muestras diluidas cuantitativamente con tampón si era necesario para dar una absorbancia en el intervalo de 0,1-1 A.

Se realizó calorimetría de valoración isotérmica usando un instrumento Microcal VP-ITC a 25 °C y 37 °C usando procedimientos normalizados de trabajo. Véanse, por ejemplo, Wiseman *et al.*, *Anal. Biochem.* (1989) 179, 131-137; Cooper, *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A-Math. Phys. Eng. Sci.* (1993) 345, 23-35; Cooper, A., microcalorimetría de valoración isotérmica en C. Jones, B. Mulloy y A. H. Thomas (Eds.), *Microscopy, Optical Spectroscopy, and Macroscopic Techniques*. Humana Press, Totowa, NJ, (1994) págs. 137-150; Cooper, A., Microcalorimetría de interacciones proteína-proteína en J. E. Ladbury y B. Z. Chowdhry (Eds.); *Biocalorimetry: The Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. Wiley, (1998) págs. 103-111; y Cooper, A., *Curr. Opin. Chem. Biol.* (1999) 3, 557-563. Antes de la carga, se desgasificaron suavemente las muestras para evitar la formación de burbujas en la celda del calorímetro. Cada experimento normalmente comprendió 25 inyecciones de 10  $\mu\text{l}$  de disolución de péptido ( $\approx 1 \text{ mM}$ ) en la celda del calorímetro (volumen  $\approx 1,4 \text{ ml}$ ) que contenía disolución de antibiótico ( $\approx 20\text{-}100 \mu\text{M}$ ). Los experimentos de control implicaban la inyección de ligando en tampón en condiciones idénticas para determinar los calores de dilución de péptido, y se usaron estos valores para la corrección de datos de unión en bruto antes del análisis. Los experimentos de unión de dalbavancina/tripeptido se repitieron varias veces a cada temperatura. Los datos de unión de ITC se analizaron usando software convencional Microcal ORIGIN™ para determinar el número aparente de sitios de unión (N), la afinidad de unión ( $K_{\text{as}} = 1/K_{\text{dis}}$ ) y la entalpía de unión ( $\Delta\text{H}$ ).

TABLA 17

Datos termodinámicos para la unión de la unión de tripeptido a dalbavancina y vancomicina determinados mediante ITC suponiendo un modelo de unión no cooperativa simple: efectos de temperatura y HSA.

	T °C	N	$K_{\text{as}}$ $\text{M}^{-1}$	$K_{\text{dis}}$ $\mu\text{M}$	$\Delta\text{H}$ kcal/mol	$\Delta\text{S}$ eu	[HSA] $\mu\text{M}$	
Dalbavancina	10	0,59	6,70E+05	1,49	-10,26	-9,60	0	
	10	0,59	9,20E+05	1,09	-8,95	-4,30	0	
	10	0,59	6,85E+05	1,46	-10,30	-9,60	0	
	10	0,56	6,24E+05	1,60	-10,30	-9,90	0	
	25	0,6	3,13E+05	3,19	-10,10	-8,90	0	
	25	x	3,30E+05	3,03	-11,30	-12,60	0	
	25	x	3,20E+05	3,13	-11,70	-14,00	0	
	25	x	2,80E+05	3,57	-14,30	-23,00	0	
	25	0,57	3,03E+05	3,30	-12,60	-17,00	0	
	25	0,74	3,19E+05	3,13	-11,20	-12,50	0	
	25	0,54	3,93E+05	2,54	-12,90	-17,60	0	
	Con HSA	25	0,37	1,18E+05	8,47	-26,40	-65,50	13,6

Con HSA	25	0,35	1,18E+05	8,47	-27,80	-70,10	13,6
Con HSA	25	0,68	3,50E+04	28,57	-20,00	-46,20	34,2
Con HSA	25	0,83	2,76E+04	36,23	-16,90	-36,50	80,7
Con HSA	25	1,38	3,49E+04	28,65	-18,60	-41,70	104
Con HSA	25	0,9	3,10E+04	32,26	-21,05	-50,00	288
Con HSA	25	1,242	2,84E+04	35,21	-19,50	-44,90	430
Con HSA	25	0,86	2,18E+04	45,87	-15,00	-30,40	601
	37	0,82	1,30E+05	7,69	-12,50	-16,80	0
	37	0,6	1,10E+05	9,09	-17,40	-33,20	0
Con HSA	37	0,179	1,25E+04	80,00	-98,60	-299,00	482
Con HSA	37	0,5	9568	104,52	-26,60	-67,60	516
<u>Vancomicina</u>	10	1,1	6,90E+05	1,45	-9,49	-6,80	0
	25	0,91	3,40E+05	2,94	-10,70	-10,60	0
	25	0,97	3,60E+05	2,78	-12,90	-17,80	0
Con HSA	25	1,05	2,90E+05	3,45	-10,09	-8,80	513

Los experimentos ITC en la unión de tripéptido a dalbavancina en ausencia de HSA proporcionan datos consecuentes para afinidades de unión, con  $K_{dis}$  promedio en la región de 1,4, 3,1 y 8,4  $\mu\text{M}$  a 10, 25 y 37 °C respectivamente (tabla 17). La unión es exotérmica. Los cálculos de concentración en este caso indican que N se aproxima más a 0,5 en estas condiciones. Esto es consecuente con la unión de una molécula de tripéptido por dímero de dalbavancina en estas condiciones. Estas afinidades de unión y entalpías de unión son comparables a las observadas con vancomicina en las mismas condiciones (tabla 17, y D. McPhail, A. Cooper, J. Chem. Soc.-Faraday Trans. (1997) 93, 2283-2289.). Obsérvese también que la vancomicina experimenta dimerización inducida por ligando a mayores concentraciones.

La adición de HSA a las mezclas de dalbavancina reduce la afinidad de unión aparente entre tripéptido y dalbavancina, aunque la unión es más exotérmica aparentemente (tabla 17). La dependencia de la concentración de HSA para esto a 25 °C se muestra en la figura 11. Después de una subida inicial (debilitación) en la  $K_{dis}$  aparente hasta HSA 35  $\mu\text{M}$ , permanece relativamente constante para concentraciones de HSA superiores aproximándose a niveles fisiológicos (600  $\mu\text{M}$ ). El nivel de meseta a concentraciones altas de HSA ( $K_{dis} \approx 35 \mu\text{M}$ ) corresponde a una afinidad de unión alrededor de 10-12x más débil que en ausencia de HSA. Se observa una reducción similar a 37 °C.

El efecto de HSA no era debido a la interacción con el tripéptido. Los experimentos de ITC de control para la unión de vancomicina al tripéptido en presencia de HSA dieron resultados comparables a los observados en ausencia de HSA (véase la tabla 17). Esto indica que ni el péptido ni el antibiótico estrechamente relacionado, vancomicina, interaccionan con HSA en disolución. Se deduce que cualquier efecto de HSA sobre la interacción dalbavancina/tripéptido tiene que deberse a la interacción entre HSA y dalbavancina.

Sin querer limitarse a ninguna teoría, los datos anteriores son consecuentes con un modelo de unión no competitiva. Este modelo supone que el ligando tripéptido (L) puede unirse a dalbavancina (D) tanto en el estado libre como (posiblemente con diferente afinidad) en el complejo dalbavancina-HSA.



Constante de disociación de unión de ligando aparente (observada) (no competitiva):

$$K_{app,L} = [D \text{ total}][L]/[\text{complejo DL total}]$$

$$= ([D] + [D.HSA])[L]/([DL] + [LD.HSA])$$

$$= K_L \{1 + [HSA]/K_{HSA}\} / \{1 + [HSA].K_L/K_{HSA}.K_{LDHSA}\}$$

Esto muestra una dependencia hiperbólica de  $K_{app,L}$  de la concentración de HSA libre que concuerda bien con los datos observados (figura 11). A [HSA] altas esto alcanza un valor asintótico (meseta).

$$K_{app,L} = K_{LDHSA} \text{ (para [HSA] grandes)}$$

Esto sugiere que la afinidad de unión por el tripéptido es de alrededor de 35  $\mu\text{M}$  cuando se une dalbavancina a HSA, en comparación con 3  $\mu\text{M}$  para dalbavancina libre (figuras de 25 °C).

5 Pueden sugerirse mecanismos adicionales en cuanto a si la dalbavancina está actuando como monómero o como dímero en sus interacciones con péptidos o proteínas. La comparación directa de dalbavancina con vancomicina (que muestra unión inequívoca 1:1 a estas bajas concentraciones) muestra que la unión es completa a razones molares más bajas (N más bajas) para dalbavancina (figura 12). Esto es consecuente con un complejo dalbavancina:péptido 2:1.

10 Sin embargo, en presencia de HSA, los valores de N aparentes aumentan (tabla 17), y pueden ser más consecuentes con complejación 1:1. Sin querer limitarse a ninguna teoría, el modelo mostrado en la figura 13, que muestra la posible interacción de monómeros y dímeros de dalbavancina con ligandos tripeptídicos y HSA, es consecuente con estas observaciones. La figura 13A representa dalbavancina como en equilibrio monómero-dímero en disolución (predominantemente como dímero), pero uniéndose como monómero a dos sitios independientes en HSA. Esto es consecuente con los valores de  $N = 0,5$  observados por ITC para la unión de proteínas séricas a dalbavancina (ejemplo 3). La figura 13B representa la unión de ligando al dímero de dalbavancina en disolución, y (más débilmente) a los monómeros de dalbavancina unidos a HSA. Esto es consecuente con la unión no competitiva de dalbavancina tanto a tripéptido como a HSA, con estequiometrías aparentes variables.

20 En resumen, este ejemplo muestra que HSA reduce la afinidad de unión de dalbavancina por el ligando tripeptídico de una manera consecuente con un mecanismo no competitivo y que la dalbavancina unida a HSA conserva su capacidad para unirse a ligandos tripeptídicos, aunque con afinidad reducida. Estos resultados también son consecuentes con un modelo en el que la dalbavancina está en equilibrio monómero-multímero, predominantemente multimérica en disolución, con fuerte afinidad de los multímeros por ligando peptídico. Monómeros de dalbavancina, tanto libres como unidos a albúmina sérica, también pueden unirse a péptidos con una afinidad reducida.

#### Ejemplo 9. Preparaciones de A-40926 y dalbavancina

##### 30 *Preparación de A-40926*

A-40926, el glicopéptido natural producido por fermentación, fue el material de partida para producir dalbavancina. Se produjo mediante una *Nonomuria sp* ATCC 39727 como mezcla de A-40926 y su derivado de acetilo (véanse la patente estadounidense n.º 4.935.238 y B. Golstain *et al.* Antimicrobial Agent and Chemotherapy, dic. de 1987, págs. 35 1961-1966). El derivado de acetilo se desacetiló en primer lugar a A-40926. Después de la desacetilación, se purificó A-40926 mediante cromatografía en columna en poliamida tal como se describe a continuación. La siguiente descripción es representativa del actual método de producción. Las cantidades notificadas en este caso son aproximadamente 1/4 de las cantidades habitualmente de trabajo en una preparación industrial.

##### 40 *Desacilación de A-40926*

Se ajustaron 10  $\text{m}^3$  de caldo de fermentación (23 °C) que contenían un total de aproximadamente 1 g/l de A-40926 y su derivado de acetilo, con agitación, a pH 11,4 con NaOH al 30 %. Se continuó la agitación durante 6 horas, entonces se redujo la temperatura hasta 15 °C y se microfiltró el caldo (microfiltro Koch Protosep IV con una 45 membrana de cerámica 0,1  $\mu$  de 0,12  $\text{m}^2$ ). Durante la microfiltración, se añadió agua continuamente al material retenido con el fin de obtener, al final del procedimiento, un material permeado de 20-25  $\text{m}^3$  y un material retenido de 4,5-5  $\text{m}^3$  (la mitad del valor de partida).

El material permeado, que contenía A-40926, se analizó mediante HPLC. Cuando se completó la desacetilación, el 50 pH de la disolución de material permeado se ajustó a pH 7 con ácido sulfúrico al 30 % (almacenado a 20 °C). En este ejemplo, se obtuvieron 25  $\text{m}^3$  de caldo filtrado que contenía 6,62 kg de A-40926 (268 mg/l). El rendimiento de desacetilación era del 66,2 %. Si se llevaba a cabo el procedimiento de microfiltración durante más tiempo y un mayor volumen de extracción que los empleados en este procedimiento, puede aumentarse el rendimiento hasta el 90 %.

##### 55 *Purificación de A-40926 en columna de poliamida*

Después de la extracción, se purificó A-40926 contenido en el caldo filtrado en una columna de poliamida, tal como se describe a continuación. La cantidad notificada en esta descripción es de aproximadamente 1/10 de la cantidad 60 habitualmente de trabajo en una preparación industrial y es representativa del método de producción actual.

Se suspendieron 500 l de resina de poliamida SC6 (de Macherey Nagel) en agua desmineralizada y se cargaron en una columna. Entonces se acondicionó la resina a pH 6-6,5 eluyendo la columna con al menos 2 BV (volumen de 65 lecho) de una disolución tampón preparada disolviendo 4 kg de carbonato de sodio en 800 l de agua y ajustando el pH de la disolución que resultó con ácido acético.

5 El caldo filtrado de A-40926 (9000 l; ensayo 0,275 mg/l; 2475 g de A-40926; pH 6±0,2; temperatura 10 °C ± 3 °C) se cargó en la columna con aproximadamente 5 g de actividad por litro de resina (se usó habitualmente una razón actividad/resina de 5-8 g/l). Se lavó la columna con las siguientes disoluciones: 3 BV (1500 l) de una disolución a pH 6 preparada disolviendo 7,5 kg de carbonato de sodio en 1500 l de agua desmineralizada y ajustando el pH con ácido acético; 4 BV (2000 l) de una disolución a pH 8 preparada disolviendo 10 kg de carbonato de sodio en 2000 l de agua desmineralizada y ajustando el pH con ácido acético; 1,5 BV (750 l) de una disolución a pH 9 preparada disolviendo 4 kg de carbonato de sodio en 750 l de agua desmineralizada y ajustando el pH con ácido acético.

10 Se recuperó A-40926 de la columna eluyendo con 4 BV (2000 l) de una disolución tampón a pH 10 preparada disolviendo 10 kg de carbonato de sodio en 2000 l de agua desmineralizada y ajustando el pH con ácido acético. Se recogieron las fracciones que contenían A-40926 purificado (concentración de A-40926 mayor de 0,5 g/l y % de área de HPLC del componente principal (Bo+B<sub>1</sub>) mayor del 80 %), se neutralizaron con HCl 1 N y se analizaron mediante HPLC. Se obtuvieron aproximadamente 2000 l de disolución transparente final.

15 La resina usada para la purificación se regeneró con 1,5 BV de una mezcla de isopropanol / NaOH al 5 % 1:1 seguido de un lavado con 5 BV de agua desmineralizada.

#### *Concentración de A-40926*

20 La disolución procedente de la columna se sometió a varias rondas de etapas de dilución/concentración para eliminar la mayoría de las sales inorgánicas en la disolución. Se concentró la disolución hasta 80 l mediante nanofiltración usando una membrana con un punto de corte de 250 D, se diluyó con 80 l de agua desmineralizada y volvió a concentrarse al volumen de partida (80 l) mediante nanofiltración. Esta operación se repitió al menos 5 veces. El pH de la disolución final (80 l, pH 7,5) se ajustó a pH 6,3 con HCl al 23 %. Entonces se diluyó la disolución con 80 l de acetona, y se ajustó de nuevo su pH a pH 2,6 con HCl al 23 %.

#### *Decoloración*

30 Se añadieron 680 g de carbón PA 200 C (~0,3 g/g de A-40926) con agitación a la disolución obtenida en la etapa anterior (160 l). Se continuó agitando durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente, entonces se le añadieron aproximadamente 0,5-0,6 kg de adyuvante de filtración (DIFBO). La mezcla se filtró a través de un cartucho filtrante. La disolución transparente obtenida se concentró a vacío (45 °C) con el fin de reducir la acetona por debajo del 10 %. El volumen final era de aproximadamente 100 l. Entonces se ajustó el pH a 6,7 con NaOH ac., y se continuó con la etapa de concentración usando el nanofiltro habitual hasta que la concentración de A-40926 era de alrededor de 100 g/l. Se obtuvieron 20 l de disolución concentrada (1884 g de A-40926, 94,2 g/l).

#### *Precipitación y secado*

40 Se diluyó la disolución anterior con agitación con 20 l de acetona, y se ajustó su pH a 5,1 con HCl al 10 %. A esta disolución se le añadieron 5 volúmenes de acetona adicionales (100 l) para completar la precipitación de A-40926. Si el contenido de agua no era <15 % en este momento, se añadió acetona adicional. Después de 2 horas se centrifugó la suspensión, y se lavó el sólido con 3 × 10 l de acetona nueva. Se analizaron las aguas madres y se descargaron después de haber comprobado la ausencia de producto.

45 Se secó A-40926 sólido a presión reducida a 30 °C-35 °C en un secador estático hasta que la acetona residual estaba por debajo del 2 % y el agua era menos del 10 %. Entonces se tamizó el producto a través de un tamiz de 50 de malla obteniendo 2,08 kg de A-40926 purificado (el 81,4 % en ensayo de HPLC; el 6,2 % de agua; el 4,8 % de cenizas sulfatadas). El rendimiento, partiendo de la actividad cargada en la columna, fue del 68,4 %.

#### *Síntesis de dalbavancina*

55 Se preparó dalbavancina (BI-397) a partir del glicopéptido natural A-40926 a través de una síntesis en tres etapas tal como se describe en Malabarba y Donadio (1999), *Drugs of the Future*, 24(8):839-846. Específicamente, en primer lugar se sometió A-40926 a una etapa de esterificación para preparar MA, que luego se sometió a una etapa de amidación para preparar MA-A-1. Entonces una etapa de hidrólisis final convirtió MA-A-1 en dalbavancina.

#### *Etapas de esterificación (etapa 1)*

60 La siguiente descripción es representativa del método actual en uso.

#### *Preparación de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96 %/MeOH (disolución A)*

65 En un matraz de fondo redondo de 15 l equipado con un agitador mecánico y un termómetro, se añadieron gota a gota 2,28 l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96 % (~300 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96 % por kg de polvo de A-40926) a 7,9 l de MeOH. Se usó un baño de hielo externo para mantener la temperatura entre 0 °C y 5 °C.

*Procedimiento de reacción*

Se suspendió el material de partida A-40926 (7,6 kg; lote 019, ensayo 85,09 %; actividad 6,46 kg; 3,73 mol) en un reactor revestido de vidrio de 140 l en MeOH (46 l), y se enfrió la suspensión resultante a  $0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A esta temperatura la suspensión se trató con la disolución A preparada previamente ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ ). La disolución resultante se agitó a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 22-26 horas mientras que la reacción (una alícuota de reacción diluida 100 veces con mezcla de acetonitrilo/agua 1:1) se monitorizó mediante análisis de HPLC cada dos horas. Se consideró completada la esterificación cuando el A-40926 residual era menos del 5 % y el diéster no era más del 10 % como % de área de HPLC.

*Aislamiento de éster (MA)*

Cuando se completó la reacción, se enfrió la mezcla a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se diluyó con el mismo volumen de agua fría (54 l) manteniendo la temperatura por debajo de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se precipitó el producto (MA) ajustando el pH de la disolución a 5,5 ( $\pm 0,2$ ) añadiendo lentamente 10,2 l de trietilamina (TEA). Se continuó la agitación durante una hora adicional a  $0-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , entonces se centrifugó el sólido obtenido, se lavó con agua (10 l por kg de A-40926) y finalmente con MeOH (3 l de MeOH por kg de A-40926 de partida) enfriado previamente a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El lavado con agua se hizo principalmente para eliminar los sulfatos de MA.

Las aguas madres y los lavados se analizaron y se descargaron por separado si contenían menos del 1-2 % de actividad. Se secó el producto a vacío (50 mm Hg) a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (temperatura externa) hasta que el agua residual era menos del 10 %. Se obtuvieron 7,6 kg de MA (5,63 kg de actividad, 3,23 moles) como polvo parduzco.

El análisis mostró los siguientes valores de % de área de HPLC: MA 89,8, A-40926 3,2, derivado de diéster 5,9. El ensayo de HPLC fue el 74,2 %, actividad 5,637 kg; 3,23 moles; rendimiento = 86,5 %. Se usó este material en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

*Etapa de amidación (etapa 2)*

La siguiente descripción es representativa del método de producción actual.

*Preparación de la mezcla de DMSO/HCl (disolución B)*

Se puso DMSO (1,6 l) en un matraz de fondo redondo de 10 l, equipado con un agitador mecánico y un termómetro, y se enfrió con un baño de hielo por debajo de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Entonces se le añadió lentamente HCl al 37 % (1 l) con agitación manteniendo la temperatura de la mezcla por debajo de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Procedimiento de amidación (producción de MA-A-1)*

Se disolvieron lentamente 5,95 kg de material de partida MA (ensayo 76,3 %, KF 8,9 %; 2,68 moles) con agitación en 19,2 l de mezcla de DMSO / MeOH 1:1 ( $\sim 1,6\text{ l}$  de DMSO y 1,6 l de MeOH por kg de polvo de MA) a temperatura ambiente. Después de 1 hora de agitación, se le añadieron 709 ml de 3-(dimetilamino)-propilamina (DMEPA, PM 102,1; densidad = 0,812 g/ml; 5,63 moles; 1,96 moles por mol de MA de partida) y 325 g de 1-hidroxibenzotriazol hidratado (HOBT·H<sub>2</sub>O; PM 153,1; 2,04 moles; 0,71 moles por mol de MA de partida) a la mezcla de reacción. Se continuó agitando hasta que se obtuvo disolución completa, entonces se ajustó la mezcla a pH 3-3,1 (medido después de diluir una alícuota de la reacción 10 veces con agua) añadiendo lentamente aproximadamente 2,0 l de disolución B (DMSO/HCl).

Se añadió una disolución de dicitohexilcarbodiámid (DCC), preparada disolviendo 1,03 kg de DCC (4,99 mol; PM 206,3; 1,74 moles por mol de MA) en 4,1 l de mezcla de DMSO/MeOH 1:1, a la mezcla de reacción agitada en 10 minutos. Se continuó agitando durante 5 horas, entonces se le añadieron 51,5 g adicionales de DCC sólido (0,25 moles) a la mezcla de reacción con el fin de reducir el MA residual por debajo del 5 %, manteniendo el nivel de isoureas menor del 4-5 %. Las isoureas son un grupo de subproductos producidos por reacción adicional de dalbavancina con el exceso de DCC.

La reacción se completó normalmente después de 2 horas adicionales (7 horas en total). Al final se diluyó la mezcla con agua (60 l) para reducir la concentración de DMSO hasta el 15 % (v/v) y se ajustó a pH 2,3 con HCl 1 N (0,85 l) para destruir cualquier DCC residual.

*Hidrólisis de MA-A-1 a dalbavancina (etapa 3)*

Después de 30 minutos se ajustó la mezcla a pH 12,0-12,1 con NaOH al 15 % (8 l). Se continuó agitando durante 4 horas manteniendo la mezcla a este pH con pequeñas adiciones de NaOH al 15 %. Después de este tiempo, el MA-A-1 residual era menos del 0,2 % como % de área de HPLC.

Entonces se acidificó la mezcla a pH 3,0 con HCl 1 N (19 l), y se filtró la suspensión para eliminar la dicitohexilurea

formada. Se lavó la torta sólida en el filtro con agua desmineralizada (2 × 20 l). Se reunieron los lavados y el filtrado, obteniendo una disolución transparente que se analizó por HPLC. Se obtuvieron 152,8 l de disolución que contenía 21,74 g/l de dalbavancina (actividad total 3322 g; 1,828 moles, rendimiento = 68,2 %).

#### 5 *Purificación de dalbavancina*

La siguiente descripción es representativa del método de producción actual.

10 Se dividieron en dos partes los 152,8 l de la disolución obtenida de la etapa de hidrólisis y que contenían 3322 g de actividad de dalbavancina y cada una se purificó por separado en la misma columna cromatográfica que contenía 400 l de poliamida. En estos dos ciclos de purificación la razón actividad/resina era de 4,3 y 4,0 g/l respectivamente.

#### *Preparación de la columna de poliamida*

15 Se limpió la columna revestida de vidrio (diámetro interno = 40 cm, h = 320 cm) que contenía 400 l de resina de poliamida según los procedimientos de regeneración de resina (véase a continuación) y se acondicionó con 2 BV (800 l) de agua desmineralizada acidificada con 4 l de AcOH (pH = 3,2).

#### *Purificación de la primera porción*

20 Se diluyó con H<sub>2</sub>O (56 l) la primera porción de 76,4 l de disolución de partida con el fin de reducir el contenido de DMSO por debajo del 5 % (v/v), y se acidificó hasta pH 2,78 con HCl 1 N (3,4 l). Entonces se cargó esta disolución en la columna a una velocidad de flujo de 150 l/h. Después de cargar, se lavó la resina con las siguientes disoluciones: 4 BV (1600 l) de H<sub>2</sub>O acidificada con AcOH (8 l), pH = 3,2; 5 BV (2000 l) de AcONa 0,1 M, pH = 8,2; 25 1 BV (400 l) de H<sub>2</sub>O acidificada con AcOH (1 l), pH = 3,2. Se eluyó la dalbavancina con 4 BV (2400 l) de H<sub>2</sub>O/MeOH (8:2) acidificada con AcOH (6 l), pH = 3,4.

30 Durante la etapa de elución, se recogieron y analizaron 22 fracciones de 50-60 l cada una por HPLC. Se reunieron las fracciones desde 9 hasta 25 (concentración de dalbavancina mayor de 0,5 g/l y % de área de HPLC de (B<sub>0</sub>+B<sub>1</sub>) ≥80 %), obteniendo 969 l de disolución con 1,56 kg de dalbavancina (rendimiento = 93,9 %). Entonces se concentró esta disolución por nanofiltración, obteniendo 125,7 l de disolución con 1,38 kg de dalbavancina. Se neutralizaron y descargaron 850 l de material permeado, que contenía 145 g de dalbavancina impura (8,7 %).

#### *Regeneración de la resina*

35 Antes de reutilizarla, se lavó la resina con las siguientes disoluciones: 2,5 BV (1000 l) de MeOH/agua acidificada con ácido acético 1:1 (2,5 ml/l); 2,5 BV (1000 l) de NaOH al 0,5 %/isopropanol 1:1; 10 BV (4000 l) de agua desmineralizada. Entonces volvió a equilibrarse la resina con BV (800 l) de agua acidificada con ácido acético (2,5 ml/l).

40 *Purificación de la segunda porción*  
Se diluyó con H<sub>2</sub>O (56 l) la segunda porción de la disolución de partida procedente de la etapa de hidrólisis (76,5 l) para reducir el contenido en DMSO por debajo del 5 % (v/v) y se acidificó hasta pH 2,87 con 3,0 l de HCl 1 N. Entonces se purificó la porción tal como se describió previamente en la purificación de la primera porción. Las fracciones combinadas (vol. = 972 l, 1,54 kg de dalbavancina, rendimiento = 92,7 %) se concentraron por nanofiltración, obteniendo 133 l de disolución con 1,46 kg de actividad. Se descargaron 850 l de material permeado, que contenía 73 g de dalbavancina (4,3 %).

50 Volvieron a analizarse y se combinaron las disoluciones concentradas procedentes de las dos etapas de purificación, dando 258 l de disolución que contenía 2840 g de dalbavancina purificada. El rendimiento de purificación era del 86 %. El rendimiento total, partiendo de MA, era del 58,3 %.

#### *Regeneración final de poliamida*

55 Después del segundo ciclo de purificación se regeneró la poliamida con: 2,5 BV de MeOH-agua 1:1, acidificado con AcOH (2,5 l) a pH = 3,4; 2,5 BV de NaOH al 0,5 %-isopropanol 1:1; 10 BV de agua desmineralizada.

#### *Decoloración y precipitación de dalbavancina*

60 Se añadieron 1,5 moles de HCl 1 N por mol de dalbavancina y 0,3 g de carbón CG1 (0,85 kg, de NORIT) por gramo de dalbavancina a los 258 l de disolución obtenida anteriormente. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante al menos 45 min. El pH era de 3,1. Entonces se filtró la suspensión en un cartucho SUPRA DISC modelo SDP-EK1 de SEITZSCHENK, y se lavó la torta con 50 l de H<sub>2</sub>O/MeOH 8:2. Se analizó el filtrado y se concentró otra vez por nanofiltración, usando una membrana MPS 44 con un punto de corte de 250 D. Se obtuvieron 21,3 l de disolución concentrada que contenía 119 g/l de dalbavancina (pH 4,1; MeOH al 1,9 %, CG). Finalmente se

65

añadieron 909 ml de HCl 1 N para ajustar el pH a 2,63, que corresponde a la razón de salificación de 1,65 mol<sub>HCl</sub>/mol<sub>dalbavancina</sub>.

5 Se vertió la disolución (22,2 l), con agitación, en 200 l de acetona. El sólido obtenido después de la decantación se centrifugó y se lavó con 14 l de acetona nueva. Entonces se secó el producto a presión reducida (50 mm Hg) a 35 °C, manteniendo la temperatura interna por debajo de 30 °C durante 17 horas. Durante el proceso de secado, se pulverizó 1 l de agua libre de pirógenos (<250 EU/ml), dividida en dos porciones de 0,5 l cada una, sobre el sólido después de tres y cinco horas con el fin de eliminar la acetona residual que de otro modo es difícil de eliminar. Entonces se tamizó el producto (50 de malla), obteniendo 2592 g de dalbavancina (82,4 % de ensayo de HPLC; agua (KF) 14 %; Cl<sup>-</sup> 3,0 %).

#### Ejemplo 10. Métodos alternativos para A-40926 y preparación de dalbavancina

15 Los métodos descritos a continuación son métodos alternativos que pueden usarse en el procedimiento de preparación de A-40926 y dalbavancina.

##### *Preparación de A-40926 sobre XAD-7 HP*

##### *Desacetilación y microfiltración del micelio*

20 Se agitaron 150 l de caldo de fermentación que contenía A-40926 (pH 7) en un reactor adecuado a temperatura ambiente (24 °C), y se ajustó a pH 11,5 con una disolución de NaOH 2,5 N (2,5 l). Después de 4 horas de agitación, se ajustó el caldo a pH 10,6 con HCl al 15 %, y se microfiltró a través de una membrana de 0,2 micrómetros. Se recogió 439 l de material permeado transparente y entonces se concentró por nanofiltración usando una membrana MPS 44 con un punto de corte de 250 D. La disolución concentrada de A-40926 obtenida (58,6 l; 3,89 g/l) se ajustó a pH 6,4 y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

##### *Preparación de columna y purificación.*

30 Se suspendió resina XAD-7 HP (8 l) en una disolución de agua/metanol 1:1, se filtró, y se cargó en una columna de vidrio apropiada (diámetro interno de 12 cm) con una bomba peristáltica.

35 Entonces se lavó la resina con agua y se equilibró con 6 BV de una disolución acuosa de carbonato de sodio tamponada a pH 6 preparada disolviendo 5 g de carbonato de sodio por litro de agua y ajustando el pH con ácido acético.

40 Se cargó una porción de caldo concentrado que contenía 194 g de A-40926 en la columna XAD-7 HP. Entonces se lavó la resina con las dos disoluciones tamponadas siguientes, a una velocidad de flujo de ½ BV/hora, con el fin de eliminar parte de las sustancias coloreadas e hidrófilas presentes: 3 BV (24 l) de disolución ac. de ácido acético al 0,5 % ajustada a pH 5 con hidróxido de sodio al 30 %; 5 BV (40 l) de una mezcla de agua/acetona 8:2 con 5 ml de ácido acético / l de agua.

45 Finalmente, se eluyó A-40926 con 8 BV (64 l) de una mezcla de agua/acetona 1:1 acidificada con 5 ml de ácido acético/l de agua. Se recogieron 16 fracciones de 4 l cada una. Las fracciones ricas (desde 5 hasta 15) en las que la concentración de A-40926 era mayor de 0,5 g/l se reunieron obteniendo una disolución que contenía 163,4 g de A-40926 (43 l, 3,8 g/l). El rendimiento en columna era del 81,3 %. Las otras fracciones (200 l) que contenían 0,23 g/l (45,3 g; 22,2 %) de A-40926 menos puro se descargaron.

50 Después de la elución, se regeneró la resina con 6 BV (55 l) de mezcla de NaOH al 0,5 %/isopropanol (1:1), y finalmente se lavó hasta neutralidad con 10 BV de agua.

##### *Tratamiento con carbón.*

55 Las fracciones recogidas se ajustaron a pH 2,5 con HCl al 37 % (70 ml) y luego se decoloraron con 50 g de carbón tipo PA 200 (0,3 g/g de A-40926). Se agitó la suspensión obtenida durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se filtró a través de un filtro KS 50 (d = 25 cm, tiempo = 2,5 horas), obteniendo 45,6 l de una disolución de A-40926 ligeramente amarilla (3,5 g/l; rendimiento = 96,4 %).

##### *Concentración.*

60 La disolución decolorada se ajustó a pH 7 con NaOH al 30 % (230 ml) y se concentró mediante nanofiltración y ultrafiltración. El uso de estas técnicas fue importante para la eliminación de las sustancias hidrófilas que se detectaron en los cromatogramas de HPLC a t<sub>R</sub> = 2-4 minutos. Cuando el material retenido se concentró hasta 1/10 del volumen inicial (4 l), se añadió el mismo volumen de agua y la disolución obtenida se concentró otra vez. Esta etapa de concentración/dilución se repitió tres veces con el fin de reducir la acetona residual hasta el 0,25 %. La disolución final (2,2 l, 146,3 g de A-40926, 66,5 g/l, rendimiento = 91,5 %) se analizó mediante HPLC. El rendimiento

de purificación fue del 75,4 %.

*Cristalización de A-40926.*

5 Se concentró adicionalmente una porción de 300 ml de la disolución de A-40926 (19,9 g de A-40926) hasta 100 ml usando un ultrafiltro a escala de laboratorio y entonces se calentó a 60 °C-65 °C. El pH de esta disolución se ajustó a 7 (NaOH al 30 %), y se añadieron gota a gota a esta temperatura 1,2 ml de mezcla de acetona/isopropanol 5:1 por ml de disolución concentrada. La mezcla que resultó se dejó enfriar a 20 °C. Después de 1,5 horas, se filtró el sólido obtenido, se lavó en el filtro con acetona y se secó a 40 °C durante 15 horas. Se obtuvieron 20,6 g de producto  
10 (ensayo de HPLC 82,0 %; 16,9 g de A-40926). El rendimiento de precipitación fue del 84,9 %. El rendimiento global, partiendo del caldo filtrado, fue de aproximadamente el 64 %.

*Preparación de A-40926 sobre CG-71*

15 *Preparación de la columna*

Se vertió resina CG-71 (350 ml) en una columna de vidrio (diámetro interno = 4 cm) y se lavó con agua. Se equilibró la resina con 3 BV de una disolución de carbonato de sodio, preparada disolviendo 5 g de carbonato de sodio en agua a pH 6 con ácido acético. Se cargaron 250 ml de caldo de fermentación (pH 7) que contenía 14,7 g de A-40926  
20 en la columna (42 g/l resina). Se lavó la resina con las tres disoluciones siguientes: 1050 ml (3 BV) de disolución acuosa de carbonato de sodio (5 g/l) ajustada a pH 6 con ácido acético; 1750 ml (5 BV) de disolución acuosa de carbonato de sodio (5 g/l) ajustada a pH 8 con ácido acético; 3150 ml (9 BV) de disolución acuosa de carbonato de sodio (5 g/l) ajustada a pH 9 con ácido acético.

25 Entonces se eluyó la actividad con 10 BV de agua desmineralizada. Se recogieron 20 fracciones de 500 ml cada una. Se combinaron las fracciones 12 a 15, obteniendo 2,2 l de disolución purificada que contenía 11,7 g de A-40926 (rendimiento = 79,6 %). Entonces se concentró esta disolución por ultrafiltración y la disolución concentrada se diluyó adicionalmente con agua desmineralizada y se ultrafiltró otra vez. La disolución obtenida se concentró  
30 adicionalmente a presión reducida hasta 50 ml.

*Cristalización de A-40926.*

Se calentó la disolución concentrada a 60 °C y se trató con agitación con una mezcla de acetona/IPA 5:1 (60 ml). Entonces se enfrió lentamente la mezcla a temperatura ambiente. El sólido obtenido se filtró, se lavó con acetona en  
35 el filtro y se secó a vacío a 35 °C durante 80 horas. Se obtuvieron 8,9 g de A-40926 purificado (ensayo de HPLC 84,2 %). El rendimiento general fue del 51 %.

*Etapas de amidación alternativa en síntesis de dalbavancina usando N-metil-2-pirrolidina (NMP) como disolvente*

40 Se añadió la mezcla de MA en porciones con agitación a una mezcla de NMP/MeOH 1:1 (64 ml). Se continuó agitando a 20 °C-25 °C hasta disolución completa, entonces se le añadieron DMEPA (2,42 ml; 1,96 mol/eq. de MA) y HOBT (1,06 g; 0,71 mol/eq. de MA). Se ajustó el pH de la mezcla de reacción (comprobado en una muestra diluida 1:10 con agua) hasta 3,0 con 9,37 ml de HCl al 15 % en NMP (preparada previamente a partir de 34,0 ml de HCl al 37 % disuelto en 57,7 ml de NMP). Entonces se le añadió con agitación una disolución de DCC (3,17 g; 1,57 mol/eq.  
45 de MA) en NMP/MeOH 1:1 (12,7 ml). La reacción se monitorizó por HPLC. La reacción se completó después de aproximadamente 6 horas (MA-A-1 88,9 %, MA 7,3 %, ISO 3,7 %). Este experimento sugiere que NMP puede ser una alternativa conveniente a DMSO para la reacción de amidación. El cambio de disolvente no influyó sobre la totalidad del procedimiento y la dalbavancina final obtenida era químicamente equivalente a otros lotes.

50 *Método alternativo de preparación de dalbavancina: procedimiento en una sola etapa*

Se suspendieron 10 g de complejo de A-40926 (valoración de HPLC 80,66 %, 4,6 mmoles) en 24 ml de MeOH con agitación a temperatura ambiente en un reactor de vidrio de 100 ml. Se enfrió la mezcla a 0 °C, y se le añadió una disolución de 4 g de HCl (g) en 16,4 ml de MeOH hasta completar la solubilización del producto. Entonces se dejó  
55 aumentar la temperatura hasta 20 °C mientras se continuó agitando durante 24 horas adicionales.

Después de este tiempo, se añadieron 40 ml de DMSO y 0,4 g de HOBT a la mezcla de reacción.

Entonces se le añadió 1,1-dimetilamina propilamina, ajustando el pH de la mezcla de reacción resultante entre 3-3,1  
60 (medido después de diluir una muestra 9:1 con agua). Entonces se le añadieron 1,8 g de DCC sólido y se continuó agitando durante 15 horas adicionales. Después de este tiempo, se transfirió la mezcla de reacción a un reactor de vidrio de 1 l y se diluyó con 80 ml de agua. Entonces se llevó el pH hasta 12 añadiendo 240 ml de NaOH al 15 %. Se continuó agitando durante 60 minutos adicionales y se acidificó la mezcla a pH 2,8 con 260 ml de HCl ac. al 15 %. Se obtuvieron aproximadamente 800 ml de disolución transparente final que contenía 6,4 g de dalbavancina  
65 (rendimiento = 76 %).

Los análisis de HPLC mostraron que el perfil del producto obtenido es comparable al obtenido con los otros procedimientos de fabricación.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de dalbavancina en la fabricación de un medicamento para su uso en un método para tratar una infección bacteriana en un humano que lo necesita, comprendiendo el método:  
 5 administrar dosis terapéuticamente eficaces de dalbavancina inicial y posteriores en un portador farmacéuticamente aceptable al paciente,  
 en el que cada dosis está separada por de cinco a diez días y en el que la cantidad de la dosis inicial es de 500 mg a 5000 mg, y en el que la cantidad de la dosis inicial es al menos aproximadamente dos veces la cantidad de dalbavancina contenida en la dosis posterior.
2. Uso de dalbavancina en la fabricación de un medicamento para su uso en un método para tratar una infección bacteriana en un humano que lo necesita, comprendiendo el método:  
 15 administrar dosis terapéuticamente eficaces de dalbavancina inicial y posteriores en un portador farmacéuticamente aceptable al paciente,  
 en el que cada dosis está separada por aproximadamente una semana y en el que la cantidad de la dosis inicial es de 1000 mg y la cantidad de cada dosis posterior es de 500 mg.
3. Uso según la reivindicación 1, en el que cada dosis está separada por de cinco a diez días y en el que la cantidad de la dosis inicial es de 500 mg a 5000 mg y la cantidad de cada dosis posterior es de 250 mg a 2500 mg.
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el método administrar una sola dosis posterior.
5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el método administrar múltiples dosis posteriores.
6. Uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la infección bacteriana es una infección de piel y tejido blando.
7. Uso según la reivindicación 3, en el que la infección bacteriana es una infección de piel y tejido blando.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que la infección bacteriana es una infección de piel y tejido blando complicada.
9. Uso según la reivindicación 7, en el que la infección bacteriana es una infección de piel y tejido blando sin complicaciones.
10. Composición farmacéutica que comprende:  
 45 dalbavancina; y  
 un estabilizador, en la que el estabilizador comprende manitol y lactosa.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la que la razón en peso de manitol:lactosa: dalbavancina es de 1:1:4.
12. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la que la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 3 a 5.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la que la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 4,5.
14. Composición farmacéutica que comprende:  
 60 dalbavancina; y  
 un estabilizador, en la que el estabilizador comprende manitol a un pH de 3-5.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, en la que el pH es de aproximadamente 3,5.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, en la que la razón en peso de manitol: dalbavancina

es de 1:2.

FIGURA 1

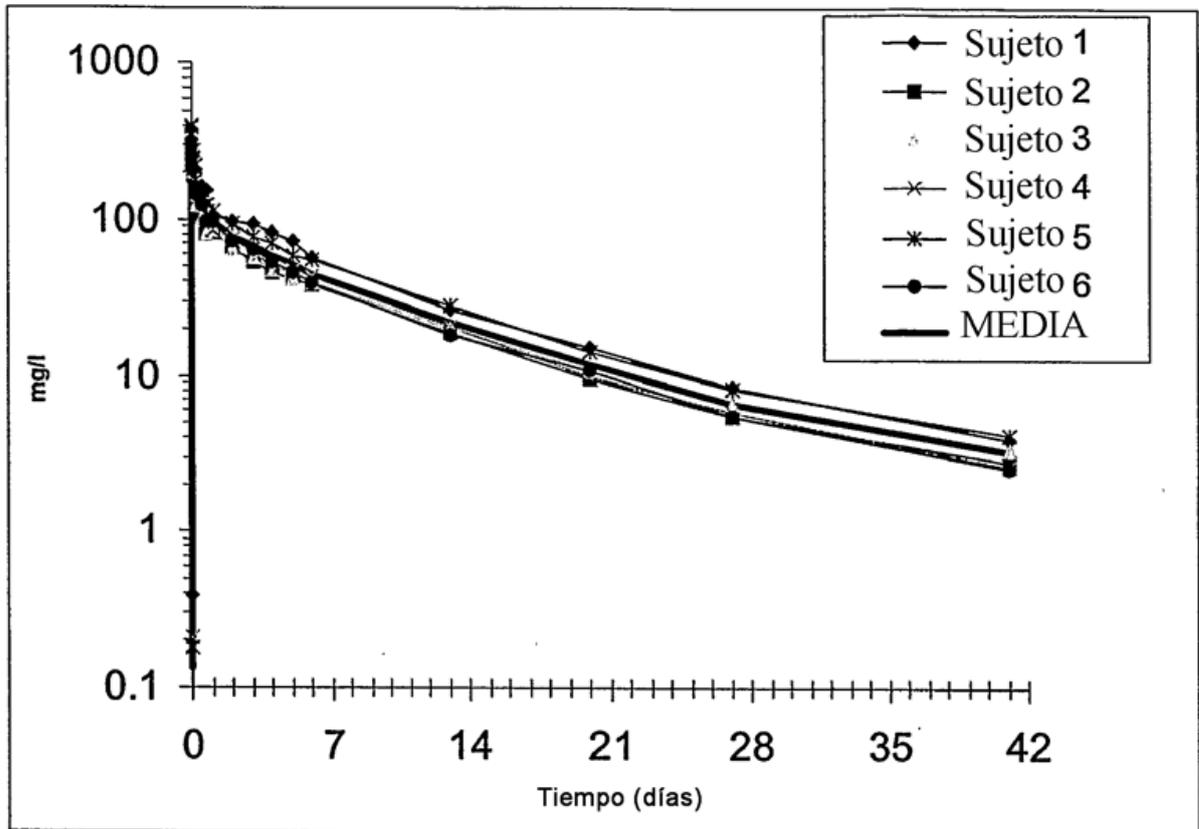


FIGURA 2

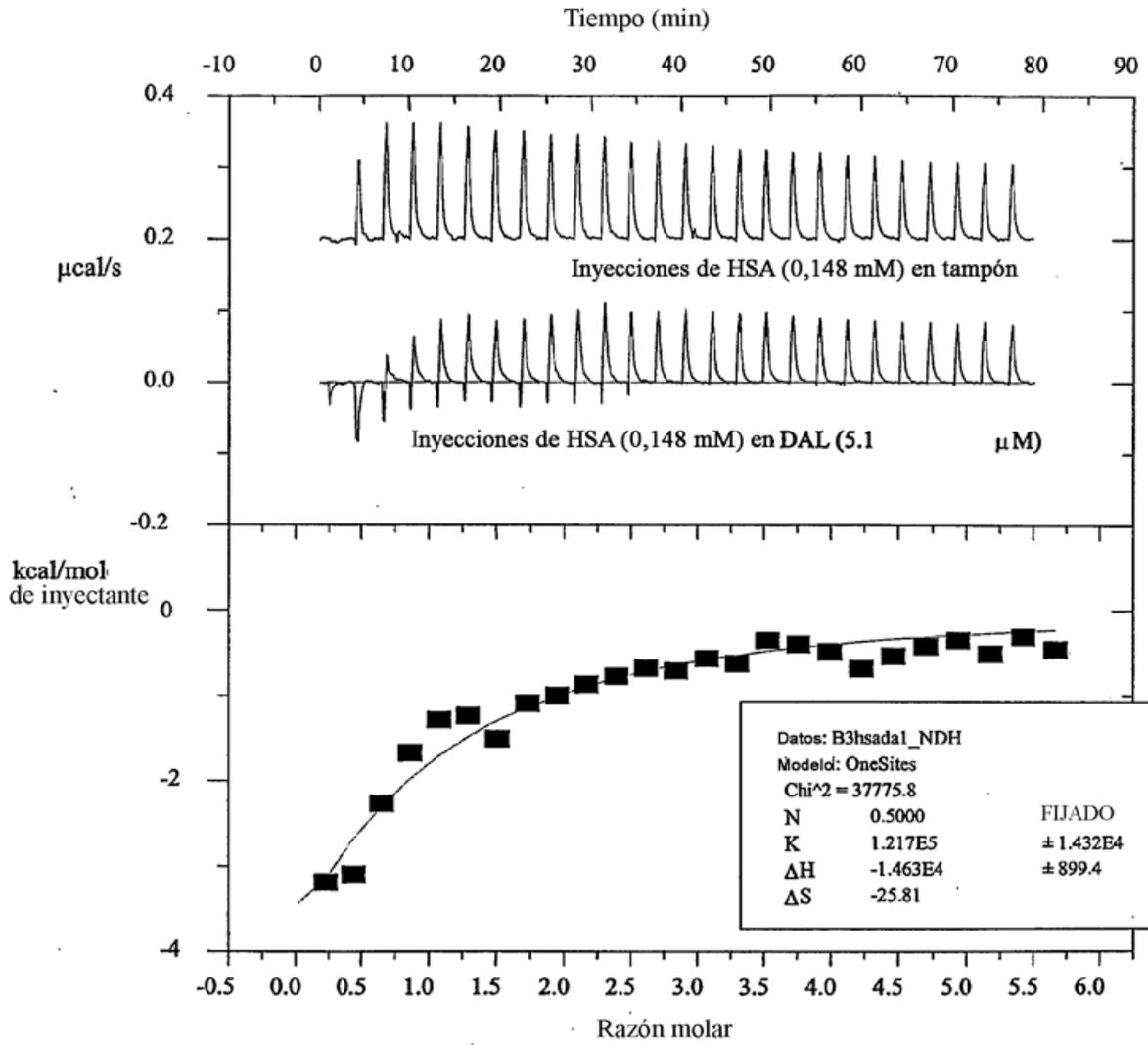


FIGURA 3

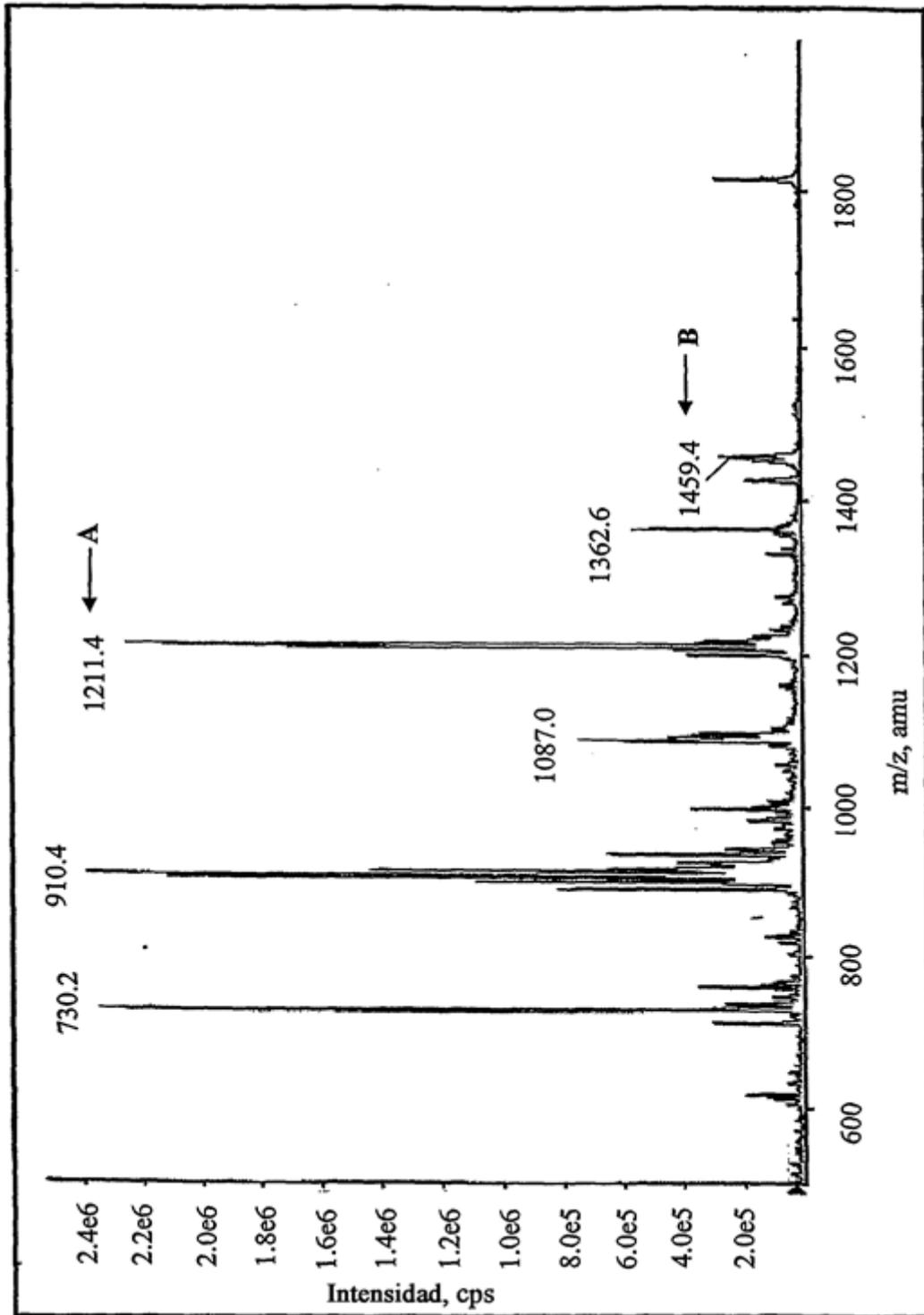
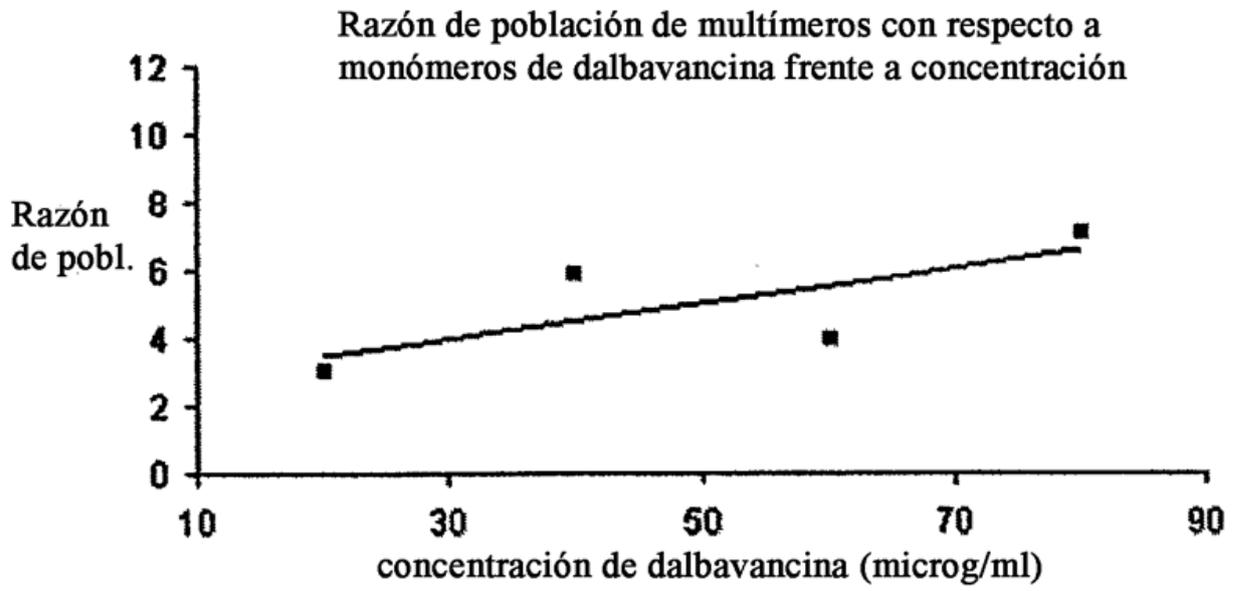
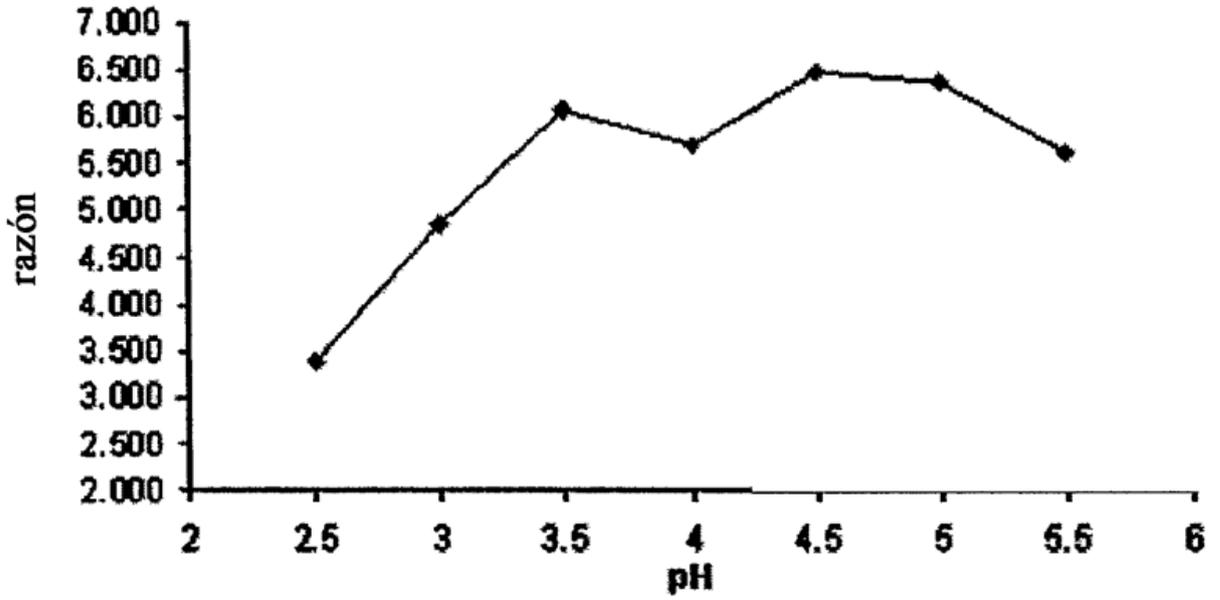


FIGURA 4



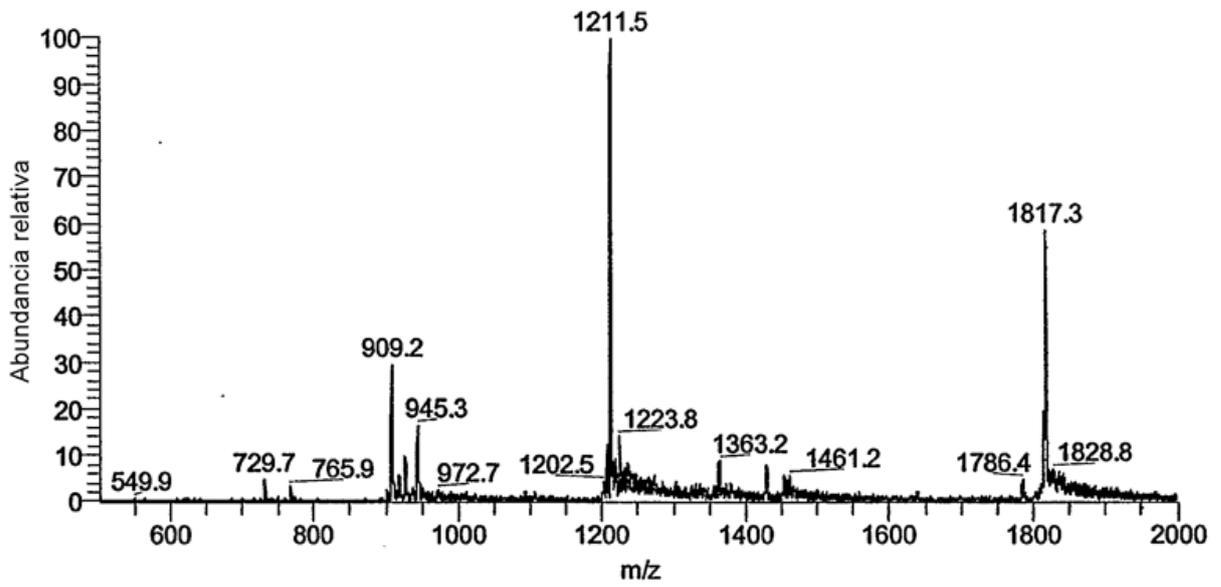
### FIGURA 5

Razón de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina frente a pH



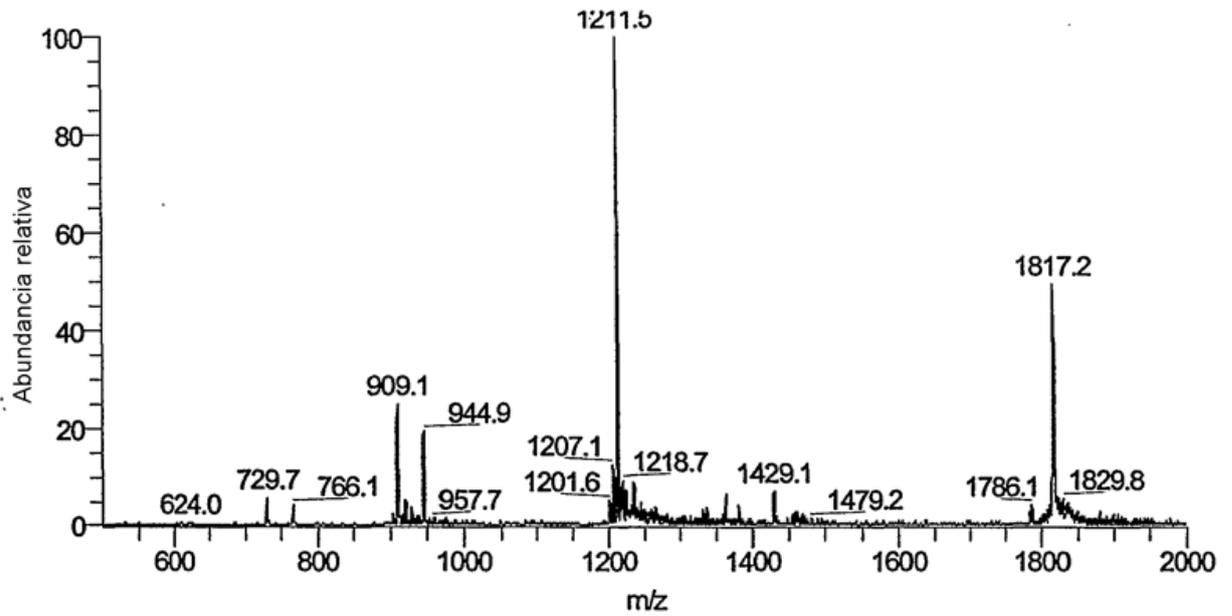
## FIGURA 6

Espectro de ESI/EM de barrido completo de dalbavancina en formiato de amonio 5mM  
pH 5



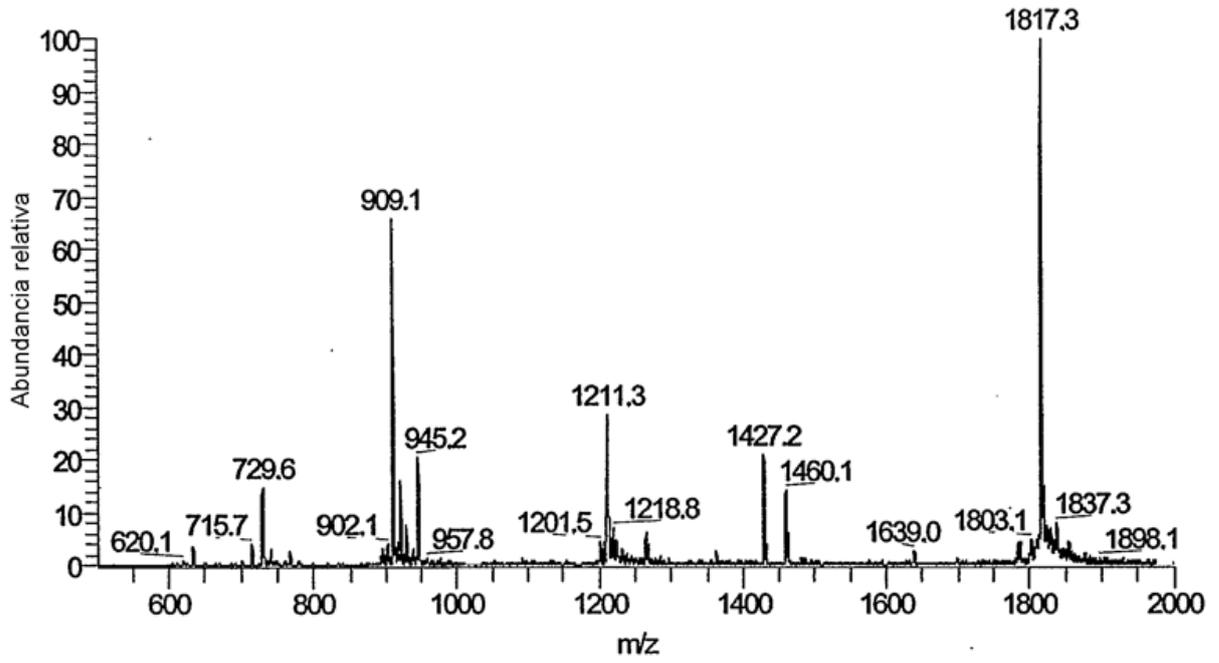
### FIGURA 7

Espectro de ESI/EM de barrido completo de dalbavancina en formiato de amonio 50 mM pH 5



### FIGURA 8

Espectro de ESI/EM de barrido completo de dalbavancina en formiato de amonio 100 mM pH 5



### FIGURA 9

Espectro de ESI/EM de barrido completo de teicoplanina (50 µg/ml) en agua

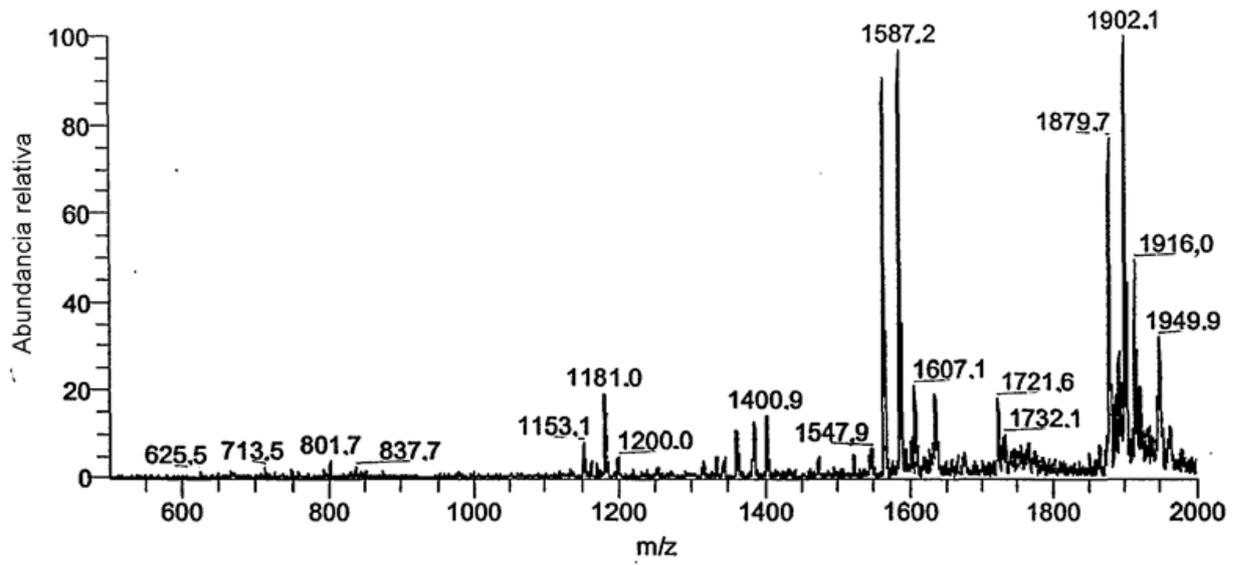


FIGURA 10

Espectro de ESI/EM de barrido completo de teicoplanina (100 µg/ml) en agua

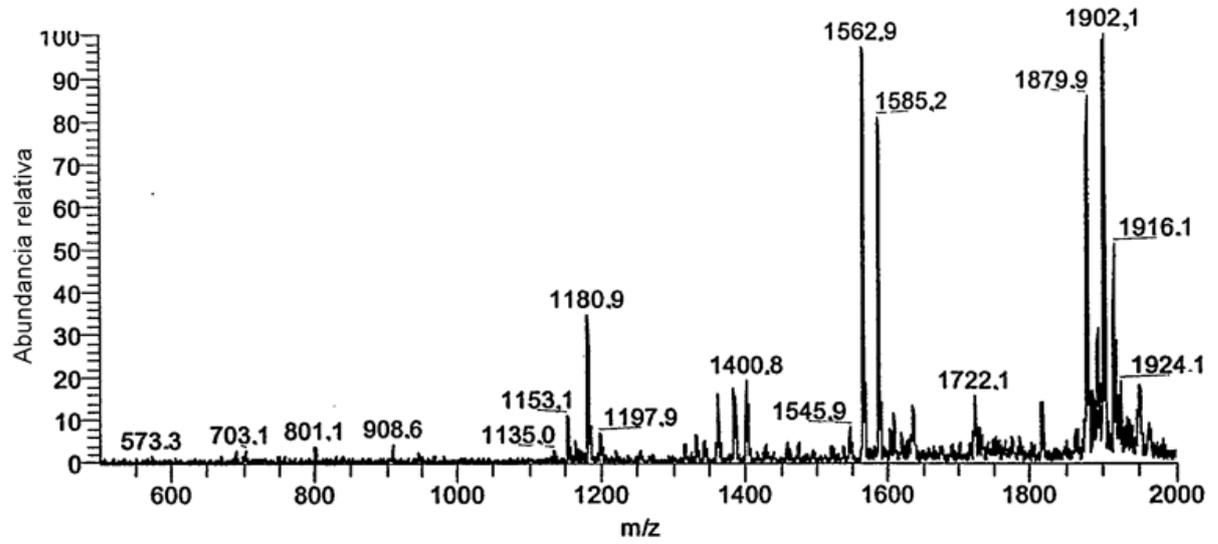


FIGURA 11

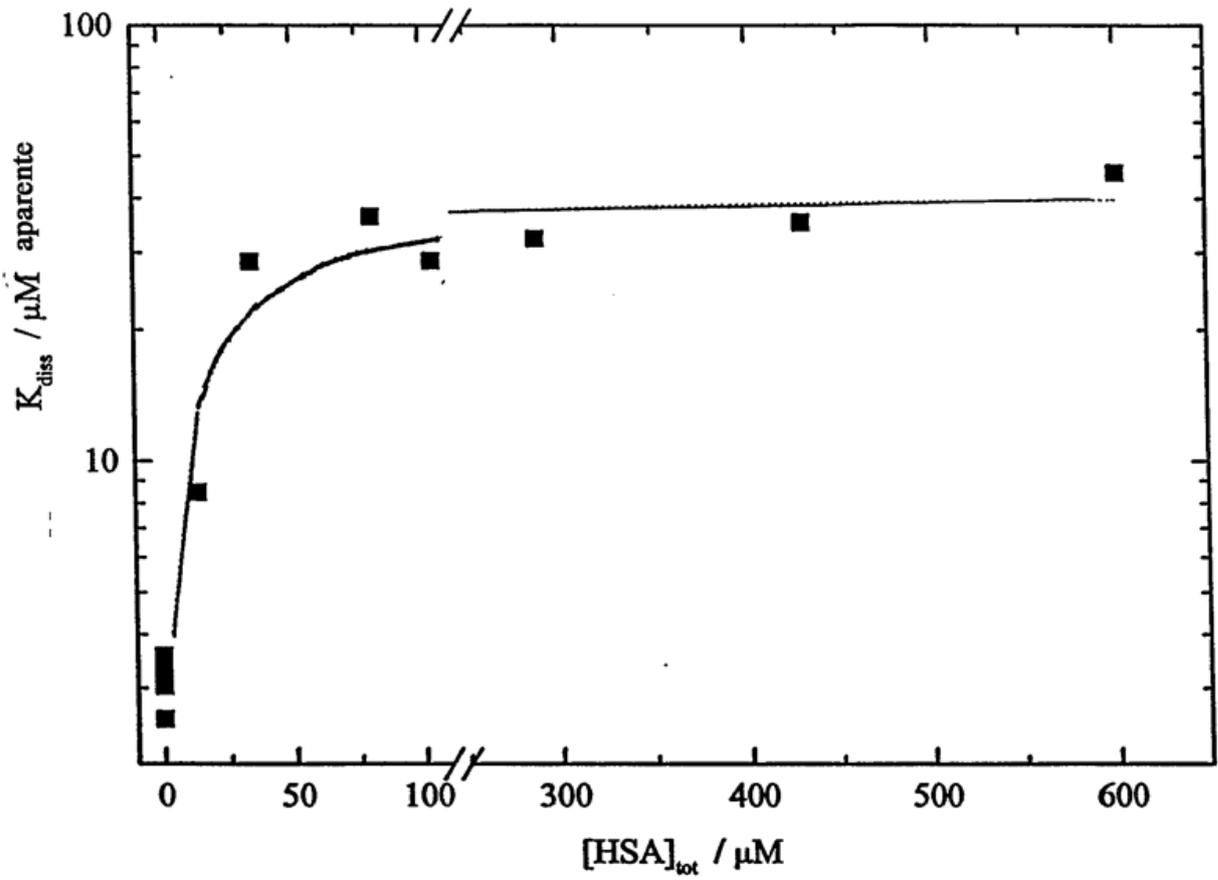


FIGURA 12

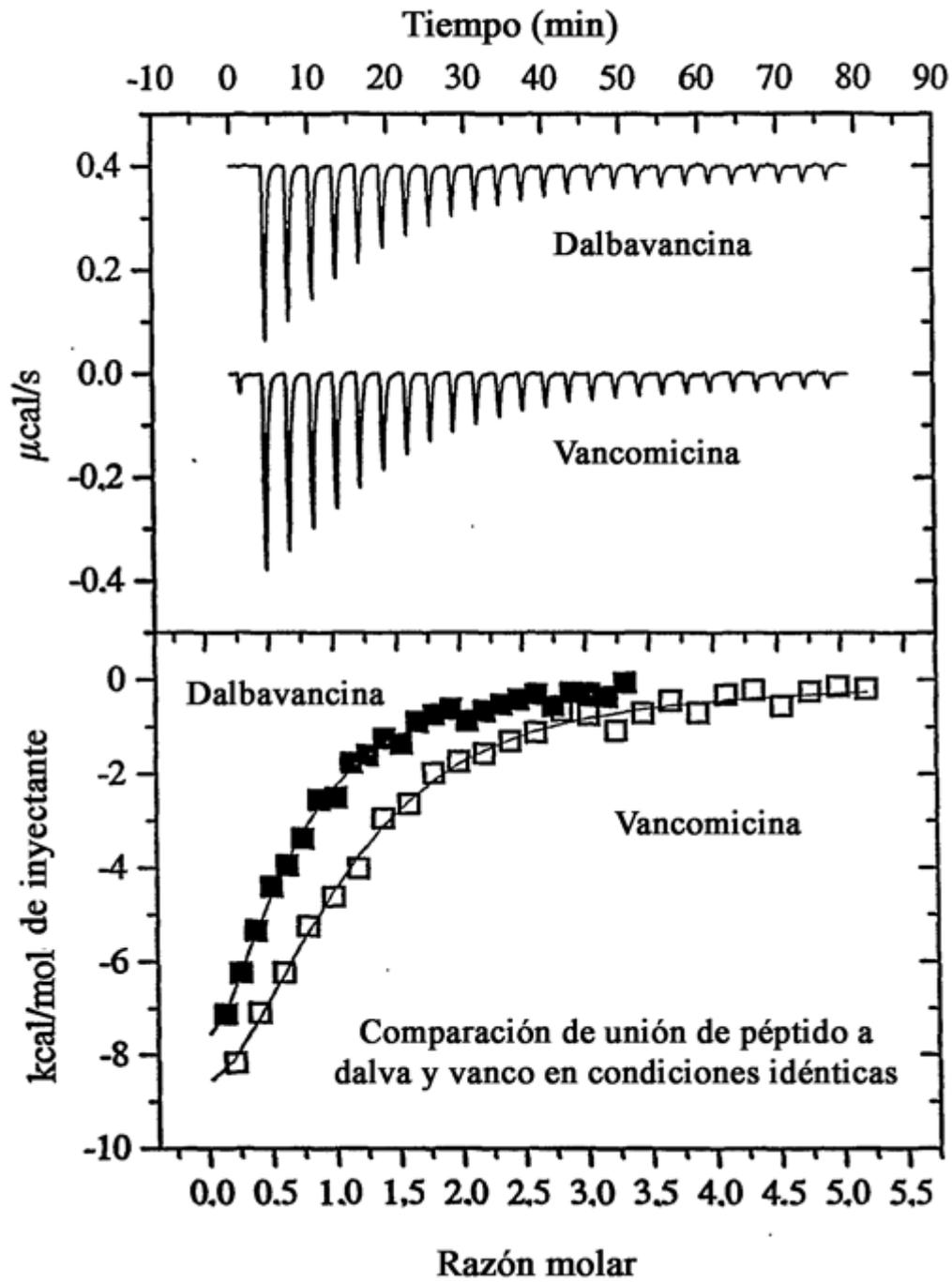


FIGURA 13

