

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-525108

(P2004-525108A)

(43) 公表日 平成16年8月19日(2004.8.19)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 14/36
A61K 7/075
A61K 7/32
A61K 7/50
A61K 9/12

F 1

C07K 14/36
A61K 7/075
A61K 7/32
A61K 7/50
A61K 9/12

Z T D
A61K 7/32
A61K 7/50
A61K 9/12

テーマコード(参考)

4B064
4C076
4C083
4C084
4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 106 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-559447(P2002-559447)	(71) 出願人	503007911 キューピスト ファーマスティカルズ インコーポレイテッド Cubist Pharmaceuticals, Inc.
(86) (22) 出願日	平成13年12月17日(2001.12.17)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2421 レキシントン ヘイデン アヴ エニュー 65
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月18日(2003.6.18)	(74) 代理人	100073184 弁理士 柳田 征史
(86) 國際出願番号	PCT/US2001/048886	(74) 代理人	100090468 弁理士 佐久間 剛
(87) 國際公開番号	W02002/059145		
(87) 國際公開日	平成14年8月1日(2002.8.1)		
(31) 優先権主張番号	60/256,268		
(32) 優先日	平成12年12月18日(2000.12.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/274,741		
(32) 優先日	平成13年3月9日(2001.3.9)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/340,525		
(32) 優先日	平成13年12月13日(2001.12.13)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】精製リポペプチドの調製方法

(57) 【要約】

本発明は、従来の抗生物質に耐性である菌株を含むグラム陽性細菌に対する強力な殺菌活性を有するリポペプチド抗生物質であるダブトマイシンを含む結晶性または結晶様リポペプチドに関する。本発明はまた、従来の抗生物質に耐性である菌株を含むグラム陽性細菌に対する強力な殺菌活性を有するリポペプチド抗生物質であるダブトマイシンを含むリポペプチドを精製する方法に関する。さらに、本発明はまた、精製された形態のリポペプチドを含む医薬組成物、およびそれら組成物を使用する方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩であって、該リポペプチドがダプトマイシン、A 5 4 1 4 5 およびダプトマイシン関連リポペプチドより成る群から選択されることを特徴とする結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 2】

前記塩が二価カルシウム塩であることを特徴とする請求項 1 記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 3】

前記リポペプチドがダプトマイシンであることを特徴とする請求項 1 記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。 10

【請求項 4】

前記塩が二価カルシウム塩であることを特徴とする請求項 3 記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 5】

X 線回折パターンが、Cu (= 1.54) X 線源を用いて、回折角 (2) = 10.9、19.2 および 23.3 (度) または回折角 (2) = 19.2、23.2、23.4 および 23.6 (度) である、結晶性ダプトマイシンであることを特徴とする請求項 3 記載の結晶性リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 6】

複屈折で結晶性の特質を有するが X 線粉末回折では結晶性の特質を有しない結晶様リポペプチドであることを特徴とする、請求項 1 から 4 いずれか 1 項記載の結晶様リポペプチドもしくはその塩。 20

【請求項 7】

いが状つまり針の塊状、針状、または棒状の結晶を含むことを特徴とする請求項 3 記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 8】

結晶性ダプトマイシンが少なくとも 95 % の純度を有することを特徴とする請求項 3 記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。 30

【請求項 9】

結晶性ダプトマイシンもしくはその塩が少なくとも 97 % の純度を有することを特徴とする請求項 3 記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 10】

結晶性ダプトマイシンもしくはその塩が、単独で 1 % を超える不純物を含まないことを特徴とする請求項 3 記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 11】

前記純度が HPLC によって測定されものであることを特徴とする請求項 8 から 10 いずれか 1 項記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。 40

【請求項 12】

リポペプチドの結晶が少なくとも 5 μm であることを特徴とする請求項 1 記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 13】

結晶が少なくとも 50 μm であることを特徴とする請求項 1 記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 14】

前記リポペプチドがダプトマイシンであることを特徴とする請求項 12 または 13 記載の結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 15】

非晶形リポペプチドより高い安定性を示す結晶性リポペプチドであることを特徴とする請求項 1 記載の結晶性リポペプチドもしくはその塩。 50

【請求項 16】

非晶形リポペプチドより熱、光、分解または湿度に対して高い安定性を示す結晶性リポペプチドであることを特徴とする請求項15記載の結晶性リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 17】

前記安定性が、抗生物質活性またはリポペプチド抗生物質の分解によって測定されたものであることを特徴とする請求項16記載の結晶性リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 18】

前記リポペプチドがダプトマイシンであることを特徴とする請求項15記載の結晶性リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 19】

非晶形ダプトマイシンと比較して、無水ダプトマイシンまたはダプトマイシンの - 異性体へのより低い変換を示すことを特徴とする、請求項18記載の結晶性リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 20】

前記リポペプチドがダプトマイシン関連リポペプチドであることを特徴とする請求項1記載の結晶性リポペプチドもしくはその塩。

【請求項 21】

ダプトマイシン、A54145およびダプトマイシン関連リポペプチドより成る群から選択される結晶性または結晶様リポペプチド抗生物質と、医薬品として許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 22】

前記結晶性または結晶様リポペプチドがダプトマイシンであることを特徴とする請求項21記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記結晶性または結晶様ダプトマイシンが、経口投与用に腸溶性コーティングされていることを特徴とする請求項22記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記結晶性または結晶様ダプトマイシンが、3から75mg/kgの用量で製剤処方されていることを特徴とする請求項22記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記担体が、ダプトマイシンの経口アベイラビリティを高めることを特徴とする請求項22記載の医薬組成物。

【請求項 26】

微粉末粒子または微小球の形であることを特徴とする請求項22記載の医薬組成物。

【請求項 27】

請求項21記載の医薬組成物を含む容器。

【請求項 28】

エアロゾルとして使用されることを特徴とする請求項26記載の医薬組成物。

【請求項 29】

ダプトマイシン、A54145およびダプトマイシン関連リポペプチドより成る群から選択される結晶性または結晶様リポペプチド抗生物質と、医薬品として許容される担体とを含む処方。

【請求項 30】

医薬品処方、食品処方、飼料処方、動物薬処方、化粧品処方またはパーソナルケア処方であることを特徴とする請求項29記載の処方。

【請求項 31】

他の抗生物質、安定剤、吸収を助ける薬剤、pH緩衝剤または無機塩をさらに含む医薬品処方であることを特徴とする請求項29記載の処方。

【請求項 32】

動物飼料をさらに含み、かつ必要に応じて他の抗生物質またはビタミン類を含む飼料処方

10

20

30

40

50

であることを特徴とする請求項 2 9 記載の処方。

【請求項 3 3】

洗浄剤処方、石鹼、シャンプーおよび制汗剤より成る群から選択されるパーソナルケア処方であることを特徴とする請求項 2 9 記載の処方。

【請求項 3 4】

石鹼、シャンプーおよび医薬組成物より成る群から選択される動物薬処方であることを特徴とする請求項 2 9 記載の処方。

【請求項 3 5】

治療上効果的な量の、ダブトマイシン、A 5 4 1 4 5 およびダブトマイシン関連リポペプチドより成る群から選択される結晶性または結晶様リポペプチド、医薬品として許容されるその塩、あるいはその医薬組成物を、必要とする患者に投与する工程を含むことを特徴とする、結晶性または結晶様リポペプチド、医薬品として許容されるその塩、あるいはその医薬組成物を投与する方法。10

【請求項 3 6】

前記リポペプチドが 9 5 % を超える純度を有することを特徴とする請求項 3 5 記載の方法。。

【請求項 3 7】

前記リポペプチドがダブトマイシンであることを特徴とする請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

前記ダブトマイシンが、X 線回折パターンが Cu(λ = 1.54 Å) X 線源を用いて回折角 (2θ) = 10.9、19.2 および 23.3 (度) である結晶性ダブトマイシンであることを特徴とする請求項 3 7 記載の方法。20

【請求項 3 9】

前記ダブトマイシンが、複屈折で結晶性の特性を有するが X 線粉末回折では結晶性の特性を有しない結晶様ダブトマイシンであることを特徴とする請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 0】

前記結晶性または結晶様リポペプチド、医薬品として許容されるその塩、あるいはその医薬組成物が、微粉末粒子として投与されることを特徴とする請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 4 1】

結晶性または結晶様リポペプチド、医薬品として許容されるその塩、あるいはその医薬組成物が、目標を絞った放出形で投与されることを特徴とする請求項 3 5 記載の方法。30

【請求項 4 2】

前記リポペプチドがダブトマイシンであることを特徴とする請求項 4 0 または 4 1 記載の方法。

【請求項 4 3】

前記投与が、皮下、静脈内または筋肉内に行われることを特徴とする請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 4 4】

リポペプチドを保存する方法において、

- a) リポペプチドの溶解溶液を提供し；
- b) リポペプチドを結晶化または沈殿させ；
- c) リポペプチドを回収および乾燥し；さらに
- d) リポペプチドを保管する；各工程を含み、

前記リポペプチドが、ダブトマイシン、A 5 4 1 4 5 およびダブトマイシン関連リポペプチドより成る群から選択され、結晶性または結晶様リポペプチドが非晶形リポペプチドより安定であることを特徴とする方法。40

【請求項 4 5】

結晶性または結晶様リポペプチドを製造する方法において、

- a) 非晶形リポペプチドを提供し；
- b) 前記リポペプチドを結晶化または沈殿させ；さらに

50

c) 結晶性または結晶様リポペプチドを回収する；各工程を含み、前記リポペプチドがダブトマイシン、A 5 4 1 4 5 およびダブトマイシン関連リポペプチドより成る群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 4 6】

前記回収工程が濾過によって行われることを特徴とする請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 7】

前記工程 b) の後にリポペプチドを洗浄する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

前記工程 c) の後にリポペプチドを乾燥する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 4 10 5 または 4 6 記載の方法。

【請求項 4 9】

前記乾燥工程の後にリポペプチドを滅菌する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 0】

前記工程 c) が無菌条件下で行われることを特徴とする請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 5 1】

前記工程 b) が無菌条件下で行われることを特徴とする請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 2】

前記工程 c) の後に無菌条件下でリポペプチドを乾燥する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 5 1 記載の方法。 20

【請求項 5 3】

結晶性リポペプチドの純度が非晶形リポペプチドより高いことを特徴とする請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 5 4】

非晶形リポペプチドの純度が約 9 0 % であり、かつ結晶性または結晶様リポペプチドの純度が 9 5 % より高いことを特徴とする請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 5】

非晶形リポペプチドの純度が約 9 3 % であり、かつ結晶性または結晶様リポペプチドの純度が 9 5 % より高いことを特徴とする請求項 5 3 記載の方法。 30

【請求項 5 6】

非晶形リポペプチドの純度が約 9 3 % であり、かつ結晶性または結晶様リポペプチドの純度が約 9 8 % であることを特徴とする請求項 5 3 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の引用

本出願は、その内容がこの参照により開示に含まれる米国仮出願第 6 0 / 2 5 6 , 2 6 8 号 (2 0 0 0 年 1 2 月 1 8 日出願) ; 第 6 0 / 2 7 4 , 7 4 1 号 (2 0 0 1 年 3 月 9 日出願) ; 第 ____ 号 (2 0 0 1 年 1 2 月 1 3 日出願) ; および第 ____ 号 (2 0 0 1 年 1 2 月 1 3 日出願) の利益を主張する。 40

【0 0 0 2】

発明の技術分野

本発明は従来の抗生物質に耐性である菌株を含むグラム陽性細菌に対する強力な殺菌活性を有するリポペプチド抗生物質であるダブトマイシンを含む結晶性または結晶様リポペプチドに関する。本発明はまた結晶性または結晶様リポペプチドを調製する工程、およびダブトマイシンを含むリポペプチドを精製する方法に関する。本発明はまた精製された形態のリポペプチドを含む医薬組成物、およびこれらの組成物を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

抗生物質耐性細菌によって生じる感染を含むグラム陽性感染の件数の急速な増加は新しい種類の抗生物質の開発に対する新たな関心を呼び起こしている。そのような種類の一つがリポペプチド抗生物質であり、これはダプトマイシンを含む。ダプトマイシンは重症かつ生命に危険を及ぼす疾患を引き起こす臨床的に重要なグラム陽性細菌に対して *in vitro* で強力な殺菌活性を有する。これらの細菌はバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、グリコペプタイド低感受性黄色ブドウ球菌 (GISA)、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌 (CNS)、そしてペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)、といった、それらに対する治療の選択肢がごく少数しかない耐性病原体を含むが、これらに限定されない（例えば、非特許文献 1 参照）。ダプトマイシンの阻害効果は、*in vitro* および *in vivo* の迅速な、濃度依存性の殺菌効果、および *in vivo* の比較的持続性の濃度依存性の P A E (抗生物質後効果) である。10

【0004】

ダプトマイシンは既に報告されている（例えば、非特許文献 2 参照）。ダプトマイシンはまた L Y 1 4 6 0 3 2 の名でも知られ、*Streptomyces roseosporus* の発酵から得ることのできる環状リポペプチド抗生物質である。ダプトマイシンは *S. roseosporus* の A 2 1 9 7 8 C 0 因子系抗生物質の一員であり、環状 13 アミノ酸ペプチドのトリプトファンの N 末端に結合したデカノイル側鎖から成る（図 1）。

【0005】

ダプトマイシンは、大部分のグラム陽性細菌に対して非常に効果的であり；非常に殺菌効果が高く速効性であり；耐性率が低く抗生物質耐性菌に対して有効であるため、優れた活性プロファイルを有する。本化合物は現在、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) およびバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) を含むがこれらに限定されない細菌によって引き起こされる重症感染症を治療するためのさまざまな製剤が開発中である。20

【0006】

いくつかの米国特許はダプトマイシン (L Y 1 4 6 0 3 2) を含む A - 2 1 9 7 8 C 0 抗生物質およびダプトマイシン関連リポペプチドを記載している。これらの特許はまた A - 2 1 9 7 8 C 0 抗生物質およびダプトマイシン関連リポペプチドを生産および単離する方法を記載している。

【0007】

Streptomyces roseosporus の発酵培養物からダプトマイシンを合成および単離する方法が記載されている（例えば、特許文献 1 から 5 参照）。A - 2 1 9 7 8 C 0 抗生物質および A - 2 1 9 7 8 C 0 抗生物質を脱アシル化およびペプチド核を再アシル化する方法およびこの製法によって作られる誘導体も記載されている（例えば、特許文献 6 から 10 参照）。さらに、ダプトマイシン、無水ダプトマイシンおよびダプトマイシンの - 異性体形態の製造の間に作られる 2 種類の不純物の同定および単離も記載されている（例えば、特許文献 11 参照）。これらの米国特許のいずれも、リポペプチドの純度を高める方法でリポペプチドを沈殿または結晶化するための方法を開示していない。30

【0008】

結晶性リポペプチド、および当該リポペプチドを結晶化する方法も開示されている。特許文献 12 において開示されているリポペプチドは構造的にダプトマイシンおよびダプトマイシン関連リポペプチドとは異なる。また、ヘキサペプチドから成る結晶性環状リポペプチドも開示されている。特許文献 13 において開示されている結晶性環状リポペプチドもまた構造的にダプトマイシンおよびダプトマイシン関連リポペプチドとは異なる。特許文献 13 は、エキノカンジン系化合物である当該リポペプチドは、結晶化溶媒として n - プロパノール水溶液を用いたときに得ることができることを開示している。たとえば特許文献 13 の請求項 1 - 2 を参照のこと。特許文献 12 も特許文献 13 もダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドを結晶化または沈殿する方法を開示しておらず、またそれらは *Streptomyces* によって生産されたリポペプチドを結晶化または沈殿する方法を開示していない。40

【非特許文献 1】

Tally ら、1999、Exp. Opin. Invest. Drugs 8:1223-1238

【非特許文献2】

Biotechnology of Antibiotics第2版、W.R. Strohl編 (New York: Marcel Dekker, Inc.)、1997、pp. 415-435

【特許文献1】

米国再発行特許発明第32,333号明細書

【特許文献2】

米国再発行特許発明第32,455号明細書

【特許文献3】

米国特許第4,800,157号明細書

10

【特許文献4】

米国特許第4,874,843号明細書

【特許文献5】

米国特許第4,885,243号明細書

【特許文献6】

米国再発行特許発明第32,310号明細書

【特許文献7】

米国再発行特許発明第32,311号明細書

【特許文献8】

米国特許第4,537,717号明細書

20

【特許文献9】

米国特許第4,482,487号明細書

【特許文献10】

米国特許第4,524,135号明細書

【特許文献11】

米国特許第5,912,226号明細書

【特許文献12】

米国特許第4,439,425号明細書

【特許文献13】

米国特許第5,336,756号明細書

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

ダプトマイシンおよびダプトマイシン関連リポペプチドを結晶化または沈殿する方法を開発し、これらのリポペプチドのための改良された精製方法を提供するのは有利であると思われる。加えて、結晶性の形態または高度に精製された沈殿形態のダプトマイシンもしくは他のダプトマイシン関連リポペプチドは、細菌感染を治療するための医薬組成物を処方開発するのに有用であると思われる。さらに、結晶性の形態または高度に精製された沈殿形態のダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドは、殺菌製品、特に大量の殺菌製品を製造する方法において有用であると考えられる。したがって、結晶性または沈殿ダプトマイシンおよびダプトマイシン関連リポペプチドを製造する方法、およびそれによって製造された結晶性または沈殿した形態のそれらのリポペプチドが必要である。しかし、ダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドを結晶化または沈殿し、その結果結晶化または沈殿の後に前より純度の高いリポペプチドを得るのに効果的な、単純かつ頑健な方法は存在しなかった。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、結晶性および結晶様リポペプチド、特にダプトマイシンおよびダプトマイシン関連リポペプチド、およびそれらを製造するための方法を提供することによってこれらの問題に対処する。一実施形態において、本発明はリポペプチドを結晶化するための方法を

40

50

提供する。別の一実施形態において、本方法は結晶化または沈殿後には結晶化または沈殿前より純粋であるリポペプチドを提供する。

【0011】

本発明はまた、特にリポペプチドを結晶化または沈殿することを含む、リポペプチドを製造しある精製する頑健な方法を提供する。一実施形態において、結晶化または沈殿の工程はリポペプチドを精製するために用いられる。別の一実施形態において、その工程はリポペプチドの、好ましくはダプトマイシンの、大規模および／または商業的生産に用いられる。

【0012】

本発明はまた、ダプトマイシンおよびダプトマイシン関連リポペプチドの高度に精製された結晶性または結晶様の形態を提供する。一実施形態において、結晶性および結晶様リポペプチドは医薬組成物に使用されうる。別の一実施形態において、本発明は当該医薬組成物を使用する方法を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

図1はダプトマイシンの構造を示す図である。

【0014】

図2は実施例12に記載する方法によって製造されたダプトマイシンのいが状結晶または結晶様粒子の顕微鏡写真を示す。

【0015】

図3はダプトマイシンの針状結晶の顕微鏡写真を示す。

【0016】

図4はダプトマイシンの棒状結晶の顕微鏡写真を示す。

【0017】

図5はダプトマイシン試料の100×倍率の顕微鏡写真を示す。非晶性ダプトマイシンの顕微鏡写真が平面透過光(A)を用いておよび直交偏光(B)を用いて示されている。ダプトマイシン結晶の顕微鏡写真が平面透過光(CおよびE)を用いておよび直交偏光(DおよびF)を用いて示されている。ダプトマイシン結晶は実施例7で開示された手順によって製造された。

【0018】

図6は非晶性ダプトマイシンのX線粉末回折パターンである。

【0019】

図7は実施例7に記載された手順によって製造されたダプトマイシン結晶のX線粉末回折パターンである。

【0020】

図8は実施例7に記載された手順によって製造されたダプトマイシン結晶の別の試料のX線粉末回折パターンである。

【0021】

図9はダプトマイシンの結晶様粒子の、偏光に暴露されたときの複屈折を示す図である。結晶様粒子は実施例12に記載された方法によって製造された。

【0022】

図10は結晶化の典型的な方法のフローチャートである。

【0023】

図11は結晶化または沈殿を用いない典型的な製造方法のフローチャートである。この製造方法ではダプトマイシンを含む発酵培養物の製造に細菌発酵を用い、次いで精密濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除限外濾過、疎水クロマトグラフィーを用いてダプトマイシンを精製し、陰イオン交換クロマトグラフィーを溶媒の除去に用い、限外濾過と逆浸透を発熱性物質の除去に用い、そしてバイアルにダプトマイシンを詰める。たとえばこの種類の方法の詳細な記述について引用により開示する国際公開第WO 01 / 44274号パンフレット(2001年6月21日公開)を参照のこと。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

図12は発酵、精密濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除限外濾過、結晶化または沈殿、結晶または沈殿物の乾燥、そしてバイアルに当該化合物を乾燥充填する工程を含む、リポペプチド化合物の典型的な製造方法のフローチャートである。たとえば実施例13を参照のこと。

【 0 0 2 5 】

図13は発酵、精密濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、結晶化または沈殿、結晶または沈殿物の乾燥、そしてバイアルに当該化合物を乾燥充填する工程を含む、リポペプチド化合物の典型的な製造方法のフローチャートである。たとえば実施例14を参考のこと。
10

【 0 0 2 6 】

図14は発酵、精密濾過、サイズ排除限外濾過、結晶化または沈殿、結晶または沈殿物の乾燥、そしてバイアルに当該化合物を乾燥充填する工程を含む、リポペプチド化合物の典型的な製造方法のフローチャートである。たとえば実施例15を参考のこと。

【 0 0 2 7 】

図15は発酵、精密濾過、結晶化または沈殿、結晶または沈殿物の乾燥、そしてバイアルに当該化合物を乾燥充填する工程を含む、リポペプチド化合物の典型的な製造方法のフローチャートである。たとえば実施例16を参考のこと。

【 0 0 2 8 】

図16はダブトマイシンの環状リポペプチドアナログであるC B - 1 3 1 5 4 7の構造を描いた図である。本発明における有用なタンパク質混合物のS D S - P A G Eの、還元条件下および非還元条件下の両方を図示する図である。本発明の一つの実施例によるタンパク質混合物のH P L C画分27～36のS D S - P A G Eゲルを示す図である。
20

【 0 0 2 9 】発明の目的

本発明の一つの目的はリポペプチドを結晶化または沈殿するための方法を提供することである。一実施形態において、本方法はダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドを結晶化または沈殿させるのに用いられる。別の一実施形態において、本方法は結晶化または沈殿の前のリポペプチドの純度と比較してリポペプチドの純度を高める。本方法は、リポペプチドの非晶性調製物を与え、および、結晶性のまたは沈殿した結晶様のリポペプチドがリポペプチドの非晶性調製物より純粋である条件下でリポペプチドを結晶化または沈殿する工程を含む。一実施形態において、非晶性調製物は最高で純度92%でありそこから精製された結晶性または結晶様リポペプチドは少なくとも純度95%であり、また少なくとも純度96%、97%または98%あるいはより高純度でありうる。別の一実施形態において、非晶性調製物は最高で純度80%でありそしてそこから精製された結晶性または結晶様リポペプチドは少なくとも純度95%であり、また少なくとも96%、97%または98%あるいはより高純度でありうる。別の一実施形態において、非晶性調製物は最高で純度60%でありそしてそこから精製された結晶性または結晶様リポペプチドは少なくとも純度95%であり、また少なくとも96%、97%または98%あるいはより高純度でありうる。さらにもう一つの実施形態において、非晶性調製物は最高で純度40%でありそしてそこから精製された結晶性または結晶様リポペプチドは少なくとも純度95%であり、また少なくとも96%、97%または98%あるいはより高純度でありうる。別の一実施形態において、非晶性調製物は最高で純度20%でありそしてそこから精製された結晶性または結晶様リポペプチドは少なくとも純度95%であり、また少なくとも96%、97%または98%あるいはより高純度でありうる。より好適な一実施形態において、非晶性調製物は最高で純度10%でありそしてそこから精製された結晶性または結晶様リポペプチドは少なくとも純度95%であり、また少なくとも96%、97%または98%あるいはより高純度でありうる。
30

【 0 0 3 0 】

本発明のもう一つの目的は、特に、リポペプチドを結晶化または沈殿することから成る、
40

リポペプチドを製造および精製する方法を提供することである。一実施形態において、結晶化または沈殿の工程はリポペプチドを精製するのに用いられる。好適な一実施形態において、結晶化または沈殿は、結晶化されたバッチまたは沈殿ごとに行われる。別の一実施形態において、当該製法は、リポペプチドの、好ましくはダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドの、商業生産のための大規模製法である。一実施形態において、リポペプチドは発酵によって生産される。発酵産物は次いで、結晶化または沈殿を含むさまざまな精製方法によって精製される。一実施形態において、結晶化または沈殿の工程は、精密濾過、サイズ排除限外濾過および／または陰イオン交換クロマトグラフィーを含む他の精製方法と組み合わせて使用されうる。一実施形態において、結晶化または沈殿の工程は、結晶化または沈殿を用いない精製方法の中で用いられる一以上の精製方法に代えて用いられている。別の一実施形態において、結晶化または沈殿の工程は、結晶化または沈殿の工程を有しないその他の工程と比較して精製を高めるのに用いられる。一つの好適な実施形態において、当該方法は結晶化または沈殿の後に結晶性または結晶様リポペプチドを回収する工程から成る。

10

20

30

【0031】

本発明のもう一つの目的は、高度に精製された、たとえば無菌の、結晶性または結晶様リポペプチドを提供することである。一実施形態において、リポペプチドはダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドである。結晶性または結晶様リポペプチドは、いが状（多数の針が互いに固まりあって、いがに似た外観を呈する）（図2を参照）、針状（図3を参照）、棒状（図4を参照）、板状または薄片状を含むどのような結晶性または結晶様の形状も有しうる。一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドは少なくとも80%の純度を有し、また少なくとも純度85%、90%でありうる。別の一実施形態において、結晶性または結晶様の形態のリポペプチドは少なくとも95%の純度を有し、また少なくとも純度96%、97%、98%またはそれ以上でありうる。

20

30

【0032】

さらに一つの本発明の目的は、結晶性または結晶様リポペプチドを含む医薬組成物を提供することである。一実施形態において、リポペプチドはダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドである。一実施形態において、医薬品組成物は経口投与用に腸溶コーティングされ、または微粉末粒子または微小球の形に製剤処方されている。別の実施形態において、本発明は当該医薬組成物を、それを必要とする対象に投与する方法を提供する。

30

【0033】

定義

別に定義の無い限り、ここで用いられるすべての技術的および科学的用語は当業者が通常理解している意味を有する。本発明の実施には、別に指定の無い限り、化学、生化学、生物物理学および微生物学の従来の方法、およびそこで用いられる基本用語を用いる。

40

【0034】

「リポペプチド」の語は、共有結合でペプチド部分に結合している脂質様の部分から成る分子、およびその塩、エステル、アミドおよびエーテルをいう。「リポペプチド」の語はまた、一以上のアミノ基、カルボン酸基または水酸基が保護されている、保護された形態のリポペプチドを包含する。保護基の例についてはたとえば"Protective Groups in Organic Synthesis" Theodora W. Greene著、John Wiley and Sons、New York、1981を参照のこと。一実施形態において、当該リポペプチドは抗生素である。別の一実施形態において、当該リポペプチドはLY303366、エキノカンジン類、ニュモカンジン類、アキュレアシン類、ビスコーシン、サーファクチン、ブリパスタチンB1、アンホマイシン、または米国特許第5,629,288号において開示されたリポペプチド誘導体である。これらのリポペプチドは当該技術分野において既知である。たとえば米国特許第5,202,309号および国際公開第WO 00/08197号パンフレットを参照のこと。別の一実施形態において、当該リポペプチドはダブトマイシン関連分子である。別の一実施形態において、当該リポペプチドはダブトマイシンである。

50

【0035】

「ダプトマイシン関連分子」は、特に、ダプトマイシン、A54145、または、たとえばこれらの分子中に存在しうるすべての不斉中心について作られうるすべての立体異性体を含むダプトマイシン関連リポペプチドのような、構造的にダプトマイシンと関連した他のリポペプチドを含む。

【0036】

「ダプトマイシン関連リポペプチド」は、米国特許第4,537,717号、第4,482,487号、第RE32,311号、第RE32,310号、および米国特許出願公開第09/547,357号として現在再発行出願されている第5,912,226号、において開示されたリポペプチドを制限なく含む。ダプトマイシン関連リポペプチドはまた、国際公開第WO 01/44272号パンフレット(2001年6月21日公開)；国際公開第WO 01/44274号パンフレット(2001年6月21日公開)；および国際公開第WO 01/44271号パンフレット(2001年6月21日公開)において開示されたものを含み；これらの出願のすべては特にこの参照により開示に含まれる。上記に特定した出願において開示されたダプトマイシン関連リポペプチドは、ダプトマイシンのオルニチンおよび／またはキヌリン残基および／または脂肪酸側鎖が修飾されている合成および半合成リポペプチドに関する。ダプトマイシン関連リポペプチドはさらに、ダプトマイシンのn-デカノイル脂肪酸側鎖がn-オクタノイル、n-ノナノイル、n-ウンデカノイル、n-ドデカノイル、n-トリデカノイルまたはn-テトラデカノイル脂肪酸側鎖に置き換わっているA-21978C0抗生物質を含む。

10

20

30

40

50

【0037】

「ダプトマイシン」の語は -アスパルチル基を含むA21978C0因子系抗生物質のn-デカノイル誘導体をいう。「ダプトマイシン」はLY146032と同義である。

【0038】

「無水ダプトマイシン」の語はダプトマイシンの -アスパルチル基がサクシニミド基と環化しているダプトマイシン関連リポペプチドをいう。無水ダプトマイシンの構造についてはたとえば'226特許を参照のこと。

【0039】

「-異性体」または「ダプトマイシンの -異性体」の語は -アスパルチル基のかわりに -アスパルチル基を含むダプトマイシン関連リポペプチドをいう。ダプトマイシンの -異性体の構造についてはたとえば'226特許を参照のこと。

【0040】

「単離された」の語は、混合物中に存在する化合物の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%である化合物または製品をいう。「単離された」の語はまた、混合物群中に存在する化合物の少なくとも5~10%、10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、60~70%、70~80%または80~90%である化合物をいうと理解される。混合物中の化合物の割合は、下記の通り化合物の純度を測定するための当該技術分野において既知であるどのような方法によって測定されてもよい。

【0041】

「実質的に純粋である」とは、少なくとも95%が目的の化合物である試料をいう。好ましくは、ダプトマイシンは、試料の少なくとも95%から少なくとも97%がダプトマイシンであるとき「実質的に純粋である」。同様に、ダプトマイシン関連リポペプチドは、試料の少なくとも95%から少なくとも97%がダプトマイシン関連リポペプチドであるとき「実質的に純粋である」。

【0042】

ダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドは、それぞれ試料の少なくとも98%から少なくとも99%がダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドであるとき「本質的に純粋である」。

【0043】

ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドは、それぞれ他の化合物の存在する量がダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチド調製物の量の1%を超えないとき、他の化合物を「実質的に含まない」。

【0044】

ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドは、それぞれ他の化合物の存在する量がダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチド調製物の量の0.5%を超えないとき、他の化合物を「本質的に含まない」。

【0045】

ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドはそれぞれ他の化合物の存在する量がダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチド調製物の量の0.1%を超えないとき、他の化合物を「含まない」。あるいは、ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドはそれぞれ、他の化合物がHPLCによって検出限界がダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチド調製物の量の約0.05%以下である最大感度の条件下で検出され得ないとき、他の化合物を「含まない」。

10

【0046】

「精製」ダブトマイシンは、実質的に純粋なダブトマイシン、本質的に純粋なダブトマイシン、またはその塩、または別の化合物を実質的に含まない、本質的に含まない、または含まないダブトマイシンもしくはその塩をいう。同様に、「精製」ダブトマイシン関連リポペプチドは、実質的に純粋なダブトマイシン関連リポペプチド、本質的に純粋なダブトマイシン関連リポペプチド、またはその塩、またはまたは別の化合物を実質的に含まない、本質的に含まない、または含まないダブトマイシン関連リポペプチドまたはその塩をいう。

20

【0047】

「粗」ダブトマイシンは、純度90%未満のダブトマイシンもしくはその塩をいう。同様に、「粗」ダブトマイシン関連リポペプチドは、純度90%未満のダブトマイシン関連リポペプチドまたはその塩をいう。

20

【0048】

「半精製」ダブトマイシンは、少なくとも純度90%かつ純度95%未満であるダブトマイシンもしくはその塩をいう。同様に、「半精製」ダブトマイシン関連リポペプチドは、少なくとも純度90%かつ純度95%未満であるダブトマイシン関連リポペプチドもしくはその塩をいう。

30

【0049】

ダブトマイシン、ダブトマイシン関連リポペプチドまたは他のリポペプチドの純度は、医薬組成物における製剤処方の前のリポペプチドをいう。リポペプチドの純度は「パーセント純度」によって称される。純度の尺度は、結晶性調製物の結晶化度の程度の尺度ではない。純度は、核磁気共鳴(NMR)、ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)または微生物学的検定法を含むどのような方法によって測定されてもよい。ダブトマイシンの純度を測定するための好ましい一方法は、分析高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)による。分析HPLCの2つの方法が、この参照により開示に含まれる国際公開第WO 01/53330号パンフレット(2001年7月26日公開)に記載されている。

40

【0050】

「リポペプチド結晶」は、リポペプチドまたはリポペプチド塩の一以上の結晶をいう。結晶としてのリポペプチドの測定は、特に、光学顕微鏡法、電子顕微鏡法、X線粉末回折、固体核磁気共鳴(NMR)または偏光顕微鏡法を含むどのような方法によって測定されてもよい。顕微鏡法は結晶の長さ、直径、幅、大きさ、形を、また結晶が単粒子として存在するかまたは多結晶性であるかを測定するのに用いることができる。

【0051】

リポペプチドまたはリポペプチド粒子は、一つの方法、たとえば肉眼でまたは光学または偏光顕微鏡法によって測定されたとき、結晶性の特質を有していると判定され、しかし別

50

の方法、たとえばX線粉末回折によって測定されたとき結晶性の性質を有しない場合は、「結晶様」である。「結晶様」であるリポペプチドは一定の条件下では結晶性である可能性があり、しかし別の条件下に置かれたときは非晶性になりうる。

【0052】

「結晶性リポペプチド」または「結晶形態のリポペプチド」は、リポペプチド結晶を含むリポペプチドまたはその塩の調製物である。一実施形態において、結晶性リポペプチドは若干の非晶性リポペプチドを含みうる。一実施形態において、結晶性リポペプチドは重量で50%を超えるリポペプチド結晶を含む。別の一実施形態において、結晶性リポペプチドは60%、70%、80%、90%または95%を超えるリポペプチド結晶を含む。結晶性リポペプチドは50~60%、60~70%、70~80%、80~90%または90~95%のリポペプチド結晶を含みうる。別の一実施形態において、結晶性リポペプチドは95%を超えるリポペプチド結晶を、たとえば少なくとも96%、97%、98%または99%のリポペプチド結晶または100%のリポペプチド結晶を含む。結晶性リポペプチドはまた95~100%のどこでものリポペプチド結晶を含みうる。リポペプチド結晶の重量での割合は、医薬組成物の製剤処方前のリポペプチド調製物についていう。10

【0053】

リポペプチドの「非晶性」の形態は、ここに記載のリポペプチド結晶または結晶様リポペプチド（または結晶様粒子）をわずかしか、あるいは全く含まないリポペプチド調製物をいう。一実施形態において、非晶性リポペプチドは重量で20%未満のリポペプチド結晶または結晶様リポペプチドを含む。別の一実施形態において、非晶性リポペプチドは重量で10%未満のリポペプチド結晶または結晶様リポペプチドを含む。別の一実施形態において、非晶性リポペプチドは重量で5%未満のリポペプチド結晶または結晶様リポペプチドを含む。さらにより好適な一実施形態において、非晶性リポペプチドは重量で1%未満のリポペプチド結晶または結晶様リポペプチドを含む。20

【0054】

「バッチ結晶化」は、目的のリポペプチドを結晶化試薬溶液と混合しリポペプチドを溶液中で結晶化させる方法をいう。「バッチ沈殿」は、リポペプチドを沈殿試薬溶液と混合しリポペプチドを溶液中で沈殿させる方法をいう。一実施形態において、結晶性または沈殿した調製物は溶液から回収される。別の一実施形態において、結晶性または沈殿した調製物は濾過または遠心分離によって回収される。30

【0055】

「有機沈殿剤」は、ポリエチレングリコール（PEG）またはポリエチレングリコールモノメチルエーテル（PEGMME）または化学的に類似した化合物をいう。

【0056】

「塩」は、イオン化合物をいう。これらのイオン化合物は沈殿剤として作用しうる。

【0057】

「低分子量アルコール」は、少なくとも1個のアルコール官能基、および8個以下の炭素原子を含む有機化合物である。たとえば、低分子量アルコールには、制限なく、メタノール、イソプロパノール、およびtert-ブタノールが含まれる。

【0058】

[p.11] 「多価アルコール」は、1個以上のアルコール基、および8個以下の炭素原子を含む化合物をいう。多価アルコールには、たとえば、制限なく、1,6-ヘキサンジオール、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、1,2-ブロパンジオール、2-メチル-2,4-ペンタンジオールおよび1,4-ブタンジオールが含まれる。40

【0059】

「容器」は、物を保持するための入れ物をいう。たとえば、容器には、制限なく、アンプル、バイアル、試験管、瓶、またはシリンドラが含まれる。

【0060】

精製リポペプチドを製造する方法

10

20

30

40

50

本発明の一つの目的は、リポペプチドの非晶性調製物を与えてリポペプチドを結晶化または沈殿する工程を含むリポペプチドの精製方法を提供することである。一実施形態において、リポペプチドは結晶化または沈殿に供される前より結晶化または沈殿の後により高い純度を有する。リポペプチドは、ハンギングドロップ、シッティングドロップまたはサンドイッチドロップ蒸気拡散法、液・液つまり自由界面拡散法、微量透析法または透析法、緩速溶媒蒸発、昇華、あるいはマイクロバッチ結晶化法またはバッチ結晶化法によって結晶化されうる。一般に、リポペプチドは同様の方法によって沈殿することができ、リポペプチドはバッチ沈殿によって沈殿されるのが好ましい。一つの好適な実施形態において、結晶化または沈殿されたリポペプチドはダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドである。より好適な一実施形態では、結晶化または沈殿されたリポペプチドはダブトマイシンである。

10

【0061】

リポペプチドは、本明細書の教示に従って結晶化または沈殿されうる。一実施形態において、下記でさらに論じる通り、低分子量または多価アルコール、pH緩衝剤、および一価または二価陽イオンを含む塩を含む溶液をリポペプチドに加え、沈殿または結晶化を起こさせることによって、リポペプチドは結晶化または沈殿されうる。別の一実施形態において、塩は緩衝能を有するので追加のpH緩衝剤は溶液中に存在しなくてもよい。別の一実施形態において、塩は二価陽イオンを含む。一つの好適な実施形態において、加える溶液はPEGまたはPEG-MMEまたは化学的に類似した化合物を含まない。一実施形態において、リポペプチドを沈殿または結晶化させるための方法は一般にa)リポペプチドを一価または二価陽イオンを含む塩、任意でpH緩衝剤、および低分子量または多価アルコールと混合し；そしてb)リポペプチドを適切な温度条件下で溶液から沈殿または結晶化させる工程を含む。

20

【0062】

試料は、特に、結晶または沈殿形成に関して顕微鏡検査によって観察することができ、得られたものは分光光度法で追跡しうる。好適な一実施形態において、結晶化または沈殿したリポペプチドはダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドである。

30

【0063】

別の一実施形態において、下記でさらに論じる通り、リポペプチドは低分子量または多価アルコール、塩、および有機沈殿剤を含む溶液を加えることによって結晶化できる。より好適な一実施形態において、結晶化されたリポペプチドはダブトマイシンである。一般に、バッチ結晶化のためには、リポペプチドは溶液に溶解しそして低分子量アルコール、塩、緩衝剤および／または有機沈殿剤が溶液に添加される。試料は次いで適切な温度条件下で、攪拌ありまたはなしで結晶化される。試料は、特に、結晶形成に関して顕微鏡検査によって観察することができ、得られたものは分光光度法で追跡しうる。

40

上記の通り、リポペプチド、好ましくはダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドは、一以上のアルコールの存在下で結晶化または沈殿される。一つの好適な実施形態において、アルコールは低分子量または多価アルコールである。低分子量または多価アルコールの例としては、制限なく、メタノール、イソプロパノール、tert-ブタノール、1,6-ヘキサンジオール、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、1,2-プロパンジオール、2-メチル-2,4-ペンタンジオール、および1,4-ブタンジオールが含まれる。好適な一実施形態において、アルコールはイソプロパノール、tert-ブタノール、グリセロール、1,6-ヘキサンジオール、1,2-プロパンジオール、1,4-ブタンジオール、プロピレングリコールおよび／またはエチレングリコールである。より好適な一実施形態において、アルコールはイソプロパノールである。

【0064】

塩には、特に、ギ酸マグネシウムまたはナトリウム、硫酸アンモニウム、リン酸二水素ナトリウム、酢酸カルシウム、酢酸亜鉛、クエン酸三ナトリウム二水和物、酢酸マグネシウム、酢酸ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カドミウム、酢酸アンモニウム、塩化ナトリウムおよび硫酸リチウムを含む。一実施形態において、塩はたとえばナトリウムといっ

50

た一価陽イオンを含む。一つの好適な実施形態において、塩は二価陽イオンを含む。より好適な一実施形態において、塩はカルシウム陽イオン、マグネシウム陽イオンまたはマンガン陽イオンである。さらに好適な一実施形態において、塩は二価カルシウム陽イオンを含む。一実施形態において、塩は塩化カルシウム、酢酸カルシウム、酢酸亜鉛、クエン酸ナトリウム、クエン酸三ナトリウム二水和物、塩化マグネシウム、硫酸リチウム、塩化ナトリウム、酢酸マグネシウム、酢酸ナトリウムまたは、酢酸マンガンまたは塩化マンガンといったマンガン塩である。好適な一実施形態において、塩は酢酸カルシウムである。たとえばカルシウム陽イオンのような二価陽イオンを含む他の塩の例は、当該技術分野において既知であり、特に、この参照により開示に含まれる2000年シグマ社カタログ中に列挙されたものを含む。どのような理論に縛られることも求めず、塩の陽イオンはたとえばダブトマイシンの4個のカルボキシル酸といったリポペプチドの負電荷を中和しうると考えられている。有機沈殿剤は、特に、平均分子量が300から10,000までの間で変化しうるポリエチレングリコール(PEG)、またはポリエチレングリコールモノメチルエーテル(PEG-MME)を含む。一つの好適な実施形態において、有機沈殿剤はPEG300、PEG600、PEG2000、PEG4000、PEG8000またはPEG10,000である。

【0065】

リポペプチドは、pH5.0から9.5に緩衝された溶液から沈殿されるかまたは結晶化される。一実施形態において、緩衝される前は、溶液のpHは約1.5、2.0または3.0である。一実施形態において、ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドは、約pH5.5から約pH7.5の溶液から沈殿されるかまたは結晶化される。別の一実施形態において、緩衝液はpH約5.9から約pH6.3である。一実施形態において、緩衝溶液はpH緩衝剤を用いることによって得ることができる。pH緩衝剤の例は、制限なく、トリス、リン酸塩、クエン酸塩、HEPES、CHES、酢酸ナトリウムまたは2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、ホウ酸ナトリウム、カコジル酸ナトリウム、イミダゾールおよびクエン酸三ナトリウム二水和物を含む。好適な一実施形態において、塩はカコジル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸三ナトリウム二水和物、HEPES、MES、CHES、イミダゾール、酢酸カルシウム、およびトリス-HClである。より好適な一実施形態において、pH緩衝液はpH6.1酢酸カルシウム、pH6.1酢酸ナトリウム、pH6.5カコジル酸ナトリウム、pH5.6クエン酸三ナトリウム二水和物、pH7.5HEPES、pH8イミダゾール、pH6.0MES、pH6酢酸カルシウムおよびpH8.5トリス-HClである。別の一実施形態において、溶液は緩衝能も有する塩を用いることによって緩衝されうる。好適な一実施形態において、pH緩衝液はpH6.1酢酸カルシウムである。

【0066】

リポペプチドは、2~40%の低分子量または多価アルコール、0.001~0.5Mの塩、および0.005~0.2MのpH緩衝剤を含む溶液から、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて沈殿されるかまたは結晶化される。好適な一実施形態において、リポペプチドは、3~30%の低分子量または多価アルコール、0.01~0.3Mの塩、および0.01~0.1MのpH緩衝剤を含む溶液から、沈殿されるかまたは結晶化される。より好適な一実施形態において、リポペプチドは、5~20%の低分子量または多価アルコール、0.02~0.1Mの塩、および0.02~0.07MのpH緩衝剤を含む溶液から、沈殿されるかまたは結晶化される。与えられる溶液はポリエチレングリコール(PEG)またはポリエチレングリコールモノメチルエーテル(PEG-MME)を含んでもまたは含まなくてよい。

【0067】

リポペプチドは、65~95%の低分子量または多価アルコール、0.001~0.5Mの塩、および0.001~0.2MのpH緩衝剤を含む溶液から、バッチ結晶化を用いて沈殿されるかまたは結晶化される。一つの好適な実施形態において、リポペプチドは、70~90%の低分子量または多価アルコール、0.005~0.04Mの塩、および0.005~0.04MのpH緩衝剤を含む溶液から、沈殿されるかまたは結晶化される。一部の実

10

20

30

40

50

施形態において、リポペプチドは、3～8%の有機沈殿剤も含む溶液から、結晶化される。より好適な一実施形態において、リポペプチドは、80～85%の低分子量または多価アルコール、0.01～0.03Mの塩、および0.01～0.03MのpH緩衝剤を含む溶液から、沈殿されるかまたは結晶化される。一部の実施形態において、溶液はさらに約4～5%の有機沈殿剤、たとえばPEGまたはPEG-MMEを含む。別の実施形態において、与えられる溶液はポリエチレンギリコール(PEG)またはポリエチレンギリコールモノメチルエーテル(PEG-MME)を含まない。

【0068】

リポペプチドは、沈殿または結晶の形成を達成するため、約0から約30までの温度でそれぞれ沈殿されるかまたは結晶化される。好適な一実施形態において、リポペプチドは、約20～30の温度で結晶化または沈殿される。より好適な一実施形態において、混合物は約23～28で結晶化または沈殿された。さらにより好適な一実施形態において、混合物は約27で結晶化または沈殿された。混合物は結晶化または沈殿が結果として生じるどのような期間のあいだでも、好ましくは約1時間から約2週間、結晶化または沈殿されうる。好適な一実施形態において、混合物は約3時間から約24時間の期間、より好ましくは約8～18時間の期間、保存される。

【0069】

リポペプチド結晶または結晶様粒子は、制限なく、針状、棒状、いが状、薄片状、板状、またはその集団の形状を有する。一実施形態において、リポペプチド結晶または結晶様粒子はいが状、棒状または針状である。結晶または結晶様粒子の形状は、特に、光学または電子顕微鏡法によって測定しうる。別の一実施形態において、リポペプチド結晶または結晶様粒子はどの次元でも少なくとも直径約0.5μmであるどのような大きさでもありうる。より好適な一実施形態において、リポペプチド結晶または結晶様粒子は少なくとも5μmであり、より好ましくは少なくとも10μmである。さらにより好適な一実施形態において、リポペプチド結晶または結晶様粒子は少なくとも50μmであり、より好ましくは少なくとも100μmである。結晶の大きさは、当該技術分野で通常の技能を有する者に知られているどのような方法によっても測定しうる。たとえば、米国薬局方(USP)、pp.1965-67を参照のこと。

【0070】

結晶性または結晶様リポペプチドの特性は、当該技術分野で通常の技能を有する者に知られているどのような方法によっても測定しうる。測定しうる特性は、結晶性または結晶様リポペプチドの大きさ、形状、複屈折特性、粉末X線回折特性、固体NMR特性、融点および熱、光、湿度に対する安定性、および分解を含む。好適な一実施形態において、当該技術分野で通常の技能を有する者はリポペプチドが結晶性かどうかを粉末X線回折によって決定することができる。粉末X線回折は、試料が小さい結晶が不規則に配列した集団であるとき、調製物が結晶性かどうかを決定するのに非常に有用である。不規則に配列した微結晶の塊の回折によって、試験した分子およびその構造の特徴を示す一連の線または輪が(検出器に依存して)得られる。一つの好適な実施形態において、リポペプチドが結晶性かどうか決定するため、粉末回折が自動粉末回折装置によって測定される。たとえば粉末回折のためのDebye-Scherrer法の考察についてこの参考により開示に含まれるAtkinsら、Physical Chemistry、pp. 710-716(1978)を参照のこと。当該技術分野において既知であるどのような粉末回折用検出器でもを装備した当該技術分野において既知であるどのような粉末回折装置でも回折パターンの測定に用いることができる。

【0071】

本発明の一つの好適な実施形態において、リポペプチドは約pH5.0および9.5の間の緩衝剤、塩、およびアルコールを用いて、約24～28の温度で、約3～24時間の期間、結晶化または沈殿される。一つの好適な実施形態において、塩は緩衝剤でありまた二価陽イオンを含み、またアルコールは低分子量アルコールであり、またpHは約pH5.5と7.5の間である。さらにより好適な一実施形態において、塩はカルシウム塩であり、アルコールはイソプロパノールであり、pHは約pH5.9と6.3の間である。溶液が

10

20

30

40

50

有機沈殿剤を含む実施形態では、好ましくは有機沈殿剤は P E G 4 0 0 0 または P E G 8 0 0 0 である。別の一実施形態において、リポペプチドは、1 2 ~ 1 8 % のグリセロール、0 . 3 ~ 0 . 8 の塩、0 . 0 3 ~ 0 . 0 8 の pH 緩衝剤、および1 2 ~ 1 8 % の P E G 6 0 0 を含む溶液から沈殿されるかまたは結晶化される。さらにより好適な一実施形態において、リポペプチドはダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドである。実施形態 2 ~ 3 は、高純度の結晶様ダプトマイシンを沈殿させる方法を提供する。当該技術分野で通常の技能を有する者は、本明細書の教示に従って、ダプトマイシン、ダプトマイシン関連リポペプチド、または目的の他のリポペプチドを結晶化または沈殿させるために、実施形態に示した結晶化または沈殿の条件を変更することができる。さらに、本明細書の教示はリポペプチドの精製のための方法における単一の結晶化または沈殿の工程の使用を記述しているが、当該技術分野で通常の技能を有する者は、本明細書の教示に従って、リポペプチドの精製のための方法において複数の結晶化または沈殿の工程を使用することができる。ここに開示されたように、リポペプチドの純度をさらに向上させるために複数回の結晶化または沈殿を行うことは有利であろう。

10

20

30

【 0 0 7 2 】
 結晶化または沈殿の後、結晶性物質または結晶様沈殿物は当該技術分野において既知であるどのような方法によっても回収することができる。一つの好適な実施形態において、結晶性物質または結晶様沈殿物は遠心分離または濾過によって回収される。さらにより好適な一実施形態において、リポペプチドを製造するための大規模製法に濾過は容易に組み込まれるため、結晶性物質または結晶様沈殿物は濾過によって回収される。結晶性物質または結晶様沈殿物が回収された後、結晶性物質または結晶様沈殿物は過剰の結晶化または沈殿試薬を除去するため洗浄してもよい。結晶性物質または結晶様沈殿物を目につくほど溶解しない限り、当該技術分野において既知であるどのような洗浄溶媒でも選択されうる。洗浄溶媒の一例を実施例 1 2 に提供する。結晶性物質または結晶様沈殿物を洗浄した後、結晶性物質または結晶様沈殿物は当該技術分野において既知であるどのような方法によって乾燥してもよい。乾燥方法の例としては風乾、凍結乾燥（フリーズドライ）あるいはデシケータ乾燥がある。好適な一実施形態において、結晶性物質または結晶様沈殿物はデシケータ乾燥される。たとえば実施例 1 2 を参照のこと。別の一実施形態において、結晶性リポペプチドの安定性はその残余抗生物質活性またはその分解によって測定されうる。抗生物質活性は、さまざまな細菌菌株に対する標準の寒天拡散法で測定されうる。たとえば、特にこの参考により開示に含まれる米国特許第 4 , 5 3 7 , 7 1 7 号の実施例 3 2 を参考のこと。分解量は、特に、国際公開第 W O 0 1 / 5 3 3 3 0 号パンフレット（2 0 0 1 年 7 月 2 6 日公開）に記載されたように H P L C 分析によって測定されうる。好適な一実施形態において、結晶性リポペプチドの安定性はリポペプチドの非晶性の形態の安定性よりも大きい。結晶性リポペプチドの安定性は、結晶性リポペプチドおよびその非晶形リポペプチドを熱、光、湿度に暴露し、結晶形態の分解程度を非晶形態の分解程度と測定することによって決定されうる。

40

【 0 0 7 3 】
 リポペプチドの分解は、リポペプチドの生物活性、または適用しうるどの物理パラメータでもを測定することによって測定されうる。一実施形態において、分解はリポペプチドの特定の生物活性を、熱、光、湿度、p H 变化または極端な p H の下に置かれた後に測定し、それをリポペプチドのすべての安定性試験以前の同じ生物活性と比較することによって測定されうる。分解量はたとえば、安定性試験の後に残存している生物活性の割合を測定することによって測定されうる。残存生物活性の割合は、同じ試験に供された非晶形リポペプチドの残存生物活性の割合と比較しうる。一実施形態において、リポペプチドが抗生物質であれば、結晶性リポペプチドは抗生物質活性について安定性試験の前後両方に試験され、分解試験の前後に試験された非晶性リポペプチドと比較されうる。一つの好適な実施形態において、リポペプチドはダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドであり、生物活性試験はリポペプチドのグラム陽性細菌に対する抗生物質活性の大きさを決定する。

50

【0074】

リポペプチドの分解はまた、物理的分析によっても測定されうる。一実施形態において、安定性試験後に残っている未変化の結晶性リポペプチドの割合を測定することによって分解は測定されうる。残存する未変化のリポペプチドの割合は、同じ安定性試験に供された非晶形リポペプチドの残存する未変化のリポペプチドの割合と比較されうる。好適な一実施形態において、リポペプチドの分解はHPLC、紫外分光、赤外分光、NMR、または質量分析によって測定されうる。さらにより好適な一実施形態において、結晶性リポペプチドが安定性試験に供された後に残っている未変化のリポペプチドの割合を測定するのにHPLCが用いられる。

【0075】

どのような理論に縛られることも求めず、出願人はダブトマイシンは上記の方法によって結晶化されると信じる。しかし、ダブトマイシン結晶を洗浄および／または乾燥することは、ダブトマイシン結晶性物質を、非晶性であるがなお結晶様である形態に戻す原因となると考えられている。にもかかわらず、上記の方法がダブトマイシンもしくは他のリポペプチドを結晶化させるよりただ沈殿させるとしても、本方法はリポペプチドを精製するため、本方法はなお有利である。

【0076】

本発明はまた、上記の方法で製造された結晶性または結晶様リポペプチドを提供する。一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドが含む一以上の不純物の量が結晶化または沈殿前のリポペプチドと比較して少ない。一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドはダブトマイシンが含む無水ダブトマイシンおよび／またダブトマイシンの-異性体の濃度が結晶化または沈殿前のダブトマイシンと比較して低い。別の一実施形態において、結晶性または結晶様ダブトマイシンが含むすべての不純物の濃度が非晶性ダブトマイシンと比較して低い。同様に、別の一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドはダブトマイシン関連リポペプチドであり、上記の通り、含有する一以上の不純物の濃度が非晶形ダブトマイシン関連リポペプチドと比較して低い。さらにもう一つの実施形態において、結晶性または結晶様ダブトマイシン関連リポペプチドが含むすべての不純物の濃度が非晶形ダブトマイシン関連リポペプチドと比較して低い。

【0077】

上記の方法で製造された結晶性または結晶様リポペプチドは、一価または二価の陽イオンおよび水を含む可能性が高い。好適な一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドは、二価の陽イオンを含むダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドである。より好適な一実施形態において、二価の陽イオンはカルシウム陽イオンである。さらにより好適な一実施形態において、結晶性または結晶様ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドは、原子吸光または熱重量分析による測定で、重量で約1～10%の二価カルシウム陽イオンおよび重量で約0～15%の水を含む。より好適な一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドはダブトマイシンであって重量で約5%の二価カルシウム陽イオンおよび重量で約10%の水を含み；HPLC分析によると、結晶性または結晶様ダブトマイシンの純度は、関連化合物および有機夾雑物と相対的に、少なくとも95%、96%、97%または98%あるいは95～98%の間のいずれかの純度である。あるいは、結晶性または結晶様ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドは、ナトリウムのような一価陽イオンを含む。どのような理論に縛られることも求めず、ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドは結晶化または沈殿するときに一価または二価陽イオンと塩を形成すると考えられている。

【0078】

結晶形態のリポペプチドは、非晶形リポペプチドよりも、溶液中で増大した溶解度を示すかまたは溶液中で増大した再構成速度を示しうる。結晶性リポペプチドが増大した溶解度または増大した再構成速度を示すかどうかを測定するには、当該技術分野において既知であるどのような方法をも使用しうる。たとえば、結晶性リポペプチドの定められた量を水溶液に溶解し、溶解したリポペプチドの濃度を測定して、等量の非晶性リポペプチドを水

10

20

30

40

50

溶液に溶解して調製した溶解リポペプチドの濃度と比較することができる。同様に、結晶性リポペプチドを水溶液に加え、次いで溶解したリポペプチドの濃度を時間に沿って測定しそれを同様の方法で測定した非晶性リポペプチドの再構成速度と比較することによって、結晶性リポペプチドの再構成速度を測定することができる。リポペプチドの濃度はHPLCで測定される。

【0079】

上記の方法は、結晶化または沈殿された元の非晶性リポペプチドよりも純粋である結晶性または結晶様リポペプチドの生産を提供する。一実施形態において、リポペプチドはダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドである。別の一実施形態において、ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドの純度は結晶化の前には92%だけであり、結晶様リポペプチドとして結晶化または沈殿した後の純度は少なくとも純度約95%、96%、97%または98%、あるいは95~98%の間のいずれかの純度である。さらにより好適な一実施形態において、ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドの純度は結晶化の前には90%だけであり、結晶化後の純度は少なくとも純度約97%または98%である。

【0080】

別の一実施形態において、ダブトマイシンの純度は結晶化または沈殿の前には80%だけ、好ましくは70%だけ、より好ましくは60%だけであり、精製後は少なくとも純度約95%、96%、97%または98%、あるいは95~98%の間のいずれかの純度である。別の一実施形態において、ダブトマイシンの純度は結晶化の前には50%だけ、好ましくは40%だけ、より好ましくは30%だけであり、結晶化または沈殿による精製後には少なくとも純度約95%、96%、97%または98%、あるいは95~98%の間のいずれかの純度である。さらに好適なのは、ダブトマイシンの純度は結晶化の前には20%だけ、より好ましくは15%だけ、さらにより好ましくは10%だけであり、精製後には少なくとも純度約95%、96%、97%または98%あるいは95~98%の間のいずれかの純度である一実施形態である。

【0081】

より好適な一実施形態において、リポペプチドはダブトマイシンである。ダブトマイシン調製物は、たとえば特にこの参照により開示に含まれる米国特許第RE32,333号、第RE32,455号、第4,800,157号、第RE32,310号、第RE32,311号、第4,537,717号、第4,482,487号、第4,524,135号、第4,874,843号、第4,885,243号または第5,912,226号、のいずれかで開示されたどの方法によっても得ることができる。ダブトマイシン調製物はまた国際公開第WO 01/53330号パンフレット(2001年7月26日公開)に記載された方法の一つによつても得ることができる。リポペプチド調製物が調製された後、リポペプチド調製物は、結晶性または結晶様リポペプチドが調製された元のリポペプチド調製物よりも純度が高いかまたは、たとえば無水ダブトマイシンといった特定の不純物を含む濃度が低い、結晶性または結晶様リポペプチドを製造するための本明細書に記載された教示に従つて結晶化または沈殿される。

【0082】

発酵培養物から精製リポペプチドを製造する方法

本発明のもう一つの実施形態は、精製リポペプチドを製造するための処理クロマトグラフィーの工程と結晶化または沈殿工程とを組み合わせた方法を描いている。一つの好適な実施形態において、本方法は、たとえば天然生物または組み換え生物による発酵といった当該技術分野において既知であるいずれかの手段を用いてリポペプチドを製造する工程と、次いでリポペプチド調製物を部分的に精製されたリポペプチド調製物を製造するためにたとえば精密濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、および/またはサイズ排除クロマトグラフィー(従来のサイズ排除クロマトグラフィー媒体を介して、または限外濾過を介して)といった一以上のいずれかの精製方法に供する工程、その後精製された結晶性または結晶様リポペプチドを得るためにリポペプチド調製物を結晶化

10

20

30

40

50

または沈殿させる工程とを含む。一つの好適な実施形態において、リポベプチドはダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポベプチドである。発酵、精密濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーおよび限外濾過に関する工程は当該技術分野で、たとえば米国特許第RE 3 2, 3 3 3号、第RE 3 2, 4 5 5号、第4, 8 0 0, 1 5 7号、第RE 3 2, 3 1 0号、第RE 3 2, 3 1 1号、第4, 5 3 7, 7 1 7号、第4, 4 8 2, 4 8 7号、第4, 5 2 4, 1 3 5号、第4, 8 7 4, 8 4 3号、第4, 8 8 5, 2 4 3号または第5, 9 1 2, 2 2 6号、国際公開第WO 0 1 / 5 3 3 3 0号(2001年7月26日公開)のいずれかで開示されている。

【0083】

本方法は、結晶化または沈殿の工程後に、回収および／または洗浄する工程を必要に応じて含む。好適な一実施形態において、結晶性リポベプチド調製物は濾過によって回収される。別の一実施形態において、結晶性または結晶様の物質は乾燥される。

【0084】

一実施形態において、精製法はダブトマイシンを含む発酵培養物を得るために*Streptomyces roseosporus*を発酵させることを含む。一実施形態において、*S. roseosporus*は米国特許第4, 8 8 5, 2 4 3号中の記載の通りに発酵させることができる。別の一実施形態において、A - 2 1 9 7 8 C 0 - を含む粗産物が*Streptomyces roseosporus*によって生産される発酵条件が、ダブトマイシンの生産を増加させ*S. roseosporus*発酵培養物に生産される不純物および関連する夾雜物を減少させるために国際公開第WO 0 1 / 5 3 3 3 0号パンフレット(2001年7月26日公開)に記載されたように変更されている。国際公開第WO 0 1 / 5 3 3 3 0号は、'2 4 3特許に記載されたように*Streptomyces roseosporus*を発酵させることを記載していて、デカン酸の供給が発酵の全体終了を減少させることなく可能な最低レベルに保たれているという変更がある。

【0085】

あるいは、ダブトマイシンは細菌菌株または組み換えによってダブトマイシンを生産する他の生産生物を発酵させることによって得ることができる。一実施形態において、組み換え細菌菌株または他の組み換え生物は、ダブトマイシン生合成遺伝子群を含む。別の一実施形態において、ダブトマイシン生合成遺伝子群またはその一部は細菌人工染色体(BAG)を介して生物または細菌菌株に導入される。別の一実施形態において、使用した組み換え細菌菌株は、ダブトマイシン生合成遺伝子群を含むBAGを含む*S. roseosporus*または*S. lividans*である。米国仮出願第6 0 / 2 7 2, 2 0 7号(2001年2月28日出願)は、*S. roseosporus*由来ダブトマイシン生合成遺伝子群およびその用法を記載しており、この参照によりその全体が開示に含まれる。

【0086】

発酵後に、当該技術分野において既知である通り、または国際公開第WO 0 1 / 5 3 3 3 0号に記載された通り、発酵培養液は遠心分離、精密濾過または抽出によって清澄化される。一つの好適な実施形態において、清澄化は精密濾過によって行われる。たとえば実施例13～16および図11～15を参照のこと。図11は結晶化または沈殿を用いない典型的な製造方法を示している。

【0087】

発酵培養液を清澄化した後、培養液中のダブトマイシン濃度は約5～10%である。本発明の一実施形態において、ダブトマイシン調製物は精密濾過の直後に、上記の結晶化または沈殿工程に供される。一実施形態において、結晶化または沈殿は無菌条件下で行われる。結晶化または沈殿の完了後、下記にさらに詳述する通り、結晶性または結晶様ダブトマイシンは必要に応じて回収され、洗浄され乾燥される。乾燥バルク活性薬は次いで滅菌バイアルを乾燥充填するのに用いることができる。たとえば実施例16および図12を参照のこと。

【0088】

発酵培養液を清澄化した後、当該技術分野において既知である通り、または国際公開第WO 0 1 / 5 3 3 3 0号またはここに記載された通り、陰イオン交換クロマトグラフィー

10

20

30

40

50

によってリポペプチドを調製物中で濃縮することができる。たとえば実施例13～14および図12～13を参照のこと。陰イオン交換クロマトグラフィーの後、培養液中のダプトマイシンの純度は約35～40%である。本発明の一実施形態において、ダプトマイシン調製物は次いで、陰イオン交換クロマトグラフィーの直後に、上記の結晶化または沈殿法に供される。一実施形態において、結晶化または沈殿は無菌条件下で行われる。結晶化または沈殿の完了後、下記の通り結晶性または結晶様ダプトマイシンは必要に応じて回収され、洗浄され乾燥される。乾燥バルク活性薬は次いで滅菌バイアルを乾燥充填するのに用いることができる。たとえば実施例14および図13を参照のこと。

【0089】

本発明の別の一実施形態において、ダプトマイシン調製物は、陰イオン交換クロマトグラフィーの後に、サイズ排除限外濾過に供される。サイズ排除限外濾過は、国際公開第W001/53330号パンフレットに記載されている。この出願(2001年7月26日公開)は、呼び分子量(NMW)10,000から30,000の限外濾過膜を用いてダプトマイシンを発熱性物質除去、濾過および濃縮する方法を記載している。この出願は、たとえばエンドトキシンのような分子量の大きい不純物はフィルターによって保持される一方でリポペプチドは限外濾過膜を通過する方法を開示している。リポペプチドが膜を通過した後、リポペプチド溶液のpH、温度および/または塩濃度は、リポペプチドがミセルを形成するように変えられる。リポペプチド溶液は次いで、リポペプチドミセルが膜上に保持される一方でより小さい不純物がフィルターを通過する条件下で限外濾過膜で濾過される。この方法で、リポペプチドはさらに精製される。この出願は、リポペプチドミセルが形成されまた解離しうる条件と、また、より精製されたリポペプチドの応用を得るためにリポペプチドの濾過方法を開示している。さらにより好適な一実施形態において、リポペプチドはダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドである。リポペプチドは次いで、ここに記載の通り結晶化されうる。陰イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除限外濾過の両方の後、ダプトマイシンの純度は約80～90%である。上記で議論した通り、ダプトマイシン調製物は次いで上記の結晶化または沈殿法に、好ましくは無菌条件下で供される。結晶性または結晶様ダプトマイシンは必要に応じて回収され、洗浄され、乾燥されてバイアルを乾燥充填するのに下記の通り用いることができる。たとえば実施例13および図12を参照のこと。

【0090】

本発明の別の一実施形態において、粗ダプトマイシン調製物は、陰イオン交換クロマトグラフィーなしでサイズ排除限外濾過に供される。サイズ排除限外濾過の後、ダプトマイシンの純度は約35～40%である。リポペプチドは次いでここに記載の通り、好ましくは無菌的な方法で、結晶化または沈殿されうる。上記の通り、結晶性または結晶様ダプトマイシンは回収され、洗浄され、乾燥されて滅菌バイアルを乾燥充填するのに用いることができる。たとえば実施例15および図14を参照のこと。

【0091】

他の一実施形態において、リポペプチド調製物は陰イオン交換クロマトグラフィーまたはサイズ排除限外濾過の後に、たとえば国際公開第W001/53330号に記載の通り、疎水クロマトグラフィー(HIC)に供される。リポペプチドは次いでここに記載の通り、結晶化または沈殿されうる。

【0092】

結晶化または沈殿の後、結晶性または結晶様リポペプチドは、ここに記載の方法によって、たとえば濾過または遠心分離によって、回収されうる。結晶性または結晶様リポペプチドは、残存する結晶化または沈殿溶媒を除去するため必要に応じて洗浄される。結晶または結晶様物質を洗浄する方法は下に記載する。たとえば実施例3を参照のこと。洗浄されたまたは洗浄されない結晶または結晶様物質は乾燥されうる。乾燥は、制限なく、真空乾燥、スプレードライ、トレイ乾燥または凍結乾燥を含む当該技術分野において既知であるいずれかの方法を用いて行うことができる。一実施形態において、乾燥は無菌条件下で行われる。別の一実施形態において、乾燥は真空乾燥によって行われる。より好適な一実施

10

20

30

30

40

50

形態において、乾燥は 0.65 m^3 の Klein(商標)ハステロイ-Bダブルコーン型真空乾燥機または同等の機器を用いて行われる。乾燥した結晶性または結晶様リポペプチドは安定であり保存が容易である。

【0093】

一実施形態において、バイアルに乾燥した結晶性または結晶様リポペプチドの任意の扱いやすい量を充填する。一実施形態において、バイアルは無菌条件下で充填し、次いで栓をする。別の一実施形態において、バイアルに各 50 から 5000 mg の乾燥した結晶性または結晶様リポペプチドを充填する。別の一実施形態において、バイアルに各 100 から 1000 mg を充填する。別の一実施形態において、乾燥した結晶性または結晶様リポペプチドはリポペプチドのバルク包装に用いられる。バルク包装は通常、結晶性または結晶様リポペプチドが各 5000 mg より大きい。一実施形態において、バルク包装は無菌条件下で行われる。10

【0094】

一実施形態において、結晶化または沈殿の工程は無菌条件下で行われる。この実施形態では、滅菌した結晶化または沈殿試薬および滅菌した、管理下にある作業環境が用いられる。一実施形態において、リポペプチドは無菌の結晶化または沈殿試薬と混合される前に、上記で開示されたように限外濾過膜で濾過される。結晶化または沈殿の後、結晶性または結晶様リポペプチド調製物は、無菌条件下で、遠心分離または濾過によって回収される。一実施形態において、リポペプチド調製物は滅菌濾過によって回収される。別の一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドは回収された後に滅菌される。無菌の結晶化、沈殿および濾過の方法は、医薬品最終製品を滅菌する方法と同様に、当該技術分野において既知である。たとえば、参照により開示に含まれる Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company (1995)、pp. 1474 - 1487、を参照のこと。20

【0095】

別の一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドは乾燥されない。この実施形態では、結晶性または結晶様リポペプチドは、好ましくはリポペプチドの結晶性または結晶様の性質を維持する溶液中に保存する。バイアルには無菌または非無菌条件下でリポペプチドおよび溶液を詰めることができる。一実施形態において、その条件は無菌である。あるいは、結晶性または結晶様リポペプチドおよび溶液は大量包装を詰めるのに用いることができる。30

【0096】

図 10 および 11 は結晶化を用いた典型的なダプトマイシン製造手順を描くフローチャートを提供する。製造手順に無菌の結晶化を組み込むことによって手順が相当に短縮され、工程のうち 3 ~ 4 工程が無くなる。

【0097】

結晶性または結晶様リポペプチド医薬組成物およびその使用法

本発明のもう一つの目的は、結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩、および結晶性または結晶様リポペプチドもしくはその塩を含む医薬品处方を提供することである。40

一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドはダプトマイシンである。しかし、ここでは結晶性または結晶様リポペプチドへの言及はすべて上記で開示された通り、特に、ダプトマイシン、A54145 およびダプトマイシン関連リポペプチドを含む、ダプトマイシン、ダプトマイシン関連分子を特に考える。

【0098】

ダプトマイシン結晶または結晶様粒子、また他のリポペプチド結晶または結晶様粒子は、たとえば、特に、針状形、板状形、薄片状形、等方状形、いが状形、または棒状形といった形を有しうる。一実施形態において、ダプトマイシン結晶または結晶様粒子はいが状、針状または棒状の形を有する。結晶または結晶様粒子の大きさは約 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ から $100\text{ }\mu\text{m}$ より大まで変動しうる。一実施形態において、粒子の大きさは少なくとも $5\text{ }\mu\text{m}$ 以上50

である。より好適な一実施形態において、粒子の大きさは少なくとも 10 μm 以上であり、より好ましくは少なくとも 50 μm である。さらにより好適な一実施形態において、粒子の大きさは少なくとも 100 μm である。

【 0 0 9 9 】

さらに、一実施形態において、ダプトマイシン結晶は図 6、7 および 8 に示す X 線回折パターンを有する。別の一実施形態において、リポペプチド結晶は非晶形リポペプチドと比べて異なる融点を示す。

【 0 1 0 0 】

本発明の一実施形態において、結晶形態のリポペプチドは、非晶形リポペプチドと等しいかまたはより大きい安定性を示す。好適な一実施形態において、結晶性リポペプチドはダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドである。別の好適な一実施形態において、結晶性リポペプチドは無菌である。別の好適な一実施形態において、結晶性リポペプチドの安定性は非晶形リポペプチドよりも大きい。結晶性リポペプチドは、熱、光、分解または湿度に対して非晶形リポペプチドより高い安定性を示しうる。リポペプチドの安定性は、たとえば抗生物質活性、リポペプチドの分解、またはダプトマイシンの無水ダプトマイシンもしくはダプトマイシンの - 異性体への変換を含む任意の方法によって測定されうる。本発明の別の一実施形態において、結晶形態のリポペプチドは、非晶形リポペプチドよりも迅速に水溶液中で再構成されうる。

10

【 0 1 0 1 】

たとえばダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドといった結晶性または結晶様リポペプチド、およびその医薬品として許容される塩、エステル、アミド、保護された形態は、疾患の、とりわけ細菌感染の治療的、実験的または予防的処置のために、経口、静脈内、筋肉内、皮下、エアロゾル、局所または非経口投与用に製剤処方されうる。ここで「結晶性または結晶様リポペプチド」または「結晶性または結晶様ダプトマイシン」への言及は、医薬品として許容されるその塩を含む。たとえばダプトマイシンといった結晶性または結晶様リポペプチドは、微小球の微粉末粒子として容易に製剤処方が可能で、そのため経口投与用に腸溶性コーティングされたりリポペプチドを、またたとえば肺へのエアロゾル投与用に医薬品組成物を、また徐放性のリポペプチド処方の調製物を、容易に調製できるため、医薬組成物のために特に有利でありうる。結晶性または結晶様リポペプチド、および結晶性または結晶様ダプトマイシンは、またより容易に水溶液に溶解しうる。

20

【 0 1 0 2 】

ダプトマイシンもしくはダプトマイシン関連リポペプチドを含む結晶性または結晶様リポペプチドは、ダプトマイシンもしくは目的のリポペプチドと適合する任意の、医薬品として許容される担体または賦形剤を用いて製剤処方されうる。ヒトの治療のためのさまざまな抗細菌剤の投与法の概要については、たとえば、内容がこの参照により開示に含まれる Handbook of Pharmaceutical Additives: An International Guide to More than 6000 Products by Trade Name, Chemical, Function, and Manufacturer, Ashgate Publishing Co., M. Ash および I. Ash 編、1996 ; The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, S. Budavari 編、年刊 ; Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA ; Martindale: The Complete Drug Reference, K. Parfitt 編、1999 ; および Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New York, NY, L. S. Goodman ら編 ; を参照のこと。本発明の化合物は従来の医薬品担体および賦形剤と混合することができ、また錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ、ウエハーやクリームなどの形態で用いることができる。本発明の化合物はまた、ここで述べるような他の治療的薬剤および抗生物質と混合することができる。本発明の化合物を含む組成物は、重量にして約 0.1 ~ 90 % の当該活性化合物を含み、より一般的には約 10 ~ 30 % を含む。

30

【 0 1 0 3 】

本発明の組成物は、制御放出（たとえばカプセル）または徐放性送達系（たとえば生分解

40

50

性マトリクス)を用いて投与することができる。本発明の組成物に適した薬物送達のための典型的な遅延放出性送達系が米国特許第4,452,775号明細書(Kent宛)、第5,239,660号明細書(Leonard宛)、第3,854,480号明細書(Zaffaroni宛)に記載されている。

【0104】

本組成物はトウモロコシデンプンまたはゼラチン、乳糖、白糖、微結晶セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸二カルシウム、塩化ナトリウムおよびアルギン酸といった担体および賦形剤を含みうる。本組成物はクロスカルメロースナトリウム、微結晶セルロース、トウモロコシデンプン、デンブングリコール酸ナトリウム、およびアルギン酸を含みうる。

10

【0105】

含むことのできる錠剤結合剤は、アカシア、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン(ポビドン)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、デンプン、およびエチルセルロースである。

【0106】

使用しうる滑沢剤は、ステアリン酸マグネシウムまたは他のステアリン酸金属塩、ステアリン酸、液体シリコーン、タルク、ロウ、油、およびコロイド状シリカを含む。

【0107】

たとえばハッカ、ウィンターグリーン油、チェリーフレーバーなどといった香料もまた使用することができる。剤形を外観上より美しくまたは製品を識別しやすくするため、着色料を添加するのもまた望ましい可能性がある。

20

【0108】

経口使用には、錠剤およびカプセル剤といった固形の処方が特に有用である。徐放性のまたは腸溶性コーティングされた製剤もまた考案することができる。別の実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドはリポペプチドの経口アベイラビリティを高める担体組成物と組み合わせて投与することができる。一つの好適な実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドはダプトマイシンである。小児および老人への使用には、懸濁剤、シロップおよびチュアブル錠が特に適切である。経口投与には、医薬組成物はたとえば錠剤、カプセル剤、懸濁剤または液体の形態である。医薬組成物は好ましくは、治療上効果的な量の有効成分を含む用量単位の形である。そのような用量単位の例は錠剤およびカプセル剤である。治療目的には、錠剤およびカプセル剤は有効成分に加えて、たとえばアカシアガム、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ソルビトール、またはトラガカントといった従来の担体；たとえばリン酸カルシウム、グリシン、乳糖、トウモロコシデンプン、ソルビトール、または白糖といった增量剤；たとえばステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、シリカ、またはタルクといった滑沢剤；たとえばジャガイモデンプンといった崩壊剤、香料または着色料、または許容される湿潤剤を含むことができる。経口液体製剤は一般に水性または油性の溶液、懸濁剤、乳剤、シロップまたはエリキシルであり、たとえば懸濁剤、乳化剤、非水系剤、保存料、着色料、および香料といった従来の添加物を含みうる。経口液体製剤はリポペプチドミセルまたはリポペプチドのモノマー形を含みうる。液体製剤用の添加物の例はアカシア、アーモンド油、エチルアルコール、分画ココナツ油、ゼラチン、グルコースシロップ、グリセリン、水素添加食用油、レシチン、メチルセルロース、メチルまたはプロピル・パラ・ヒドロキシ安息香酸エステル、プロピレングリコール、ソルビトール、またはソルビン酸を含む。

30

【0109】

静脈内(IV)投与には、本発明の化合物の水溶性の形態を通常用いられる任意の静脈注射液に溶解し注入によって投与することができる。静脈注射処方は、カルシウム、ヒト血清アルブミン、クエン酸塩、酢酸塩、塩化カルシウム、炭酸塩、およびその他の塩を含み制限されない担体、賦形剤または安定剤を含みうる。静脈注射液は生理的食塩水またはリンゲル液を、制限なく含む。ダプトマイシンまたは他のリポペプチドはまた、注射器、カニューレ、カテーテル、および管路に入れることができる。

40

50

【0110】

非経口投与のための処方は、水系または非水系の等張無菌注射溶液または懸濁液の形態でありうる。これらの溶液または懸濁液は、経口投与用の処方における使用で言及した担体の一以上を含む無菌の粉末または顆粒から調製することができる。結晶状または結晶様リポペプチドはポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノール、トウモロコシ油、ベンジルアルコール、塩化ナトリウム、および／またはさまざまな緩衝液に溶解することができる。筋肉内、非経口または静脈内製剤には、結晶状または結晶様リポペプチド化合物または当該化合物のたとえば塩酸塩といった適当な可溶性塩の形態の無菌処方を、たとえば注射用水（WFI）、生理的食塩水または5%ブドウ糖といった医薬品の希釈剤に溶解して投与することができる。結晶状または結晶様リポペプチド化合物の適当な不溶性の形態もまた、水系基剤かまたは、たとえばオレイン酸エチルのような長鎖脂肪酸エステルといった医薬品として許容される油系基剤中の懸濁液として調製および投与することができる。

10

【0111】

たとえばポリラクチド-ポリグリコリドのような生分解性ポリマー中に結晶状または結晶様リポペプチドのマイクロカプセルマトリクスを形成することによって、蓄積注射剤形態を作成することができる。ポリマーに対する薬剤の比率、および使用する特定のポリマーの性質に従って薬剤放出速度を制御しうる。他の生分解性ポリマーの例は、ポリ（オルトエステル）およびポリ（アンヒドリド）を含む。注射用蓄積処方はまた、体組織と適合しうるマイクロエマルジョン中に薬剤を捕捉することによっても調製しうる。

20

【0112】

局所使用については、本発明の化合物はまた肌あるいは鼻および喉の粘膜に使用するのに適当な形態に作成することができ、クリーム、軟膏、液体スプレー、または吸入剤、トローチ、喉塗布剤の形態を取ることができる。こうした局所処方はさらに、活性成分の表面浸透を助けるジメチルスルホキシド（DMSO）といった化学化合物を含むことができる。局所用製剤には、たとえば結晶性または結晶様ダブトマイシン、適当なその塩の形態といった結晶性または結晶様リポペプチドを含む無菌処方を、クリーム、軟膏、スプレー、または他の局所用剤として投与しうる。局所用製剤はまた、リポペプチド組成物を含浸した絆創膏の形態にもなりうる。

30

【0113】

眼または耳への使用には、本発明の化合物は軟膏、クリーム、ローション、塗布剤または粉末として疎水性または親水性基剤中に処方した液体または半液体の剤形で投与することができる。

【0114】

直腸投与には、本発明の化合物はたとえばココアバター、ワックスまたは他のグリセリドといった従来の担体と混和した座剤の形態で投与することができる。

【0115】

エアロゾル製剤には、結晶性または結晶様リポペプチドまたは当該化合物の塩の形態の無菌処方を、たとえばと計量式吸入器といった吸入器、およびネブライザーで用いることができる。エアロゾル化された剤形は、肺炎および副鼻腔感染といった呼吸器感染の治療に特に有用である。

40

【0116】

あるいは、本発明の化合物は、適当な医薬品として許容される担体中での投与時の再構成のために、粉末の結晶性または結晶様の形態で用いることができる。別の実施形態において、化合物の単位用量剤形は、無菌の密栓されたアンプル中で適当な希釈剤中にある化合物またはその塩の溶液となりうる。化合物の単位用量中の濃度は、使用する化合物によって、またその溶解度、および医師が目的とする用量によって、たとえば約1%から約50%まで変動しうる。組成物が用量単位を含むとき、各用量単位は好ましくは約10~5000mgの活性物質を含み、より好ましくは50~1000mg、そしてさらにより好ましくは100~500mgを含む。成人の治療には、投与経路および頻度に従って、使

50

用する用量は好ましくは一日当たり 100 mg ~ 3 g の範囲で変動する。

【 0 1 1 7 】

さらに、本発明は対象の中でグラム陽性細菌によって起こった感染を治療する方法を提供する。一つの好適な実施形態において、本方法はグラム陽性細菌によって引き起こされた感染を治療するのに使用することができる。「治療する」の語は、感染症の発症を防ぎ、またはたとえば既存の感染というような感染を抑えあるいは消滅させる、その両方のために、対象に治療上効果的な量の本発明の化合物を投与することと定義される。ここでいう「対象」の語は、哺乳類、植物、または培養細胞と定義される。ここで用いる「治療上効果的な量」の句は、本発明によると症状の始まりを妨げ症状を軽くし、または細菌感染の進行を止める、ダブトマイシン、ダブトマイシン関連リポペプチドまたは他の抗菌性リポペプチドのある量を意味する。一つの好適な実施形態において、対象はリポペプチド治療を必要とするヒトまたはその他の患畜である。既存の感染は急性または慢性でありうる。効果的な用量は一般に約 0.1 と約 75 mg / kg の間の、たとえば結晶性または結晶様ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチド、または医薬品として許容されるその塩といった結晶性または結晶様リポペプチドである。好適な用量は約 1 から約 25 mg / kg の結晶性または結晶様ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドまたは医薬品として許容されるその塩である。より好適な用量は、約 1 から約 12 mg / kg の結晶性または結晶様ダブトマイシン、結晶性または結晶様ダブトマイシン関連リポペプチドまたは医薬品として許容されるその塩である。さらにより好適な用量は、約 3 から 8 mg / kg の結晶性または結晶様ダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドまたは医薬品として許容されるその塩である。抗菌薬を投与する典型的な手順は、全体がこの参照により開示に含まれる米国特許第 5,041,567 号明細書 (Rogers 宛) および国際公開第 WO 95/05384 号パンフレットに記載されている。10

【 0 1 1 8 】

たとえばダブトマイシンといった結晶性または結晶様リポペプチドは、一日一回投与または一日当たり複数回投与によって投与することができる。治療計画は、たとえば数日間または 2 ~ 4 週間といった長期に渡る投与を要しうる。投与用量当たりの量または総投与量は、感染の性質と重傷度、患者の年齢と全般的健康状態、リポペプチドおよび微生物に対する患者の耐性、または感染に関わる微生物、といった要素に依存する。投与方法は、この参照により開示に含まれる国際公開第 WO 00/18419 号 (2000 年 4 月 6 日公開) に開示されている。20

【 0 1 1 9 】

本発明の方法は、グラム陽性細菌感染を低減または消失させるのに有効な量で本発明の化合物、またはその医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む。リポペプチドは経口、非経口で、吸入、局所、直腸、鼻、頸、膣、または埋め込みリザーバ、外部ポンプまたはカテーテルによって投与することができる。リポペプチドは眼科用またはエアロゾル化した使用のために調製することができる。本発明の化合物、またはその医薬組成物はまた、腫瘍、心室、または関節に直接注射、または非経口投与することができる。非経口投与は、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液中、脳槽内、クモ膜下、肝内、病変内および頭蓋内注射または輸液を含む。好適な実施形態において、結晶性または結晶様ダブトマイシン、ダブトマイシン関連リポペプチドまたは他のリポペプチドは静脈内、皮下または経口で投与される。30

【 0 1 2 0 】

本発明の方法は、感染が任意の種類のグラム陽性細菌によって引き起こされまたは悪化する細菌感染を有する患者の治療に用いることができる。一つの好適な実施形態において、結晶性または結晶様ダブトマイシン、ダブトマイシン関連リポペプチドまたは他のリポペプチド、またはその医薬組成物、は本発明の方法に従って患者に投与される。別の実施形態において、細菌感染はメチシリン感受性およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (黄色ブドウ球菌、*Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus haemolyticus*、*Staphylococcus hominis*、*Staphylococcus saprophyticus*、およびコアグラーゼ陰性ブドウ球菌を含40

む)、グリコペプタイド低感受性黄色ブドウ球菌(GISA)、ペニシリン感受性およびペニシリン耐性連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus avium*、*Streptococcus bovis*、*Streptococcus lactis*を含む)、*Streptococcus sangius*およびC群連鎖球菌、G群連鎖球菌および緑色レンサ球菌群)、腸球菌(たとえば*Enterococcus faecalis*と*Enterococcus faecium*といったバンコマイシン感受性およびバンコマイシン耐性菌株を含む)、*Clostridium difficile*、*Clostridium clostridiiforme*、*Clostridium innocuum*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium ramosum*、*Haemophilus influenzae*、*Listeria monocytogenes*、*Corynebacterium jeikeium*、*Bifidobacterium spp.*、*Eubacterium aerofaciens*、*Eubacterium lentum*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactococcus spp.*、*Leuconostoc spp.*、*Pediococcus*、*Peptostreptococcus anaerobius*、*Peptostreptococcus asaccharolyticus*、*Peptostreptococcus magnus*、*Peptostreptococcus micros*、*Peptostreptococcus prevotii*、*Peptostreptococcus productus*、*Propionibacterium acnes*、および*Actinomyces spp.*を含むがそれらに限らない細菌によって引き起こされるかまたは悪化する。

【0121】

古典的「耐性」菌株に対するダブトマイシンの抗菌活性は、*in vitro*実験において古典的「感受性」菌株に対する抗菌活性と比較しうる。加えて、感受性菌株に対するダブトマイシンの最小発育阻止濃度(MIC)値は典型的にはバンコマイシンの値より4倍低い。したがって、好適な実施形態において、本発明の化合物、またはこれらの結晶性または結晶様リポペプチドのうち任意の一つの医薬組成物が、本発明の方法に従って、バンコマイシンを含む他の抗生物質に耐性の細菌感染を示す患者に投与される。さらに、グリコペプタイド抗生物質とは違って、グラム陽性細菌に対してダブトマイシンは迅速かつ濃度依存性の殺菌活性を示す。従って、一つの好適な実施形態において、本発明の化合物、またはこれらの結晶性または結晶様リポペプチドのうち任意の一つの医薬組成物が、本発明の方法に従って、速効性抗生物質治療を必要としている患者に投与される。

【0122】

本発明の方法は体の任意の器官または組織のグラム陽性細菌感染に使用することができる。これらの器官または組織は、制限なく、骨格筋、皮膚、血流、腎臓、心臓、肺そして骨を含む。本発明の方法は、制限なく、皮膚および軟組織感染、菌血症および尿路感染症の治療に用いることができる。本発明の方法は、制限なく、中耳炎、副鼻腔炎、および薬物耐性肺炎球菌または*Haemophilus influenzae*によって引き起こされた慢性気管支性肺炎を含む呼吸器感染症に罹患した地域社会の治療に用いることができる。本発明の方法はまた、好気性、糞食性または嫌気性細菌を含む異なる種類のグラム陽性細菌を含む混合感染を治療するのに用いることもできる。これらの感染の型は、腹腔内感染、肺炎、骨および関節感染および産科／婦人科感染を含む。本発明の方法はまた、制限なく、心内膜炎、腎炎、敗血性関節炎および骨髄炎を含む感染を治療するのに用いることもできる。一つの好適な実施形態において、上記の疾患のいずれもが結晶性または結晶様ダブトマイシン、ダブトマイシン関連リポペプチド、抗菌性リポペプチド、またはこれらの結晶性または結晶様リポペプチドの任意の一つの医薬組成物を用いて治療することができる。

【0123】

結晶性または結晶様ダブトマイシン、ダブトマイシン関連リポペプチドまたは他のリポペプチドはまた、患者または動物の食事または餌に入れて投与することができる。総食餌摂取の一部として投与される場合、ダブトマイシンもしくは他のリポペプチドの量は重量にして食餌の1%未満に、好ましくは重量で0.5%だけにすることができる。動物の食餌は通常の食物にすることができる、ダブトマイシンもしくは他のリポペプチドを加えることができるかまたは、ダブトマイシンもしくは他のリポペプチドを配合飼料に加えてもよい。

【0124】

本発明の方法はまた、同時にたとえば結晶性または結晶様でない他の形態のダブトマイシ

10

20

30

40

50

ンもしくは他のリポペプチド抗生物質を、または結晶性または結晶様ダブトマイシンもしくは他の結晶性または結晶様リポペプチド抗生物質以外の一以上の抗真菌薬および／または一以上の抗生物質を投与しながら実施することもできる。結晶性または結晶様ダブトマイシンもしくは他のリポペプチド抗生物質以外の抗真菌薬および抗生物質の同時投与は、たとえば異なる種類のグラム陽性細菌によって引き起こされる混合感染、または細菌と真菌の両方によって引き起こされる混合感染に有用である可能性がある。さらに、結晶性または結晶様ダブトマイシンもしくは他のリポペプチド抗生物質が、一以上の同時投与される抗生物質の毒性プロファイルを改善しうる。ダブトマイシンおよびアミノグリコシドの投与が、そのアミノグリコシドによって生じる腎毒性を改善しうることが示されている。一つの好適な実施形態において、抗生物質および／または抗真菌薬を本発明の化合物と、または本発明の化合物を含む医薬品組成物中に、同時に投与しうる。

【0125】

本発明の化合物と同時に投与してよい抗菌薬およびその分類は、制限なく、ペニシリソ類および関連する薬剤、カルバペネム類、セファロスルオリン類および関連する薬剤、アミノグリコシド類、バシトラシン、グラミシジン、ムピロシン、クロラムフェニコール、チアンフェニコール、フシジン酸ナトリウム、リンコマイシン、クリンダマイシン、マクロライド類、ノボビオシン、ポリミキシン類、リファマイシン類、スペクチノマイシン、テトラサイクリン類、バンコマイシン、ティコプラニン、ストレプトグラミン類、スルフォンアミド類、トリメトプリムおよびその組み合わせを含む抗葉酸剤、ピリメタミン、ニトロフランを含む合成抗細菌剤、マンデル酸メタナミンおよび馬尿酸メタナミン、ニトロイミダゾール類、キノロン類、フルオロキノロン類、イソニアジド、エタンブトール、ピラジナミド、パラ-アミノサリチル酸(PAS)、シクロセリン、カブレオマイシン、エチオナミド、プロチオナミド、チアセタゾン、ビオマイシン、エバニノマイシン、グリコペプタイド、グリシルサイクリン、ケトリド類、オキサゾリジノン；イミペネン、アミカシン、ネチルミシン、フォスフォマイシン、ゲンタマイシン、セフトリアキソン、ジラシン、LY333328、CL331002、HMR3647、リネゾリド、シナシッド、アズトレオナム、およびメトロニダゾール、エピロプリム、OCA_983、GV_143253、サンフェトリネムナトリウム、CS_834、ビアペネム、A_99058.1、A_165600、A_179796、KA159、ディネマイシンA、DX8739、DU6681；セフルプレナム、ER35786、セフォセリス、サンフェトリネム セレキセティル、HGP_31、セフピローム、HMR_3647、RU_59863、メルサシジン、KP736、リファラジル；コサン、AM1732、MEN10700、レナペネム、B02502A、NE_1530、PR39、K130、OPC20000、OPC2045、ベネプリム、PD138312、PD140248、CP111905、スロペネム、リチペナム アコキシル、R0_65_5788、シクロチアリジン、Sch_40832、SEP_132613、ミカコシジンA、SB_275833、SR_15402、SUN_A0026、TOC39、カルモナム、セフォゾプラン、セフェタメト ピボキシル、およびT3811を含む。

【0126】

一つの好適な実施形態において、本発明に従って化合物と同時投与しうる抗菌薬は、制限なく、イミペネン、アミカシン、ネチルミシン、フォスフォマイシン、ゲンタマイシン、セフトリアキソン、ティコプラニン、ジラシン、LY333328、CL331002、HMR3647、リネゾリド、シナシッド、アズトレオナム、およびメトロニダゾールを含む。

【0127】

本発明に従って化合物と同時投与しうる抗真菌薬は、制限なく、カスボフンゲン、ボリコナゾール、セルタコナゾール、IB_367、FK_463、LY_303366、Sch_56592、シタフロキサシン、アンフォテリシン、ナイスタチン、ブリマリシンといったDB_289ポリエン類；フルコナゾール、イトラコナゾール、およびケトコナゾールといったアゾール類；ナフチファインおよびテルビナファインといったアリルアミン類；そしてフルサイトシンといった抗代謝剤を含む。他の抗真菌薬は、制限なく、この参照により開示

10

20

30

40

50

に含まれるFostelら、Drug Discovery Today 5 : 25 - 32 (2000) で開示されているものを含む。Fostelらはコリネカンジン、MerWF3010、フサカンジン類、アートリキチン / LL15G256 (ソルダリン類、シスペンタシン、アゾキシリバシリン、オーレオバシジンおよびカフレファンジンを含む抗真菌性化合物を開示している。

【0128】

本発明の化合物、またはこれらの結晶性または結晶様リポペプチドの任意の一以上の医薬組成物は、本方法に従って細菌感染が根絶または低減されるまで投与しうる。一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチド約3日間から約6ヶ月までの期間投与される。一つの好適な実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドは7から56日間投与される。より好適な一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドは7から28日間投与される。さらにより好適な一実施形態において、結晶性または結晶様リポペプチドは7から14日間投与される。結晶性または結晶様リポペプチドは、希望であればより長い期間またはより短い期間投与することができる。好適な一実施形態において、リポペプチドはダブトマイシンもしくはダブトマイシン関連リポペプチドである。

【0129】

本発明がより完全に理解されるように、以下の実施例を示す。これらの実施例は説明目的のためだけのものであり、いかなる方法によっても本発明の範囲を制限するものと解釈してはならない。

【実施例1】

【0130】

ダブトマイシンは従来の方法によって調製された。ダブトマイシン調製物は淡黄色の非晶性の粉末で、25¹⁰での溶解度は水に対して1g / mLより大であり、エタノールに対しての溶解度は2.8mg / mLであった。非晶性ダブトマイシン調製物は吸湿性であり、215²⁰で分解した。

【0131】

残りの実施例は、有機沈殿剤（たとえばPEG）の存在下または非存在下でのリポペプチドの結晶化または沈殿について記述する。

【実施例2】

【0132】

マイクロバッチ結晶化で、25³⁰μLのダブトマイシンストック（20mg / mLメタノール）を15³⁰μLの試薬ストック（200mM酢酸カルシウム、0.1Mカゴジル酸（pH 6.5）、18%[w/v]PEG8000および15³⁰μLのエチレングリコール）と連続的に混合し、水溶性成分が27.5%、45%メタノール、27.5%エチレングリコールである水溶液を得た。収率50%、HPLCで測定した純度が98%で、いが状結晶が形成された。

【実施例3】

【0133】

440mgのダブトマイシンを、25mM酢酸ナトリウム（pH 5.0）と5mM CaCl₂を含む緩衝液1MLで溶解して、ダブトマイシンストックを調製した。結晶化は蒸気拡散法（ハンギングドロップ）によって行った。in which 5⁴⁰μLのダブトマイシンストックを5⁴⁰μLの0.1Mクエン酸三ナトリウム二水和物（pH 5.6）、および35%[v/v]tert-ブタノール水溶液に加え、水滴を形成した。水滴は気密環境下で、結晶化が起こるまでリザーバ溶液の上につり下げられた。この方法ではいが状のダブトマイシン結晶が得られた。たとえば図2を参照のこと。

【実施例4】

【0134】

実施例3のように調製したダブトマイシンストックの5⁵⁰μLを、0.1Mカゴジル酸ナトリウム（pH 6.5）、0.2M酢酸カルシウムおよび9%[w/v]PEG 8000を含む溶液の5⁵⁰μLに加えた。結晶化は、実施例3に記載された通り、蒸気拡散法で行った。この方法では針状ダブトマイシン結晶が得られた。たとえば図3を参照のこと。

【実施例 5】**【0135】**

実施例 3 のように調製したダプトマイシンストックの $5 \mu\text{L}$ を、 $0.1 \mu\text{L}$ のベンズアミジンを終濃度が 220mg/mL となるように含む 0.1M カゴジル酸ナトリウム (pH 6.5)、 0.2M 酢酸亜鉛および $9\% [\text{w/v}] \text{PEG}8000$ の溶液 $5 \mu\text{L}$ に加えた。この方法では棒状ダプトマイシン結晶が得られた。たとえば図 4 を参照のこと。

【実施例 6】**【0136】**

水溶液中の濃度が $20 \sim 25 \text{mg/mL}$ であるダプトマイシン 1mL (HPLC 測定の結果、純度 97.1%) を続けて水 $231 \mu\text{L}$ 、酢酸カルシウム (pH 6.0) $77 \mu\text{L}$ 、プロピレングリコール $960 \mu\text{L}$ 、そして $50\% [\text{w/v}] \text{PEG}4000$ の $231 \mu\text{L}$ と混合した。溶液は $4 \sim 5$ 時間、 4°C で静置した。収率 75% でいが状結晶が得られた。結晶性ダプトマイシンはイソプロパノールで洗浄した。ダプトマイシンは HPLC による測定で純度 98.4% であった。

【実施例 7】**【0137】**

ダプトマイシン (200mg 、純度 97.1%) を水 2.54mL に溶解した。ダプトマイシン溶液を続いて 10.0mL のメタノール、 0.78mL の 1M 酢酸カルシウム (pH 6.0)、 9.50mL のプロピレングリコール、そして 2.20mL の $50\% [\text{w/v}] \text{PEG}4000$ と順序通り連続して混合し、最終量が 25.02mL になった。混合物は室温で $10 \sim 14$ 時間の間、血液ミキサー (Fischer) 中で攪拌した。数時間内に結晶が出現し始めた。最終収量は 14 時間後で約 $70 \sim 80\%$ であった。結晶は 1000rppm 、 15 分間の遠心分離によって集めた。上清を除去し、結晶は 12.5mL のイソプロパノールに再懸濁された。ダプトマイシン懸濁液をカラム (バイオラッド) に移し、重力によって落とさせてイソプロパノールを除去した。結晶は窒素竈によって乾燥した。乾燥処理の間に塊はすべて壊れ、均一な乾燥試料となった。この方法でできた結晶はいが状であって 98.37% の純度を有した。

【実施例 8】**【0138】**

ダプトマイシンは、PEG4000 の代わりに PEG8000 を用いて実施例 7 に従って結晶化した。使用した試薬の量は実施例 7 と同一である。

【0139】

この方法で調製した結晶はいが状であって、 98.84% の純度を有する。

【実施例 9】**【0140】**

2つのダプトマイシン試料は実施例 7 に従って調製し、1つの非晶性検体と結晶化度について USP<695> 結晶化度試験を用いて調べた。ダプトマイシン粒子はスライドガラス上の鉛油に乗せられており、次いで偏光顕微鏡 (PLM) で検査された。粒子は、複屈折性 (干渉色がない) で、試料台を回転させたとき消光点がある場合、結晶性と判定された。

【0141】

非晶性ダプトマイシン試料は、複屈折性のない、網目状でフレーク状である粒子から成った。弱い複屈折性を示した一部の粒子には細長片状の部分があったが、粒子は主に非晶性であった。対照的に、実施例 7 に従って調製したダプトマイシン試料は、弱い複屈折といくらかの消光のある多結晶性粒子から成り、これらが主に結晶性であることを示した。図 5 を参照のこと。

【実施例 10】**【0142】**

2つのダプトマイシン試料を実施例 7 に従って調製し、1つの非晶性試料を結晶化度について X 線粉末回折によって分析した。試料は ORS 標準作業手順書 EQ-27 Rev. 9. に従って操作されたジーメンス D500 自動粉末回折計 (ORS 1D No. LD-301-4) で分析

10

20

30

40

50

した。回折計はグラファイトモノクロメーターと50kV、40mAで運転されるCu($\lambda = 1.54\text{ \AA}$)X線源を装備していた。NBS(米国規格基準局)雲母標準試料を用いて(SRM 675)、2校正を実施する。試料は以下の機器パラメータを用いて分析した: 2の測定幅(度)4.0~40.0

段階幅(度) 0.05

段階毎の測定時間(秒) 1.2

光線スリット 1(1°)、2(1°)、3(1°)、4(0.15°)、5(0.15°)

試料調製は、ゼロバックグラウンド試料板を用いて、ORS標準作業手順書MIC-7 Rev. 1に従って実施した。

10

【0143】

Cu($\lambda = 1.54\text{ \AA}$)X線源を用いて全試料を分析した。非晶性ダプトマイシン 試料はX線粉末回折ではピークが見られなかった。図6を参照のこと。対照的に、2つのダプトマイシン試料は両方ともX線粉末回折によってピークが見られた。最初のダプトマイシン試料の回折角(2θ)(図7)は19.225、23.242、23.427および23.603(度)であった。第2のダプトマイシン試料の回折角(2θ)(図8)は10.966、19.205および23.344(度)であった。最初の結晶性ダプトマイシン試料はまた、10-11°の間に小さなピークを示している。図7を参照のこと。

【実施例11】

【0144】

ダプトマイシンを水に溶解した。最終濃度が187mMになるよう酢酸ナトリウムを加えた。最終濃度が28mMになるよう塩化カルシウムを加えた。ダプトマイシン溶液は混合し、最終濃度が78.4%になるようイソプロパノールを加えた。溶液は混ぜてインキュベートした。沈殿物がインキュベート後に形成された。沈殿した物質はいが状の結晶に見え、光学顕微鏡法で直径約60μmであった。物質は次いで乾燥された。乾燥した物質は約30~40%の塩を含んでいた。乾燥後、粉末X線回折を行った。粉末X線回折は、乾燥したダプトマイシン沈殿物中に結晶の存在を示さなかった。

20

【実施例12】

【0145】

ダプトマイシン1g(HPLCによる測定で純度約91.5%)を16.8mLの蒸留水に加え手溶解した。2.5mLの1M酢酸カルシウム(pH 6.1)と60mLのイソプロパノールを加えた。溶液を27の水浴中に置き、水浴と温度を平衡化させた。イソプロパノールを5mLずつ、溶液が濁るまでゆっくり加えた(合計約30mLのイソプロパノール)。溶液を27で一晩インキュベートし、沈殿を形成させた。

30

【0146】

沈殿物は光学顕微鏡法で約60μmのいが状結晶を含むように見えた。図2を参照のこと。

【0147】

ダプトマイシン沈殿物を加圧濾過/乾燥漏斗に入れ、重力によって濾過した。沈殿物は各回25mLの洗浄溶液(80%イソプロパノールと20%の溶液A、ここで溶液Aは水18mLと氷酢酸2mLから成る)を用いて2回洗浄し、一晩重力で液を切った。沈殿物を次いでデシケータに移し、真空下で乾燥させた。乾燥後、粉末X線回折を行った。粉末X線回折は、乾燥したダプトマイシン沈殿物中に結晶の存在を示さなかった。しかし、HPLCによる沈殿物の純度分析は、沈殿物が純度98.2%のダプトマイシンであることを示した。

40

【0148】

注目すべきことは、沈殿後のダプトマイシン調製物は、沈殿前のダプトマイシン調製物と比べて無水ダプトマイシンが有意に少ない。

【0149】

どのような理論に縛られることも求めず、出願人は、ダプトマイシンを沈殿させるために

50

実施例 1 1 および 1 2 において用いた条件は、実際に結晶性ダプトマイシンを生産するが、続く洗浄工程および／または乾燥工程によって結晶性ダプトマイシンが非晶形ダプトマイシンに戻ると信じる。にもかかわらず、偏光の中での結晶試料の複屈折によって図 3 に示すように、非晶性ダプトマイシンはなお結晶様である。

【実施例 1 3】

【0 1 5 0】

抗生素質の生産を最適化する一方で夾雜物の生産を最小化する濃度でのデカン酸制限発酵で、*S. roseosporus* NRRL 菌株 15998 の発酵培養を実施した。残余の供給デカン酸はガスクロマトグラフィーによって測定し、目標の残留濃度は誘導開始（約 30 時間目）から収穫までデカン酸 10 ppm である。培養物の遠心分離および続いて清澄化した培養液の分析は、ダプトマイシンの生産を HPLC によって測定するために用いられた。収穫物の力価は典型的には発酵培養液 1 リットル当たり 1.0 ~ 3.0 グラムである。

【0 1 5 1】

発酵培養物は Pall - Sep (商標) を用いた精密濾過または同等の精密濾過システムによって、または完全な商業スケールの遠心分離およびデプス・フィルタによってのいずれかで収穫される。清澄化された培養液は Mitsubishi (商標) FP - DA13 陰イオン交換樹脂にかけられ、pH 6.5 の 30 mM NaCl で洗浄され、pH 6.0 - 6.5 の 300 mM NaCl で溶出される。pH を 3.0 - 4.8 に調整し、温度を 2 - 15 ℃ に調整する。これらの条件下で、ダプトマイシンはミセルを形成する。ミセル状ダプトマイシン溶液を任意の規格の 10,000 NMW 限外濾過膜 (AG Technology Corp. UF ホローファイバーまたは同等品) を用いて濾過洗浄する。ダプトマイシンミセルは濾過膜に保持されるが、多数の不純物は 10,000 NMW の濾過膜を通過するため除去される。ダプトマイシンミセルの限外濾過によってダプトマイシンの純度は約 80 ~ 90 % に上昇する。

【0 1 5 2】

ダプトマイシン調製物は次いで無菌条件下で上記の方法の一を用いて結晶化または沈殿される。一つの好適な実施例において、ダプトマイシンの大量調製のためにスケールアップできることを除き、実施例 7、8 または 12 に記載の手順に従ってダプトマイシンは結晶化または沈殿される。結晶性または結晶様ダプトマイシンは結晶化または沈殿溶液から濾過によって、好ましくは真空濾過によって分離される。結晶性または結晶様ダプトマイシンは洗浄溶液で洗浄される（実施例 3 を参照のこと）。結晶性または結晶様ダプトマイシンは次いで、0.65 m³ Klein ハステロイ - B ダブルコーン型真空乾燥機または同等機を用いて無菌条件下で真空乾燥される。その後バイアルに 1 本当たり 250 または 500 mg の乾燥した結晶性ダプトマイシンを充填する。図 9 はこの製造方法のフローチャートを示す。

【実施例 1 4】

【0 1 5 3】

S. roseosporus の発酵、発酵培養物の精密濾過および陰イオン交換クロマトグラフィーを実施例 1 3 に記載の通りに行う。この時点でダプトマイシン調製物は純度約 35 ~ 40 % である。陰イオン交換クロマトグラフィー後、ダプトマイシンは実施例 1 3 に記載の手順に従って結晶化または沈殿される。ダプトマイシンは次いで実施例 1 3 で述べた手順に従って洗浄および乾燥される。乾燥した結晶性または結晶様ダプトマイシンはその後、実施例 1 3 に記載の通り、滅菌バイアルに充填するのに用いる。図 6 はこの製造方法のフローチャートを示す。

【実施例 1 5】

【0 1 5 4】

S. roseosporus の発酵および発酵培養物の精密濾過を実施例 1 3 に記載の通りに行う。精密濾過後、発酵培養物を実施例 1 3 に記載の通りサイズ排除限外濾過に供する。この時点でダプトマイシン調製物は純度約 35 ~ 40 % である。限外濾過後、ダプトマイシンは実施例 1 3 に記載の手順に従って結晶化または沈殿される。ダプトマイシンは次いで実施例 1 3 で述べた手順に従って洗浄および乾燥される。乾燥した結晶性または結晶様ダプトマ

10

20

30

40

50

イシンはその後、実施例 13 に記載の通り、滅菌バイアルに充填するのに用いる。図 7 はこの製造方法のフローチャートを示す。

【実施例 16】

【0155】

S. roseosporus の発酵および発酵培養物の精密濾過を実施例 13 に記載の通りに行う。この時点でダプトマイシン調製物は純度 5 ~ 10 % である。精密濾過後、発酵培養物は実施例 13 に記載の手順に従って結晶化または沈殿される。ダプトマイシンは次いで実施例 13 で述べた手順に従って洗浄および乾燥され滅菌バイアルに充填するのに用いられる。図 8 はこの製造方法のフローチャートを示す。

【実施例 17】

【0156】

ダプトマイシンの環状リポペプチドアナログである CB - 131547 (図 x を参照) を、ダプトマイシンからの半合成経路によって調製した。CB - 131547 は淡黄色の非晶性の粉末で、正常食塩溶液に対する 25 °C での溶解度は ~ 80 mg / mL である。

【0157】

CB - 131547 (60 mg 、純度 ~ 90 %) を水 2.5 mL に溶解する。CB - 131547 溶液は続いて、5.0 mL のメタノール、0.2 mL の 1 M 酢酸カルシウム (pH 6.0) 、2.5 mL のプロピレングリコール、そして 1.0 mL の 50 % (w/v) PEG 4000 とこの順で混合し、最終容量 11.2 mL となる。溶液を 4 ~ 24 時間、4 °C で静置する。CB - 131547 結晶が形成され、収率 ~ 70 % 、HPLC による測定で純度 ~ 98.0 % である。

【実施例 18】

【0158】

ダプトマイシンの環状リポペプチドアナログである CB - 131547 (図 x を参照) を、ダプトマイシンからの半合成経路によって調製した。CB - 131547 は淡黄色の非晶性の粉末で、正常食塩溶液に対する 25 °C での溶解度は ~ 80 mg / mL である。

【0159】

CB - 131547 (60 mg 、純度 ~ 90 %) を水 2.5 mL に溶解する。0.2 mL の 1 M 酢酸カルシウム (pH 6.0) および 8 mL のイソプロパノールを加える。溶液を室温 (25 °C) で 5 分間平衡化させる。イソプロパノールを 1 mL ずつ、溶液が濁るまでゆっくり加える。溶液を室温で一晩保存し、結晶を形成させる。

【0160】

本明細書中に引用されたすべての広報および特許明細書は個々の独立した広報または特許明細書が具体的かつ個別に、参照により開示に含まれることが示されるように、この参照により開示に含まれる。前記の発明は理解を明瞭にするための図および実施例を用いてある程度詳しく記載されているが、当該技術分野で通常の技能を有する者には、本発明の教示に照らして、ある種の変更および改変は付属する請求項の精神または範囲を離れることなく行いうるが容易に明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0161】

【図 1】 図 1 はダプトマイシンの構造を示す図である。

【図 2】 図 2 は実施例 12 に記載する方法によって製造されたダプトマイシンのいが状結晶または結晶様粒子の顕微鏡写真を示す。

【図 3】 図 3 はダプトマイシンの針状結晶の顕微鏡写真を示す。

【図 4】 図 4 はダプトマイシンの棒状結晶の顕微鏡写真を示す。

【図 5】 図 5 はダプトマイシン試料の 100 × 倍率の顕微鏡写真を示す

【図 6】 図 6 は非晶性ダプトマイシンの X 線粉末回折パターンである。

【図 7】 図 7 は実施例 7 に記載された手順によって製造されたダプトマイシン結晶の X 線粉末回折パターンである。

【図 8】 図 8 は実施例 7 に記載された手順によって製造されたダプトマイシン結晶の別の

10

20

30

40

50

試料のX線粉末回折パターンである。

【図9】図9はダプトマイシンの結晶様粒子の、偏光に暴露されたときの複屈折を示す図である。結晶様粒子は実施例12に記載された方法によって製造された。

【図10】図10は結晶化の典型的な方法のフローチャートである。

【図11】図11は結晶化または沈殿を用いない典型的な製造方法のフローチャートである。

【図12】図12はリポペプチド化合物の典型的な製造方法のフローチャートである。

【図13】図13はリポペプチド化合物の典型的な製造方法のフローチャートである。

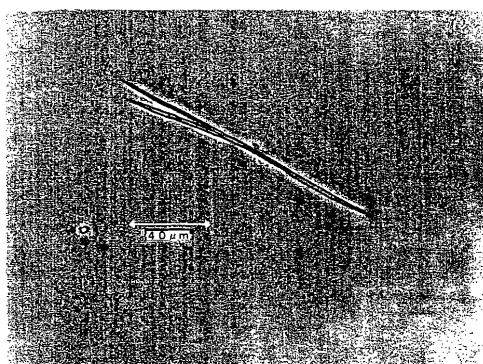
【図14】図14はリポペプチド化合物の典型的な製造方法のフローチャートである。

【図15】図15はリポペプチド化合物の典型的な製造方法のフローチャートである。

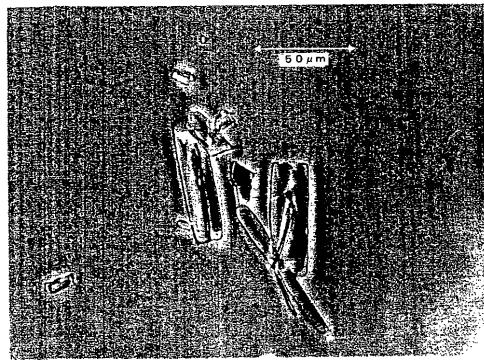
【図16】図16はダプトマイシンの環状リポペプチドアナログであるCB-131547の構造を描いた図である。

10

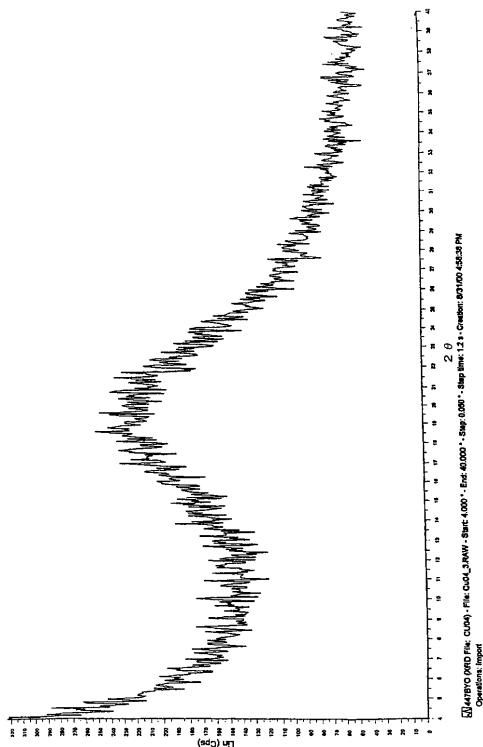
【図3】



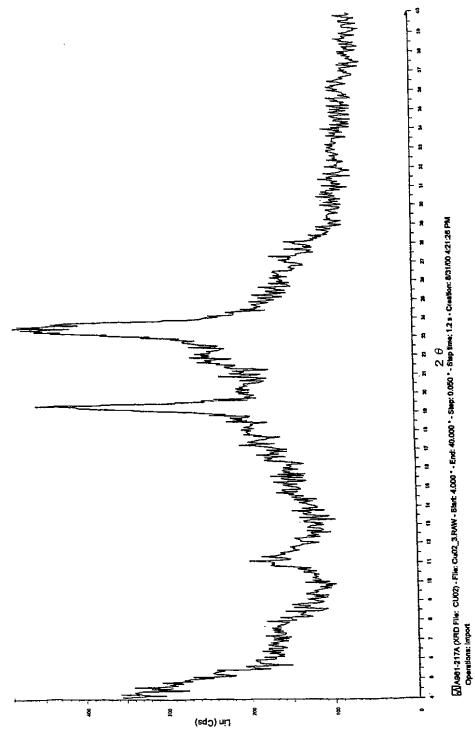
【図4】



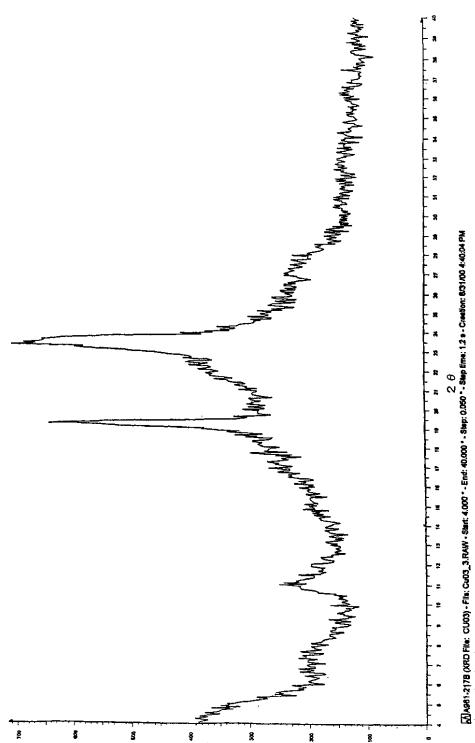
【図6】



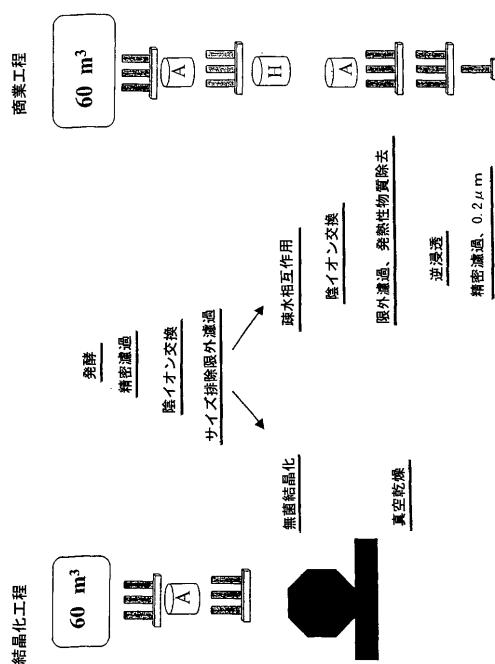
【図7】



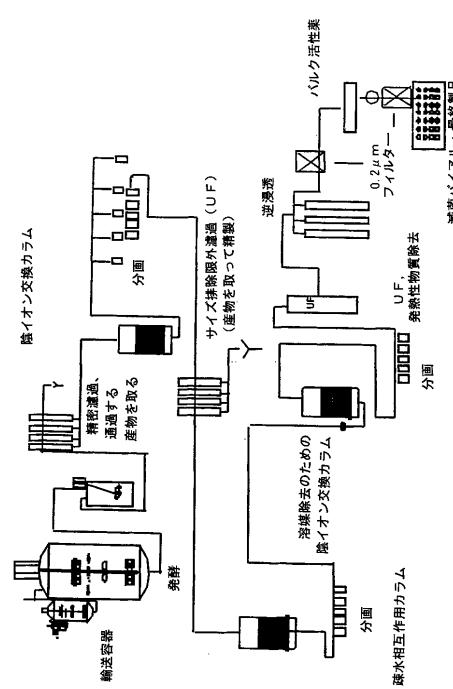
【図8】



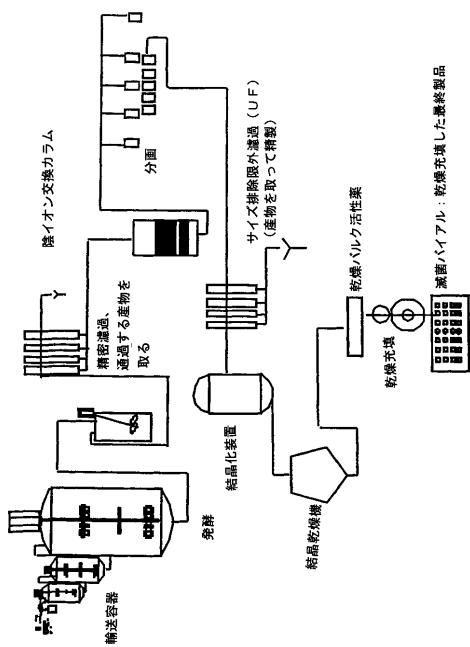
【図10】



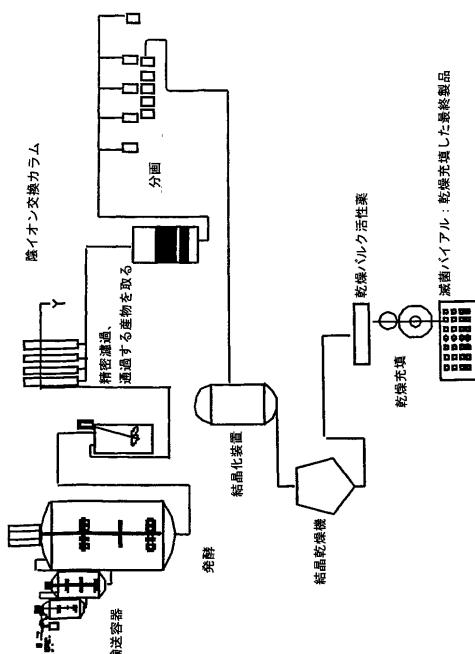
【図11】



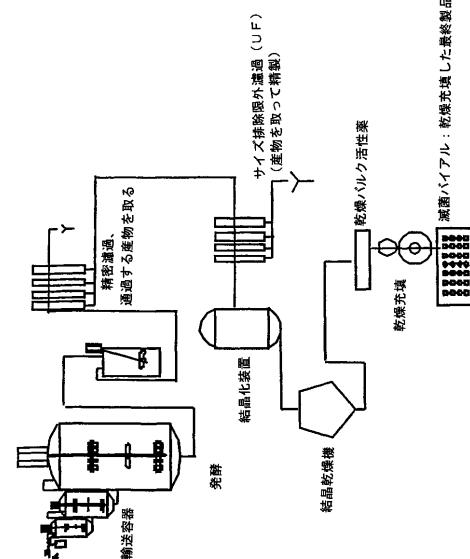
【図 1 2】



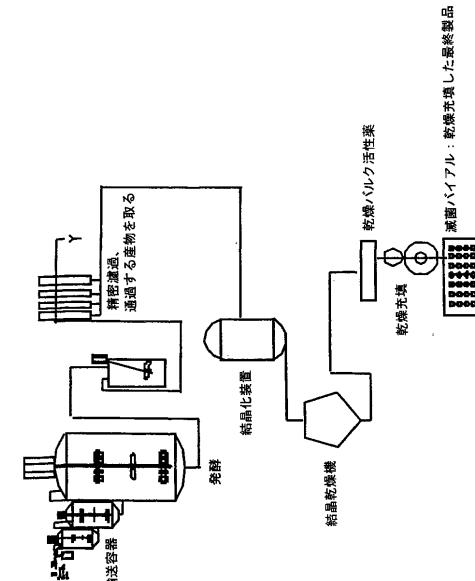
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059145 A1(51) International Patent Classification⁷: C07K 7/64, 14/36

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, IIR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) International Application Number: PCT/US01/48886

(22) International Filing Date:
17 December 2001 (17.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/255,268 18 December 2000 (18.12.2000) US
60/274,741 9 March 2001 (09.03.2001) US
Not furnished 13 December 2001 (13.12.2001) US
Not furnished 13 December 2001 (13.12.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BI, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, H, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): CUBIST PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 65 Hayden Avenue, Lexington, MA 02421 (US).

Published:
*with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KEITH, Dennis [US/US]; 8 Menlo Terrace, Monclair, NJ 07942 (US); LAI, Jan-Ji [US/US]; 5 Roy Street, Westborough, MA 01581 (US).*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

(74) Agents: MYERS, Louis et al.; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).

WO 02/059145 A1

(54) Title: METHODS FOR PREPARING PURIFIED LIPOPEPTIDES

(57) Abstract: The present invention relates to crystalline and crystal-like forms of lipopeptides, including daptomycin, a lipopeptide antibiotic with potent bactericidal activity against gram-positive bacteria, including strains that are resistant to conventional antibiotics. The present invention relates to methods of purifying lipopeptides, including daptomycin, a lipopeptide antibiotic with potent bactericidal activity against gram-positive bacteria, including strains that are resistant to conventional antibiotics. The present invention also relates to pharmaceutical compositions comprising the purified form of the lipopeptide and methods of using these compositions.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

METHODS FOR PREPARING PURIFIED LIPOPEPTIDES**CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

5 The present application claims the benefit of United States Provisional Application Number 60/256,268, filed December 18, 2000; Serial Number 60/274,741, filed March 9, 2001; Serial Number _____ filed December 13, 2001; and Serial Number _____ filed December 13, 2001, the contents of which are incorporated
10 herein by reference.

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to crystalline and crystalline-like forms of lipopeptides, including daptomycin, a lipopeptide antibiotic with potent bactericidal activity against gram-positive bacteria, including strains that are resistant to conventional antibiotics. The present invention also relates to processes for preparing crystalline or crystal-like forms of the lipopeptide and to methods of purifying lipopeptides including daptomycin. The present invention also relates to pharmaceutical compositions comprising the purified form of the lipopeptide and methods of using these compositions.
15

20 **BACKGROUND OF THE INVENTION**
The rapid increase in the incidence of gram-positive infections—including those caused by antibiotic-resistant bacteria—has sparked renewed interest in the development of novel classes of antibiotics. One such class is the lipopeptide antibiotics, which includes daptomycin. Daptomycin has potent bactericidal activity *in vitro* against clinically relevant gram-positive bacteria that cause serious and life-threatening diseases. These bacteria include, but are not limited to, resistant pathogens, such as vancomycin-resistant enterococci (VRE), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), glycopeptide intermediary susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA), coagulase-negative staphylococci (CNS), and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP), for which there are very few therapeutic alternatives. See, e.g., Tally et al., 1999, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 8:1223-1238. Daptomycin's inhibitory effect is a rapid, concentration-
25
30

WO 02/059145

PCT/US01/48886

dependent bactericidal effect *in vitro* and *in vivo*, and a relatively prolonged concentration-dependent post-antibiotic effect *in vivo*.

Daptomycin is described by Baltz in *Biotechnology of Antibiotics*, 2nd Ed., ed. W.R. Strohl (New York: Marcel Dekker, Inc.), 1997, pp. 415-435. Daptomycin, also known as LY 146032, is a cyclic lipopeptide antibiotic that can be derived from the fermentation of *Streptomyces roseosporus*. Daptomycin is a member of the factor A-21978C₀ type antibiotics of *S. roseosporus* and is comprised of a decanoyl side chain linked to the N-terminal tryptophan of a cyclic 13-amino acid peptide (Fig. 1). Daptomycin has an excellent profile of activity because it is highly effective against most gram-positive bacteria; it is highly bactericidal and fast-acting; it has a low resistance rate and is effective against antibiotic-resistant organisms. The compound is currently being developed in a variety of formulations to treat serious infections caused by bacteria, including, but not limited to, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE).

A number of United States Patents describe A-21978C₀ antibiotics and daptomycin-related lipopeptides including daptomycin (LY 146032). These patents also describe methods of producing and isolating the A-21978C₀ antibiotics and daptomycin-related lipopeptides.

United States Patents RE32,333, RE32,455, 4,800,157, 4,874,843, and 4,885,243 describe methods of synthesizing and isolating daptomycin from fermentation cultures of *Streptomyces roseosporus*. United States Patents RE32,310, RE32,311, 4,537,717, 4,482,487 and 4,524,135 describe A-21978C₀ antibiotics and methods of deacylating the A-21978C₀ antibiotic and reacylating the peptide nucleus and antibiotic derivatives made by this process. United States Patent 5,912,226 (hereafter the '226 patent) describes the identification and isolation of two impurities produced during the manufacture of daptomycin, anhydro-daptomycin and the β-isomer form of daptomycin. None of these United States patents discloses a method for precipitating or crystallizing a lipopeptide in a manner to increase purity of the lipopeptide.

United States Patent 4,439,425 (hereafter the '425 patent) discloses a crystalline lipopeptide and a method of crystallizing the lipopeptide. The lipopeptide disclosed in the '425 patent is structurally dissimilar from daptomycin and daptomycin-related lipopeptides. United States Patent 5,336,756 (hereafter the '756 patent) also discloses a crystalline cyclic lipopeptide comprising a hexapeptide. The crystalline cyclic

WO 02/059145

PCT/US01/48886

lipopeptide disclosed in the '756 patent is also structurally dissimilar from daptomycin and daptomycin-related lipopeptides. The '756 patent discloses that the lipopeptide, an echinocandin-type compound, can be obtained when aqueous n-propanol is employed as the crystallizing solvent. See, e.g., cols. 1-2 of the '756 patent. Neither the '425 patent nor the '756 patent disclose methods of crystallizing or precipitating daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide, nor do they disclose methods of crystallizing or precipitating lipopeptides produced by *Streptomyces*.

It would be advantageous to develop a method of crystallizing or precipitating daptomycin and daptomycin-related lipopeptides to provide an improved purification method for these lipopeptides. In addition, a crystalline or highly purified precipitated form of daptomycin or other daptomycin-related lipopeptide would be useful in formulating pharmaceutical compositions for treating bacterial infections. Further, a crystalline or highly purified precipitated form of daptomycin or daptomycin-related lipopeptide would be useful in a method to make a sterile product, particularly bulk sterile product. Thus, there is a need for methods to produce crystalline or precipitated daptomycin and daptomycin-related lipopeptides and the crystalline or precipitated forms of the lipopeptides produced thereby. However, there has been no simple and robust method that has been effective in crystallizing or precipitating daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide that results in a lipopeptide that is more pure after crystallization or precipitation than before.

SUMMARY OF THE INVENTION

The instant invention addresses these problems by providing crystalline and crystalline-like forms of lipopeptides, particularly daptomycin and daptomycin-related lipopeptides and methods for producing them. In one embodiment, the invention provides methods for crystallizing lipopeptides. In another embodiment, the methods provide a lipopeptide that is more pure after crystallization or precipitation than before crystallization or precipitation.

The invention also provides robust processes for producing and purifying lipopeptides comprising, *inter alia*, crystallizing or precipitating lipopeptides. In one embodiment, the crystallizing or precipitating steps of the processes are used to purify the lipopeptides. In another embodiment, the processes are used for large-scale and/or commercial production of lipopeptides, preferably daptomycin.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

The invention further provides highly purified crystalline or crystal-like forms of daptomycin and daptomycin-related lipopeptides. In one embodiment, the crystalline or crystal-like forms of the lipopeptides may be used in pharmaceutical compositions. In another embodiment, the invention comprises methods of using the pharmaceutical compositions.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows the structure of daptomycin.

Fig. 2 shows a photomicrograph of urchin-like crystal or crystal-like particle of daptomycin produced by the method described in Example 12.

Fig. 3 shows a photomicrograph of needle-like crystals of daptomycin.

Fig. 4 shows a photomicrograph of rod-like crystals of daptomycin.

Fig. 5 shows photomicrographs of daptomycin samples at 100X magnification.

Photomicrographs of amorphous daptomycin are shown using plane transmitted light (A) and using crossed polarized light (B). Photomicrographs of daptomycin crystals are shown using plane transmitted light (C and E) and using crossed polarized light (D and F). The daptomycin crystals were produced by the protocol disclosed in Example 7.

Fig. 6 shows an x-ray powder diffraction pattern for amorphous daptomycin.

Fig. 7 shows an x-ray powder diffraction pattern for a daptomycin crystal produced by the protocol described in Example 7.

Fig. 8 shows an x-ray powder diffraction pattern for a second sample of a daptomycin crystal produced by the protocol described in Example 7.

Fig. 9 shows birefringence of a crystal-like particle of daptomycin when exposed to polarized light. The crystal-like particle was produced by the method described in Example 12.

Fig. 10 shows a flow chart of an exemplary method for crystallization.

Fig. 11 shows a flow chart of an exemplary manufacturing method that does not use crystallization or precipitation. The manufacturing method uses bacterial fermentation to produce a fermentation culture containing daptomycin, and then purification of daptomycin using microfiltration, anion exchange chromatography, size exclusion ultrafiltration, hydrophobic interaction chromatography, anion exchange chromatography for solvent removal, ultrafiltration for pyrogen removal, reverse osmosis and filling vials with daptomycin. See, e.g., International PCT Publication WO 01/44274,

WO 02/059145

PCT/US01/48886

published June 21, 2001, herein incorporated by reference for a detailed description of this type of method.

Fig. 12 shows a flow chart of an exemplary manufacturing method of a lipopeptide compound comprising the steps of fermentation, microfiltration, anion exchange chromatography, size exclusion ultrafiltration, crystallization or precipitation, crystal or precipitate drying, and dry filling of vials with the compound. See, e.g., Example 13.

Fig. 13 shows a flow chart of an exemplary manufacturing method of a lipopeptide compound comprising the steps of fermentation, microfiltration, anion exchange chromatography, crystallization or precipitation, crystal or precipitate drying, and dry filling of vials with the compound. See, e.g., Example 14.

Fig. 14 shows a flow chart of an exemplary manufacturing method of a lipopeptide compound comprising the steps of fermentation, microfiltration, size exclusion ultrafiltration, crystallization or precipitation, crystal or precipitate drying, and dry filling of vials with the compound. See, e.g., Example 15.

Fig. 15 shows a flow chart of an exemplary manufacturing method of a lipopeptide compound comprising the steps of fermentation, microfiltration, crystallization or precipitation, crystal or precipitate drying, and dry filling of vials with the compound. See, e.g., Example 16.

Fig. 16 depicts the structure of CB-131547, a cyclic lipopeptide analog of daptomycin

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Objects of the Invention

One object of the present invention is to provide methods for crystallizing or precipitating lipopeptides. In one embodiment, the methods are used to crystallize or precipitate daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide. In another embodiment, the methods increase the purity of the lipopeptide compared to the purity of the lipopeptide prior to crystallization or precipitation. The methods comprise the steps of providing an amorphous preparation of a lipopeptide and crystallizing or precipitating the lipopeptide under conditions in which the crystalline or precipitated, crystal-like lipopeptide is more pure than the amorphous preparation of the lipopeptide. In one embodiment, the amorphous preparation is no greater than 92% pure and the crystalline or crystal-like

WO 02/059145

PCT/US01/48886

lipopeptide purified therefrom is at least 95% pure, and may be at least 96%, 97% or 98% or more pure. In another embodiment, the amorphous preparation is no greater than 80% pure and the crystalline or crystal-like lipopeptide purified therefrom is at least 95% pure, and may be at least 96%, 97% or 98% or more pure. In another embodiment, the
5 amorphous preparation is no greater than 60% pure and the crystalline or crystal-like lipopeptide purified therefrom is at least 95% pure, and may be at least 96%, 97% or 98% or more pure. In yet another embodiment, the amorphous preparation is no greater than 40% pure and the crystalline or crystal-like lipopeptide purified therefrom is at least 95% pure, and may be at least 96%, 97% or 98% or more pure. In another embodiment, the
10 amorphous preparation is no greater than 20% pure and the crystalline or crystal-like lipopeptide purified therefrom is at least 95% pure, and may be at least 96%, 97% or 98% or more pure. In a further preferred embodiment, the amorphous preparation is no greater than 10% pure and the crystalline or crystal-like lipopeptide purified therefrom is at least 95% pure, and may be at least 96%, 97% or 98% or more pure.

15 Another object of the invention is to provide processes for making and purifying a lipopeptide comprising, *inter alia*, crystallizing or precipitating the lipopeptides. In one embodiment, the crystallizing or precipitating steps are used to purify the lipopeptides. In a preferred embodiment, the crystallization or precipitation is performed by batch crystallization or precipitation. In another embodiment, the process is a large-scale process
20 for commercial production of a lipopeptide, preferably daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide. In one embodiment, the lipopeptide is produced by fermentation. The fermentation product is then purified by a variety of purification techniques including crystallization or precipitation. In one embodiment, the crystallization or precipitation step may be used in combination with other purification techniques including
25 microfiltration, size exclusion ultrafiltration and/or anion exchange chromatography. In one embodiment, the crystallization or precipitation step is used to replace one or more purification techniques that is used in a purification process that does not use crystallization or precipitation. In another embodiment, the crystallization or precipitation step is used to increase purification compared to the other steps without the
30 crystallization or precipitation step. In a preferred embodiment, the method comprises a step of collecting the crystalline or crystal-like lipopeptide after crystallization or precipitation.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

Another object of the present invention is to provide highly purified, e.g. sterile, crystalline or crystal-like forms of lipopeptides. In one embodiment, the lipopeptides are daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide. The crystalline or crystal-like form of the lipopeptide may have any crystalline or crystal-like shape including urchin-like (cluster of needles joined together to visually resemble a sea urchin)(see Fig. 2), needle-like (see Fig. 3), rod-like (see Fig. 4), plate-like or flake-like. In one embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide has a purity of at least 80%, and may be at least 85%, 90% pure. In another embodiment, the crystalline or crystal-like form of the lipopeptide has a purity of at least 95%, and may be at least 96%, 97%, 98% pure or more.

A further object of the present invention is to provide a pharmaceutical composition comprising a crystalline or crystal-like form of a lipopeptide. In one embodiment, the lipopeptide is daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide. In one embodiment, the pharmaceutical comp. is enterically coated for oral administration or is formulated in the form of micronized particles or microspheres. In other embodiments, the invention provides methods for administering the pharmaceutical compositions to subjects in need thereof.

Definitions

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. The practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional techniques of chemistry, biochemistry, biophysics and microbiology and basic terminology used therein.

The term "lipopeptide" refers to a molecule that comprises a lipid-like moiety covalently linked to a peptide moiety, as well as salts, esters, amides and ethers thereof. The term "lipopeptide" also encompasses protected forms of lipopeptides in which one or more amino, carboxylate or hydroxyl groups are protected. See, e.g., "Protective Groups in Organic Synthesis" by Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, New York, 1981 for examples of protecting groups. In one embodiment, the lipopeptide is an antibiotic. In another embodiment, the lipopeptide is LY 303366, echinocandins, pneumocandins, aculeacins, viscosin, surfactin, plipastatin B1, amphotycin or the lipopeptide derivative disclosed in United States Patent 5,629,288. These lipopeptides are known in the art.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

See, e.g., United States Patent 5,202,309 and International PCT Application WO 00/08197. In another embodiment, the lipopeptide is a daptomycin-related molecule. In another embodiment, the lipopeptide is daptomycin.

5 A "daptomycin-related molecule" includes, *inter alia*, daptomycin, A54145 or other lipopeptide that is structurally related to daptomycin, such as a daptomycin-related lipopeptide, including all stereoisomers that may be made at any chiral centers present in these molecules.

A "daptomycin-related lipopeptide" includes, without limitation, a lipopeptide disclosed in United States Patent 4,537,717, 4,482,487, RE32,311, RE32,310, and

10 5,912,226, currently in reissue as United States Application No. 09/547,357.

Daptomycin-related lipopeptides also include those disclosed in International PCT Publication WO 01/44272, published June 21, 2001; International PCT Publication WO 01/44274, published June 21, 2001; and International PCT Publication WO 01/44271, published June 21, 2001; all of these applications are specifically incorporated herein by reference. The daptomycin-related lipopeptides disclosed in the above-identified applications relate to synthetic and semisynthetic lipopeptides in which the ornithine and/or kynurine residues, and/or the fatty acid side chain of daptomycin, are modified. Daptomycin-related lipopeptides further include an A-21978C₀ antibiotic in which the n-decanoyl fatty acid side chain of daptomycin is replaced by a n-octanoyl, n-nonanoyl, n-

20 undecanoyl, n-dodecanoyl, n-tridecanoyl or n-tetradecanoyl fatty acid side chain.

The term "daptomycin" refers to the n-decanoyl derivative of the factor A-21978C₀-type antibiotic that contains an α -aspartyl group. "Daptomycin" is synonymous with LY 146032.

The term "anhydro-daptomycin" refers to a daptomycin-related lipopeptide in which an α -aspartyl group of daptomycin is cyclized to a succinimido group. See, e.g., the '226 patent for the structure of anhydro-daptomycin.

The term " β -isomer" or " β -isomer of daptomycin" refers to a daptomycin-related lipopeptide that contains a β -aspartyl group instead of an α -aspartyl group. See, e.g., the '226 patent for the structure of β -isomer of daptomycin.

30 The term "isolated" refers to a compound or product that is at least 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% or 90% of the compound present in a mixture. It will be understood that the term "isolated" also refers to a compound that is at least 5-

WO 02/059145

PCT/US01/48886

10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80% or 80-90% of the compound present in the mixture group. The percentage of compound in a mixture may be measured by any means known in the art, as described below for measuring purity of a compound.

5 "Substantially pure" refers to a sample having at least 95% of a desired compound. Preferably, daptomycin is "substantially pure" when at least 95% to at least 97% of a sample is daptomycin. Similarly, a daptomycin-related lipopeptide, is "substantially pure" when at least 95% to at least 97% of a sample is a daptomycin-related lipopeptide.

10 Daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide is "essentially pure" when at least 98% to at least 99% of a sample is daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide, respectively.

15 Daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide is "substantially free" of another compound when the other compound is present in an amount that is no more than 1% of the amount of the daptomycin or the daptomycin-related lipopeptide preparation, respectively.

20 Daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide is "essentially free" of another compound when the other compound is present in an amount that is no more than 0.5% of the amount of the daptomycin or the daptomycin-related lipopeptide preparation, respectively.

25 Daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide is "free" of another compound when the other compound is present in an amount that is no more than 0.1% of the amount of the daptomycin or the daptomycin-related lipopeptide preparation, respectively. Alternatively, daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide is "free" of another compound when the compound cannot be detected by HPLC under conditions of maximum sensitivity in which a limit of detection is approximately 0.05% or less of the amount of the daptomycin or the daptomycin-related lipopeptide preparation, respectively.

30 "Purified" daptomycin refers to substantially pure daptomycin, essentially pure daptomycin, or a salt thereof, or to daptomycin or a salt thereof which is substantially free, essentially free, or free of another compound. Similarly, a "purified" daptomycin-related lipopeptide refers to a substantially pure daptomycin-related lipopeptide, an essentially pure daptomycin-related lipopeptide, or a salt thereof, or to a daptomycin-

WO 02/059145

PCT/US01/48886

related lipopeptide or a salt thereof which is substantially free, essentially free, or free of another compound.

“Crude” daptomycin refers to daptomycin or a salt thereof that is less than 90% pure. Similarly, “crude” daptomycin-related lipopeptide refers to a daptomycin-related lipopeptide or a salt thereof that is less than 90% pure.

“Semi-purified” daptomycin refers to daptomycin or a salt thereof that is at least 90% pure and less than 95% pure. Similarly, “semi-purified” daptomycin-related lipopeptide refers to a daptomycin-related lipopeptide or a salt thereof that is at least 90% pure and less than 95% pure.

10 The purity of daptomycin, daptomycin-related lipopeptide or of another lipopeptide refers to the lipopeptide prior to its formulation in a pharmaceutical composition. The purity of the lipopeptide is referred to by “percent purity.” The measure of purity is not a measure of degree of crystallinity of the crystalline preparation. The purity may be measured by any means including nuclear magnetic resonance (NMR),
15 gas chromatography/mass spectroscopy (GC/MS), liquid chromatography/mass spectroscopy (LC/MS) or microbiological assays. One preferred means for measuring the purity of daptomycin is by analytical high pressure liquid chromatography (HPLC). Two methods of analytical HPLC are described in International PCT Publication WO 01/53330, published July 26, 2001, which is herein incorporated specifically by reference.

20 A “lipopeptide crystal” refers to one or more crystals of a lipopeptide or of a lipopeptide salt. The determination of a lipopeptide as a crystal can be determined by any means including, *inter alia*, optical microscopy, electron microscopy, x-ray powder diffraction, solid state nuclear magnetic resonance (NMR) or polarizing microscopy. Microscopy can be used to determine the crystal length, diameter, width, size and shape,
25 as well as whether the crystal exists as a single particle or is polycrystalline.

20 A lipopeptide or lipopeptide particle is “crystal-like” if it is determined to have crystalline characteristics when determined by one means, e.g., visually or by optical or polarizing microscopy, but does not have crystalline characteristics when determined by another means, e.g., x-ray powder diffraction. A lipopeptide that is “crystal-like” may be
30 crystalline under certain conditions but may become non-crystalline when subjected to other conditions.

A “crystalline lipopeptide” or a “crystalline form of a lipopeptide” refers to a preparation of a lipopeptide or salt thereof that comprises lipopeptide crystals. In one

WO 02/059145

PCT/US01/48886

embodiment, a crystalline lipopeptide may comprise some amount of amorphous lipopeptide. In one embodiment, the crystalline lipopeptide comprises more than 50% by weight of lipopeptide crystals. In another embodiment, the crystalline lipopeptide comprises more than 60%, 70%, 80%, 90% or 95% of lipopeptide crystals. The 5 crystalline lipopeptide may comprise 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% or 90-95% of lipopeptide crystals. In another embodiment, the crystalline lipopeptide comprises more than 95% of lipopeptide crystals, e.g., at least 96%, 97%, 98% or 99% lipopeptide crystals or 100% lipopeptide crystals. The crystalline lipopeptide may also comprise anywhere from 95-100% lipopeptide crystals. The percent by weight of lipopeptide 10 crystals refers to the lipopeptide preparation prior to its formulation in a pharmaceutical composition.

An "amorphous" form of a lipopeptide refers to a lipopeptide preparation that comprises few or no lipopeptide crystals or crystal-like lipopeptides (or crystal-like particles) as defined herein. In one embodiment, an amorphous lipopeptide comprises 15 less than 20% by weight of lipopeptide crystals or crystal-like lipopeptides. In another embodiment, an amorphous lipopeptide comprises less than 10% by weight of lipopeptide crystals or crystal-like lipopeptides. In another embodiment, an amorphous lipopeptide comprises less than 5% by weight of lipopeptide crystals or crystal-like lipopeptides. In a still further preferred embodiment, an amorphous lipopeptide comprises less than 1% by 20 weight of lipopeptide crystals or crystal-like lipopeptides.

"Batch crystallization" refers to a method in which the lipopeptide of interest is mixed with the crystallization reagents in solution and the lipopeptide is allowed to crystallize in solution. "Batch precipitation" refers to a method in which the lipopeptide is mixed with precipitation reagents in solution and the lipopeptide is allowed to 25 precipitate in solution. In one embodiment, the crystalline or precipitated preparation is collected from the solution. In another embodiment, the crystalline or precipitated preparation is collected by filtration or centrifugation.

"Organic precipitant" refers to a polyethylene glycol (PEG) or polyethylene glycol monomethyl ether (PEG MME) or compounds that are chemically similar. 30 "Salts" refer to ionic compounds. These ionic compounds may act as precipitants. "Low molecular weight alcohols" are organic compounds containing at least one alcohol functional group, and eight carbon atoms or less. For example, low molecular weight alcohols include, without limitation, methanol, isopropanol, and *tert*-butanol.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

"Polyhydric alcohols" refer to compounds that contain more than one alcohol group, and less than eight carbon atoms. Polyhydric alcohols, for example, include, without limitation, 1,6 hexanediol, ethylene glycol, propylene glycol, glycerol, 1,2-propanediol, 2-methyl-2,4-pentanediol and 1,4 butanediol.

- 5 "Container" refers to a receptacle for holding goods. For example, a container may include, without limitation, an ampule, vial, tube, bottle, or cylinder.

Methods for Producing Purified Lipopeptides

One object of the invention is to provide a method for purifying a lipopeptide comprising the steps of providing an amorphous preparation of a lipopeptide and crystallizing or precipitating the lipopeptide. In one embodiment, the lipopeptide has a higher degree of purity after crystallization or precipitation than prior to being subjected to crystallization or precipitation. Lipopeptides may be crystallized by hanging drop, sitting drop or sandwich drop vapor diffusion, liquid-liquid or free interface diffusion, microdialysis or dialysis, slow solvent evaporation, sublimation, or microbatch or batch crystallization. In general, a lipopeptide may be precipitated in a similar way, preferably a lipopeptide is precipitated by batch precipitation. In a preferred embodiment, the crystallized or precipitated lipopeptide is daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide. In a more preferred embodiment, the crystallized or precipitated lipopeptide is daptomycin.

Lipopeptides may be crystallized or precipitated following the teachings of this specification. In one embodiment, a lipopeptide can be crystallized or precipitated by providing a solution comprising a lipopeptide with a low molecular weight or polyhydric alcohol, a pH buffering agent and a salt comprising a monovalent or divalent cation and allowing precipitation or crystallization to occur, as discussed further *infra*. In another embodiment, the salt has buffering capacity such that an additional pH buffering agent does not have to be present in the solution. In another embodiment, the salt comprises a divalent cation. In a preferred embodiment, the solution provided does not include PEG or PEG-MME or chemically similar compounds. In an embodiment, the method for precipitating or crystallizing the lipopeptide generally comprises the steps of:

- a) mixing the lipopeptide with a salt comprising a monovalent or divalent cation, an optional pH buffering agent and a low molecular weight or polyhydric alcohol; and

WO 02/059145

PCT/US01/48886

b) allowing the lipopeptides to precipitate or crystallize from the solution under the appropriate temperature conditions.

The samples may be monitored, *inter alia*, for crystal or precipitate formation by microscopic examination and the yield may be followed spectrophotometrically. In a 5 preferred embodiment, the crystallized or precipitated lipopeptide is daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide.

In another embodiment, the lipopeptide can be crystallized by providing a solution comprising a low molecular weight or polyhydric alcohol(s), salts and an organic precipitant as discussed further infra. In a more preferred embodiment, the crystallized 10 lipopeptide is daptomycin. In general, for batch crystallization, the lipopeptide is dissolved in a solution and low molecular weight alcohols, salts, buffers and/or organic precipitants are added to the solution. The samples are then crystallized under the appropriate temperature conditions, with or without stirring. The samples may be monitored, *inter alia*, for crystal formation by microscopic examination and the yield may 15 be followed spectrophotometrically.

As discussed above, the lipopeptide, preferably daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide, is crystallized or precipitated in the presence of one or more alcohols. In a preferred embodiment, the alcohol is a low molecular weight or polyhydric alcohol. Examples of low molecular weight or polyhydric alcohols include, without limitation, 20 methanol, isopropanol, *tert*-butanol, 1,6 hexanediol, ethylene glycol, propylene glycol, glycerol, 1,2-propanediol, 2-methyl-2,4-pentanediol and 1,4 butanediol. In a preferred embodiment, the alcohol is isopropanol, *tert*-butanol, glycerol, 1,6-hexanediol, 1,2-propanediol, 1,4-butanediol, propylene glycol and/or ethylene glycol. In a more preferred embodiment, the alcohol is isopropanol.

25 Salts include, *inter alia*, magnesium or sodium formate, ammonium sulfate, ammonium dihydrogen phosphate, calcium acetate, zinc acetate, tri-sodium citrate dihydrate, magnesium acetate, sodium acetate, magnesium chloride, cadmium chloride, ammonium acetate, sodium chloride and lithium sulfate. In one embodiment, the salt comprises a monovalent cation, e.g., sodium. In a preferred embodiment, the salt 30 comprises a divalent cation. In an even more preferred embodiment, the salt comprises a calcium cation, a magnesium cation or a manganese cation. In a further preferred embodiment, the salt comprises a calcium divalent cation. In one embodiment, the salt is calcium chloride, calcium acetate, zinc acetate, sodium citrate, tri-sodium citrate

WO 02/059145

PCT/US01/48886

dihydrate, magnesium chloride, lithium sulfate, sodium chloride, magnesium acetate, sodium acetate or a manganese salt, such as manganese acetate or manganese chloride. In a preferred embodiment, the salt is calcium acetate. Examples of other salts that comprise a divalent cation, such as a calcium cation, are known in the art, and include, *inter alia*,

5 those listed in the 2000 Sigma catalog, herein incorporated by reference. Without wishing to be bound to any theory, it is thought that the salt cation may neutralize the negative charges on the lipopeptide, e.g., the four carboxylic acids of daptomycin. Organic precipitants include, *inter alia*, polyethylene glycols (PEGs) that can vary in average molecular weight from between 300 and 10,000, or polyethylene glycol

10 monomethyl ether (PEG-MME). In a preferred embodiment, the organic precipitant is PEG 300, PEG 600, PEG 2000, PEG 4000, PEG 8000 or PEG 10,000.

The lipopeptide is precipitated or crystallized from a solution that is buffered to pH 5.0 to 9.5. In one embodiment, prior to being buffered, the solution has a pH of about 1.5, 2.0 or 3.0. In one embodiment, daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide is precipitated or crystallized from a solution of approximately pH 5.5 to approximately pH 15 7.5. In another embodiment, the buffer has a pH of approximately 5.9 to approximately pH 7.5. In one embodiment, the buffered solution may be obtained by using a pH buffering agent. Examples of pH buffering agents include, without limitation, Tris, phosphate, citrate, HEPES, CHES, sodium acetate or 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES), sodium borate, sodium cacodylate, imidazole and tri-sodium citrate dihydrate. In a preferred embodiment, the salt is sodium cacodylate, sodium acetate, tri-sodium citrate dihydrate, HEPES, MES, CHES, imidazole, calcium acetate and Tris-HCl. In a more preferred embodiment, the pH buffer is calcium acetate pH 6.1, sodium acetate pH 6.1, sodium cacodylate pH 6.5, tri-sodium citrate dihydrate pH 5.6, HEPES pH 7.5, imidazole pH 8, MES pH 6.0, calcium acetate pH 6 and Tris-HCl pH 8.5. In another embodiment, the solution may be buffered by using a salt that also has buffering capacity. In a preferred embodiment, the pH buffer is calcium acetate pH 6.1.

The lipopeptide is precipitated or crystallized using hanging drop vapor diffusion from a solution containing 2 to 40% low molecular weight or polyhydric alcohol, 0.001 to 30 0.5 M salt and 0.005 to 0.2 M pH buffering agent. In a preferred embodiment, the lipopeptide is precipitated or crystallized from a solution containing 3 to 30% low molecular weight or polyhydric alcohol, 0.01 to 0.3 M salt and 0.01 to 0.1 M pH buffering agent. In a more preferred embodiment, the lipopeptide is precipitated or

WO 02/059145

PCT/US01/48886

crystallized from a solution containing 5 to 20% low molecular weight or polyhydric alcohol, 0.02 to 0.1 M salt and 0.02 to 0.07 M pH buffering agent. The solution provided may or may not include polyethylene glycol (PEG) or polyethylene glycol monomethyl ether (PEG-MME).

5 The lipopeptide is precipitated or crystallized using batch crystallization from a solution containing 65 to 95% low molecular weight or polyhydric alcohol, 0.001 to 0.5 M salt and 0.001 to 0.2 M pH buffering agent. In a preferred embodiment, the lipopeptide is precipitated or crystallized from a solution containing 70 to 90% low molecular weight or polyhydric alcohol, 0.005 to 0.04 M salt and 0.005 to 0.04 M pH buffering agent. In some embodiments, the lipopeptide is crystallized from a solution which also comprises 3-8% organic precipitant. In a more preferred embodiment, the lipopeptide is precipitated or crystallized from a solution containing 80 to 85% low molecular weight or polyhydric alcohol, 0.01 to 0.03 M salt and 0.01 to 0.03 M pH buffering agent. In some embodiments, the solution further comprises about 4 to 5% organic precipitant, e.g., PEG or PEG-MME. In other embodiment, the solution provided does not include polyethylene glycol (PEG) or polyethylene glycol monomethyl ether (PEG-MME).

10 The lipopeptide is precipitated or crystallized at a temperature from approximately 0°C to approximately 30°C to obtain precipitate or crystal formation, respectively. In a preferred embodiment, a lipopeptide is crystallized or precipitated at a temperature of approximately 20-30°C. In a more preferred embodiment, the mixture is crystallized or precipitated at approximately 23-28°C. In an even more preferred embodiment, the mixture is crystallized or precipitated at approximately 27°C. The mixture may be crystallized or precipitated for any time period that results in crystallization or precipitation, preferably approximately one hour to approximately two weeks. In a preferred embodiment, the mixture is stored for a period of approximately three hours to approximately 24 hours, more preferably approximately 8-18 hours.

15 Lipopeptide crystals or crystal-like particles may have a shape that is, without limitation, needle-like, rod-like, urchin-like, flake-like, plate-like or clusters thereof. In a
20 one embodiment, lipopeptide crystals or crystal-like particles are urchin-like, rod-like or needle-like. The shape of the crystal or crystal-like particle may be determined, *inter alia*, by optical or electron microscopy. In another embodiment, lipopeptide crystals or crystal-like particles may be any size that is at least approximately 0.5 μm in diameter in

WO 02/059145

PCT/US01/48886

any one dimension. In a more preferred embodiment, lipopeptide crystals or crystal-like particle are at least 5 μm , more preferably at least 10 μm . In an even more preferred embodiment, the lipopeptide crystals or crystal-like particles are at least 50 μm , more preferably at least 100 μm . The size of the crystal may be determined by any method known to one having ordinary skill in the art. See, e.g., United States Pharmacopeia (USP), pp. 1965-67.

The properties of a crystalline or crystal-like lipopeptide may be determined by any method known to one having ordinary skill in the art. The properties that can be determined include the crystalline or crystal-like lipopeptide's size, shape, birefringence properties, powder x-ray diffraction properties, solid state NMR properties, melting temperature and stability to heat, light, humidity, and degradation. In a preferred embodiment, one having ordinary skill in the art may determine whether a lipopeptide is crystalline by powder x-ray diffraction. Powder x-ray diffraction is highly useful for determining whether a preparation is crystalline when the sample is a randomly-oriented collection of small crystals. Diffraction by a mass of randomly-oriented microcrystals produces a series of lines or rings (dependent of the detector) characteristic of the molecule studied and its structure. In a preferred embodiment, powder diffraction is measured by an Automated Powder Diffraction instrument in order to determine whether a lipopeptide is crystalline. See, e.g., Atkins et al, *Physical Chemistry*, pp. 710-716 (1978), herein incorporated by reference for a discussion of the Debye-Scherrer method for powder diffraction. Any powder diffractometer instrument known in the art that is equipped with any detector for powder diffraction that known in the art could be used to measure the diffraction pattern.

In a preferred embodiment of the invention, a lipopeptide is crystallized or precipitated using a buffering agent between approximately pH 5.0 and 9.5, a salt and an alcohol at a temperature of approximately 24-28°C for a period of approximately three to 24 hours. In a preferred embodiment, the salt is a buffering agent and comprises a divalent cation and the alcohol is a low molecular weight alcohol, and the pH is between approximately pH 5.5 and 7.5. In an even more preferred embodiment, the salt is a calcium salt, the alcohol is isopropanol and the pH is between approximately pH 5.9 and 6.3. In embodiments where the solution includes an organic precipitant, preferably the organic precipitant is PEG 4000 or PEG 8000. In another embodiment the lipopeptide is precipitated or crystallized from a solution containing 12 to 18% glycerol, 0.3 to 0.8m

WO 02/059145

PCT/US01/48886

salt, 0.03 to 0.08m pH buffering agent, and 12-18% PEG 600. In a still further preferred embodiment, the lipopeptide is daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide.

Examples 2-3 provide methods for precipitating a highly pure crystal-like daptomycin.

One having ordinary skill in the art, following the teachings of the instant specification,

- 5 may modify the crystallization/precipitation conditions provided in the examples to crystallize or precipitate daptomycin, daptomycin-related lipopeptides, or other lipopeptides of interest. Further, although the teachings of the instant specification describe the use of a single crystallization or precipitation step in a process for purifying a lipopeptide, one having ordinary skill in the art following the teachings of the 10 specification may use multiple crystallization or precipitation steps in a process for purifying a lipopeptide. It may be advantageous to employ multiple rounds of crystallization or precipitation as disclosed herein in order to further increase purity of the lipopeptide.

After crystallization or precipitation, one may collect the crystalline material or crystal-like precipitate by any method known in the art. In a preferred embodiment, the crystalline material or crystal-like precipitate is collected by centrifugation or filtration. In an even more preferred embodiment, the crystalline material or crystal-like precipitate is collected by filtration because filtration is easily incorporated into a large-scale process for producing a lipopeptide. After the crystalline material or crystal-like precipitate is 15 collected, it may be washed to remove excess crystallizing or precipitating reagents. Any wash solvent known in the art may be chosen so long as it does not appreciably dissolve the crystalline material or crystal-like precipitate. An example of a wash solvent is provided in Example 12. After the crystalline material or crystal-like precipitate is washed, it may be dried by any method known in the art. Examples of drying methods 20 include air-drying, lyophilization (freeze-drying) or desiccation. In a preferred method, the crystalline material or crystal-like precipitate is desiccated. See, e.g., Example 12. In another embodiment, the crystalline lipopeptide's stability may be determined by its residual antibiotic activity or its degradation. The antibiotic activity may be measured in a standard agar-diffusion assay against various bacterial strains. See, e.g., Example 32 of 25 United States Patent 4,537,717, specifically incorporated herein by reference. The amount of degradation can be measured by, *inter alia*, HPLC analysis, such as that described in International PCT Publication WO 01/53330, published July 26, 2001. In a preferred embodiment, the stability of the crystalline lipopeptide is greater than that of the 30

WO 02/059145

PCT/US01/48886

amorphous form of the lipopeptide. The stability of the crystalline lipopeptide may be determined by exposing the crystalline lipopeptide and an amorphous form thereof to heat, light, humidity, and measuring the degree of degradation of the crystalline form to that of the amorphous form.

5 Degradation of the lipopeptide may be measured by determining the biological activity of the lipopeptide or any applicable physical parameter. In one embodiment, degradation may be measured by determining a particular biological activity of a lipopeptide after it has been subjected to heat, light, humidity, changes in pH or extreme pH, and comparing it to the same biological activity of the lipopeptide prior to any tests of stability. The amount of degradation may be determined, for example, by determining the percentage of biological activity remaining after the test of stability. The percentage of remaining biological activity may be compared to that of an amorphous form of the lipopeptide that has been subjected to the same test. In one embodiment, if the lipopeptide is an antibiotic, the crystalline lipopeptide may be tested for its antibiotic activity both prior to and after a test of its stability and compared to an amorphous form that has been tested prior to and after a degradation test. In a preferred embodiment, the lipopeptide is daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide, and the biological activity test determines the amount of antibiotic activity of the lipopeptides against gram-positive bacteria.

10 Degradation of a lipopeptide may also be measured by a physical assay. In one embodiment, degradation may be measured by determining the percentage of intact crystalline lipopeptide that remains after a test of its stability. The percentage of remaining intact lipopeptide may be compared to that of an amorphous form of the lipopeptide that has been subjected to the same test for stability. In a preferred embodiment, the degradation of the lipopeptide may be measured by HPLC, ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy, NMR, or mass spectroscopy. In an even more preferred embodiment, HPLC is used to determine the percentage of intact lipopeptide that remains after a crystalline form of a lipopeptide has been subjected to a test of its stability.

15 Without wishing to be bound by any theory, applicants believe that daptomycin is crystallized by the methods described above. However, it is thought that washing and/or drying the daptomycin crystals causes the daptomycin crystalline material to revert to a non-crystalline but still crystal-like form. Nevertheless, even if the methods described

WO 02/059145

PCT/US01/48886

above only precipitate rather than crystallize the daptomycin or other lipopeptide, the methods still are advantageous because the methods purify the lipopeptide.

The invention also provides a crystalline or crystal-like lipopeptide produced by the above-described methods. In one embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide comprises a lower amount of one or more impurities compared to the lipopeptide before crystallization or precipitation. In one embodiment, crystalline or crystal-like lipopeptide is daptomycin that comprises a lower level of anhydro-daptomycin and/or the β -isomer of daptomycin compared to daptomycin before crystallization or precipitation. In another embodiment, crystalline or crystal-like daptomycin comprises a lower level of all impurities compared to amorphous daptomycin. Similarly, in another embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is a daptomycin-related lipopeptide, as described above, which comprises a lower level of one or more impurities compared to an amorphous form of the daptomycin-related lipopeptide. In yet another embodiment, the crystalline or crystal-like daptomycin-related lipopeptide comprises a lower level of all impurities compared to an amorphous form of the daptomycin-related lipopeptide.

The crystalline or crystal-like lipopeptide produced by the method described above likely comprises monovalent or divalent cations and water. In a preferred embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is daptomycin or daptomycin-related lipopeptide that comprises a divalent cation. In a more preferred embodiment, the divalent cation is a calcium cation. In an even more preferred embodiment, the crystalline or crystal-like daptomycin or daptomycin-related lipopeptide comprises approximately 1-10% by weight of a divalent calcium cation and approximately 0-15% by weight of water as determined by atomic absorption or thermal gravity analysis. In a further preferred embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is daptomycin that comprises approximately 5% by weight of a divalent calcium cation and approximately 10% by weight of water; by HPLC analysis, the purity of the crystalline or crystal-like daptomycin is at least 95%, 96%, 97% or 98% or is any purity between 95-98%, relative to related substances and organic contaminants. Alternatively, the crystalline or crystal-like daptomycin or daptomycin-related lipopeptide comprises a monovalent cation such as sodium. Without wishing to be bound by any theory, it is thought that daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide may form a salt with the monovalent or divalent cation when it crystallizes or precipitates.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

The crystalline form of the lipopeptide may exhibit an increased solubility in a solution or an increased rate of reconstitution in a solution than an amorphous form of the lipopeptide. One may measure whether the crystalline lipopeptide exhibits an increased solubility or increased reconstitution rate by any method known in the art. For instance,

5 one may dissolve a defined amount of a crystalline lipopeptide in an aqueous solution and measure the concentration of the dissolved lipopeptide and compare it to the concentration of dissolved lipopeptide that has been prepared by dissolving the same amount of amorphous lipopeptide in an aqueous solution. Similarly, one may measure the reconstitution rate of a crystalline lipopeptide by adding the crystalline lipopeptide to

10 an aqueous solution and then measuring the concentration of dissolved lipopeptide over time and comparing it to the reconstitution rate of an amorphous lipopeptide that has been measured in the same way. The concentration of lipopeptide is measured by HPLC.

The methods described above provide for the production of crystalline or crystal-like lipopeptides that are more pure than the amorphous lipopeptide from which they are crystallized or precipitated. In one embodiment, the lipopeptide is daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide. In another embodiment, daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide has a purity of no more than 92% before crystallization and has a purity of at least approximately 95%, 96%, 97% or 98% purity, or any purity between 95-98%, after crystallization or precipitation as a crystal-like lipopeptide. In a still further preferred embodiment, daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide has a purity of no more than 90% before crystallization and has a purity of approximately at least 97% or 98% after crystallization.

In another embodiment, the daptomycin has a purity of no more than 80%, preferably no more than 70% and more preferably no more than 60% purity before crystallization or precipitation, and has at least approximately 95%, 96%, 97% or 98% purity, or any purity between 95-98%, after purification. In another embodiment, the daptomycin has a purity of no more than 50%, preferably no more than 40%, more preferably no more than 30% purity before crystallization and has at least approximately 95%, 96%, 97% or 98% purity, or any purity between 95-98%, after purification by crystallization or precipitation. Further preferred is an embodiment in which daptomycin has a purity of no more than 20%, more preferably no more than 15%, even more preferably no more than 10% purity before crystallization and has at least approximately 95%, 96%, 97% or 98% purity, or any purity between 95-98%, after purification.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

In a more preferred embodiment, the lipopeptide is daptomycin. A daptomycin preparation may be obtained by any method disclosed, e.g., in any one United States Patents RE32,333, RE32,455, 4,800,157, RE32,310, RE32,311, 4,537,717, 4,482,487, 4,524,135, 4,874,843, 4,885,243 or 5,912,226, which are herein incorporated specifically by reference. A daptomycin preparation may also be obtained by one of the methods described in International PCT Publication WO 01/53330, published July 26, 2001. After the lipopeptide preparation is prepared, the lipopeptide preparation is crystallized or precipitated following the teachings of the specification described herein to produce a crystalline or crystal-like lipopeptide that is more pure or that contains lower levels of specific impurities, e.g., anhydro-daptomycin, than the lipopeptide preparation from which it is prepared.

Processes for Producing Purified Lipopeptides from Fermentation Cultures

Another embodiment of the present invention is drawn to a process combining process chromatography steps and crystallization or precipitation to produce a purified lipopeptide. In a preferred embodiment, the method comprises the steps of producing a lipopeptide by any method known in the art, such as fermentation of a naturally-occurring or recombinant organism, and then subjecting the lipopeptide preparation to any one or more purification methods such as microfiltration, anion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, and/or size exclusion chromatography (either via traditional size exclusion chromatographic media or via ultrafiltration) to produce a lipopeptide preparation that has been partially purified, and then crystallizing or precipitating the lipopeptide preparation to obtain a purified crystalline or crystal-like lipopeptide. In a preferred embodiment, the lipopeptide is daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide. The steps regarding fermentation, microfiltration, anion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and ultrafiltration are disclosed in the art, e.g., in any one United States Patents RE32,333, RE32,455, 4,800,157, RE32,310, RE32,311, 4,537,717, 4,482,487, 4,524,135, 4,874,843, 4,885,243 or 5,912,226, in International Publication WO 01/53330, published July 26, 2001.

The method optionally comprises the step of collecting and/or washing the crystalline or crystal-like material after the crystallization or precipitation step. In a preferred embodiment, the crystalline lipopeptide preparation may be collected by filtration. In another embodiment, the crystalline or crystal-like material is dried.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

In one embodiment, the purification method comprises fermenting *Streptomyces roseosporus* to obtain a fermentation culture containing daptomycin. In one embodiment, the *S. roseosporus* may be fermented as described in United States Patent 4,885,243. In another embodiment, the fermentation conditions in which the A-21978C₀-containing crude product is produced by *Streptomyces roseosporus* is altered in order to increase daptomycin production and decrease impurities and related contaminants produced by the *S. roseosporus* fermentation culture as described in International PCT Publication WO 01/53330, published July 26, 2001. The WO 01/53330 publication describes fermenting *S. roseosporus* as described in the '243 patent with the modification that the decanoic acid feed is kept at the lowest levels possible without diminishing the overall yield of the fermentation.

Alternatively, daptomycin may be obtained by fermenting a bacterial strain or other producing organism that recombinantly produces daptomycin. In one embodiment, the recombinant bacterial strain or other recombinant organism comprises the daptomycin biosynthetic gene cluster. In another embodiment, the daptomycin biosynthetic gene cluster or a portion thereof is introduced into the organism or bacterial strain via a bacterial artificial chromosome (BAC). In another embodiment, the recombinant bacterial strain used is *S. roseosporus* or *S. lividans* comprising a BAC containing the daptomycin biosynthetic gene cluster. United States Provisional Application 60/272,207, filed February 28, 2001 describes the daptomycin biosynthetic gene cluster from *S. roseosporus* and uses thereof, and is hereby incorporated by reference in its entirety.

After fermentation, the fermentation broth is clarified by centrifugation, microfiltration or extraction, as is known in the art or as described in the WO 01/53330 publication. In a preferred embodiment, the clarification is performed by microfiltration. See, e.g., Examples 13-16 and Figures 11-15. Figure 11 shows an exemplary manufacturing process that does not use crystallization or precipitation.

After the fermentation broth is clarified, the concentration of daptomycin in the broth is approximately 5-10%. In one embodiment of the invention, the daptomycin preparation is subjected to a crystallization/precipitation method described above directly subsequent to microfiltration. In one embodiment, crystallization or precipitation is performed under sterile conditions. After crystallization or precipitation is complete, the crystalline or crystal-like daptomycin is optionally collected, washed and dried, as

WO 02/059145

PCT/US01/48886

described in further detail below. The dry bulk active drug may then be used to dry fill sterile vials. See, e.g., Example 16 and Figure 12.

After clarification of the fermentation broth, the lipopeptide may be enriched in the preparation by anion exchange chromatography, as is known in the art or as described in the WO 01/53330 publication or herein. See, e.g., Examples 13-14 and Figures 12-13. After anion exchange chromatography, the purity of daptomycin in the broth is approximately 35-40%. In one embodiment of the invention, the daptomycin preparation is then subjected to a crystallization or precipitation method described above directly subsequent to anion exchange chromatography. In one embodiment, crystallization or precipitation is performed under sterile conditions. After crystallization or precipitation is complete, the crystalline or crystal-like daptomycin is optionally collected, washed and dried as described below. The dry bulk active drug may then be used to dry fill sterile vials. See, e.g., Example 14 and Figure 13.

In another embodiment of the invention, the daptomycin preparation is subjected to size exclusion ultrafiltration after anion exchange chromatography. Size exclusion ultrafiltration is described in the WO 01/53330 publication. The application published July 26, 2001 describes a method of depyrogenating, filtering and concentrating the daptomycin using an ultrafiltration membrane of 10,000 to 30,000 nominal molecular weight (NMW). The application discloses a method in which the lipopeptide passes through the ultrafiltration membrane while large molecular weight impurities, such as endotoxins, are retained by the filter. After the lipopeptide has passed through the membrane, the pH, temperature and/or salt concentration of the lipopeptide solution are altered such that the lipopeptides form micelles. The lipopeptide solution is then filtered on the ultrafiltration membrane under conditions in which the lipopeptide micelles are retained on the membrane while smaller impurities pass through the filter. In this manner, the lipopeptide is further purified. The application discloses the conditions under which lipopeptide micelles may be formed and disassociated as well as methods for filtering the lipopeptide solution to obtain a more purified lipopeptide application. In an even more preferred embodiment, the lipopeptide is daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide. The lipopeptide may then be crystallized, as described herein. After both anion exchange chromatography and size exclusion ultrafiltration, daptomycin purity is approximately 80-90%. As discussed above, the daptomycin preparation is then subjected to a crystallization/precipitation method described above, preferably under

WO 02/059145

PCT/US01/48886

sterile conditions. The crystalline or crystal-like daptomycin may be optionally collected, washed, dried and used to dry fill vials as described below. See, e.g., Example 13 and Figure 12.

In another embodiment of the invention, the crude daptomycin preparation is subjected to size exclusion ultrafiltration without anion exchange chromatography. After size exclusion ultrafiltration, daptomycin purity is approximately 35-40%. The lipopeptide may then be crystallized or precipitated as described herein, preferably by sterile methods. As discussed above, the crystalline or crystal-like daptomycin may be collected, washed, dried and used to dry fill sterile vials. See, e.g., Example 15 and Figure 14.

In an alternative embodiment, the lipopeptide preparation is subjected to hydrophobic interaction chromatography (HIC), such as is described in the WO 01/53330 publication, after either the anion exchange chromatography or the size exclusion filtration. The lipopeptide may then be crystallized or precipitated as described herein.

After crystallization or precipitation, the crystalline or crystal-like lipopeptide may be collected by a method described herein, e.g., by filtration or centrifugation. The crystalline or crystal-like lipopeptide is optionally washed to remove residual crystallization or precipitation solvent. A method of washing crystals or crystal-like material are described below. See, e.g., Example 3. The washed or unwashed crystal or crystal-like material may be dried. The drying may be performed by any method known in the art, including, without limitation, vacuum drying, spray drying, tray drying or lyophilization. In one embodiment, the drying is performed under sterile conditions. In another embodiment, the drying is performed by vacuum drying. In a more preferred embodiment, the drying is performed using a 0.65 m² Klein Hastelloy-B double cone vacuum dryer or an equivalent apparatus. The dried crystalline or crystal-like lipopeptide is stable and is easily stored.

In one embodiment, vials are filled with any convenient amount of the dried crystalline or crystal-like lipopeptide. In one embodiment, the vials are filled under sterile conditions and then stoppered. In another embodiment, the vials are filled with 50 to 5000 mg each of the dried crystalline or crystal-like lipopeptide. In another embodiment, the vials are filled with 100 to 1000 mg each. In another embodiment, the vials are filled with 200 to 500 mg each. In another embodiment, the dried crystalline or crystal-like lipopeptide is used for bulk packaging of the lipopeptide. The bulk packaging

WO 02/059145

PCT/US01/48886

is usually greater than 5000 mg each of the dried crystalline or crystal-like lipopeptide. In one embodiment, the bulk packaging is performed under sterile conditions.

In one embodiment, the crystallization or precipitation step is performed under sterile conditions. In this embodiment, sterile crystallization or precipitation reagents and a sterile, controlled working environment are used. In one embodiment, the lipopeptide is filtered on an ultrafiltration membrane, as disclosed above, before being mixed with the sterile crystallization/precipitation reagents. After crystallization or precipitation, the crystalline or crystal-like lipopeptide preparation is collected by centrifugation or filtration under sterile conditions. In one embodiment, the lipopeptide preparation is collected by sterile filtration. In another embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is sterilized after it has been collected. Methods of sterile crystallization, precipitation and filtration as well as methods of sterilizing a final pharmaceutical product are known in the art. See, e.g., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company (1995), pp. 1474-1487, herein incorporated by reference.

In another embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is not dried. In this embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is preferably stored in a solution that preserves the crystalline or crystal-like nature of the lipopeptide. Vials may be filled with the lipopeptide and solution under sterile or nonsterile conditions. In one embodiment, the conditions are sterile. Alternatively, the crystalline or crystal-like lipopeptide and solution may be used to fill bulk packaging.

Figures 10 and 11 provide flowcharts describing an exemplary daptomycin manufacturing protocol using crystallization. The incorporation of sterile crystallization into the manufacturing protocol shortens the protocol considerably and eliminates 3 to 4 steps in the process.

Crystalline or Crystal-like Lipopeptides, Pharmaceutical Compositions and Methods of Use Thereof

Another object of the instant invention is to provide crystalline or crystal-like lipopeptides or salts thereof, as well as pharmaceutical formulations comprising a crystalline or crystal-like lipopeptide or its salts. In one embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is daptomycin. However, all reference herein to crystalline or crystal-like lipopeptides specifically contemplates daptomycin, a daptomycin-related

WO 02/059145

PCT/US01/48886

molecule, including, *inter alia*, daptomycin, A54145 and a daptomycin-related lipopeptide, as disclosed above.

Daptomycin crystals or crystal-like particles, as well as other lipopeptide crystals or crystal-like particles may have a shape such as, *inter alia*, a needle-like shape, a plate-like shape, a lath-like shape, an equant-like shape, an urchin-like shape or a rod-like shape. In one embodiment, daptomycin crystals or crystal-like particles have an urchin-like, needle-like or rod-like shape. The size of the crystals or crystal-like particles may range from approximately 0.5 μm to greater than 100 μm . In one embodiment, the particle size is at least 5 μm or greater. In a more preferred embodiment, the particle size is at least 10 μm or greater, more preferably at least 50 μm . In an even more preferred embodiment, the particle size is at least 100 μm .

Further, in one embodiment, daptomycin crystals have an x-ray diffraction pattern as shown in Figs. 6, 7 and 8. In another embodiment, the lipopeptide crystal exhibits a different melting point than the amorphous form of the lipopeptide.

In one embodiment of the invention, a crystalline form of a lipopeptide exhibits a stability that is equal to or greater than the amorphous form of the lipopeptide. In a preferred embodiment, the crystalline form is daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide. In another preferred embodiment, the crystalline lipopeptide is sterile. In another preferred embodiment, the stability of the crystalline lipopeptide is greater than the amorphous form of the lipopeptide. The crystalline lipopeptide may exhibit higher stability to heat, light, degradation or humidity than the amorphous form. The stability of the lipopeptide may be measured by any means including, e.g., antibiotic activity, degradation of the lipopeptide or conversion of daptomycin to anhydro-daptomycin or the β -isomer of daptomycin. In another embodiment of the invention, the crystalline form of the lipopeptide may be more quickly reconstituted in aqueous solution than the amorphous form of the lipopeptide.

Crystalline or crystal-like lipopeptides, such as daptomycin or a daptomycin-related lipopeptide, pharmaceutically-acceptable salts, esters, amides, ethers and protected forms thereof, can be formulated for oral, intravenous, intramuscular, subcutaneous, aerosol, topical or parenteral administration for the therapeutic, empirical or prophylactic treatment of diseases, particularly bacterial infections. Reference herein to "crystalline or crystal-like lipopeptides" or "crystalline or crystal-like daptomycin" includes

WO 02/059145

PCT/US01/48886

pharmaceutically acceptable salts thereof. Crystalline or crystal-like lipopeptides, such as daptomycin, may be particularly advantageous for pharmaceutical compositions because they can be easily formulated as micronized particles of microspheres, which permits the facile preparation of enterically coated lipopeptides for oral delivery, pharmaceutical compositions for aerosol delivery to, e.g., the lung, and the preparation of lipopeptides formulations for sustained release. Crystalline or crystal-like lipopeptides and crystalline or crystal-like daptomycin may also be more readily dissolved in aqueous solution.

Crystalline or crystal-like lipopeptides, including daptomycin or daptomycin-related lipopeptides can be formulated using any pharmaceutically acceptable carrier or excipient that is compatible with daptomycin or with the lipopeptide of interest. See, e.g., Handbook of Pharmaceutical Additives: An International Guide to More than 6000 Products by Trade Name, Chemical, Function, and Manufacturer, Ashgate Publishing Co., eds., M. Ash and I. Ash, 1996; The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, ed. S. Budavari, annual; Remington's Pharmaceutical Sciences, 15 Mack Publishing Company, Easton, PA; Martindale: The Complete Drug Reference, ed. K. Parfitt, 1999; and Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New York, NY, ed. L. S. Goodman et al.; the contents of which are incorporated herein by reference, for a general description of the methods for administering various antimicrobial agents for human therapy. Compounds of this invention can be mixed with conventional pharmaceutical carriers and excipients and used in the form of tablets, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, creams and the like. Compounds of this invention may also be mixed with other therapeutic agents and antibiotics, such as discussed herein. The compositions comprising a compound of this invention will contain from about 0.1 to about 90% by weight of the active compound, 20 and more generally from about 10 to about 30%.

25 The compositions of the invention can be delivered using controlled (e.g., capsules) or sustained release delivery systems (e.g., bioerodable matrices). Exemplary delayed release delivery systems for drug delivery that are suitable for administration of the compositions of the invention are described in U.S. Patent Nos. 4,452,775 (issued to Ken), 5,239,660 (issued to Leonard), 3,854,480 (issued to Zaffaroni).

30 The compositions may contain common carriers and excipients, such as corn starch or gelatin, lactose, sucrose, microcrystalline cellulose, kaolin, mannitol, dicalcium phosphate, sodium chloride and alginic acid. The compositions may contain

WO 02/059145

PCT/US01/48886

croscarmellose sodium, microcrystalline cellulose, corn starch, sodium starch glycolate and alginic acid.

Tablet binders that can be included are acacia, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, polyvinylpyrrolidone (Povidone), hydroxypropyl methylcellulose, sucrose, starch and ethylcellulose.

Lubricants that can be used include magnesium stearate or other metallic stearates, stearic acid, silicone fluid, talc, waxes, oils and colloidal silica.

Flavoring agents such as peppermint, oil of wintergreen, cherry flavoring or the like can also be used. It may also be desirable to add a coloring agent to make the dosage form more aesthetic in appearance or to help identify the product.

For oral use, solid formulations such as tablets and capsules are particularly useful. Sustained release or enterically coated preparations may also be devised. In another embodiment, crystalline or crystal-like lipopeptides may be supplied in combination with a carrier composition that enhances the oral availability of the lipopeptide. In a preferred embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is daptomycin. For pediatric and geriatric applications, suspensions, syrups and chewable tablets are especially suitable. For oral administration, the pharmaceutical compositions are in the form of, for example, a tablet, capsule, suspension or liquid. The pharmaceutical composition is preferably made in the form of a dosage unit containing a therapeutically-effective amount of the active ingredient. Examples of such dosage units are tablets and capsules. For therapeutic purposes, the tablets and capsules which can contain, in addition to the active ingredient, conventional carriers such as binding agents, for example, acacia gum, gelatin, polyvinylpyrrolidone, sorbitol, or tragacanth; fillers, for example, calcium phosphate, glycine, lactose, maize-starch, sorbitol, or sucrose;

lubricants, for example, magnesium stearate, polyethylene glycol, silica, or talc; disintegrants, for example, potato starch, flavoring or coloring agents, or acceptable wetting agents. Oral liquid preparations generally are in the form of aqueous or oily solutions, suspensions, emulsions, syrups or elixirs may contain conventional additives such as suspending agents, emulsifying agents, non-aqueous agents, preservatives,

coloring agents and flavoring agents. Oral liquid preparations may comprise lipopeptide micelles or monomeric forms of the lipopeptide. Examples of additives for liquid preparations include acacia, almond oil, ethyl alcohol, fractionated coconut oil, gelatin,

WO 02/059145

PCT/US01/48886

glucose syrup, glycerin, hydrogenated edible fats, lecithin, methyl cellulose, methyl or propyl *para*-hydroxybenzoate, propylene glycol, sorbitol, or sorbic acid.

- For intravenous (IV) use, a water soluble form of a compound of this invention can be dissolved in any of the commonly used intravenous fluids and administered by infusion. Intravenous formulations may include carriers, excipients or stabilizers including, without limitation, calcium, human serum albumin, citrate, acetate, calcium chloride, carbonate, and other salts. Intravenous fluids include, without limitation, physiological saline or Ringer's solution. Daptomycin or other lipopeptides also may be placed in injectors, cannulae, catheters and lines.
- Formulations for parenteral administration can be in the form of aqueous or non-aqueous isotonic sterile injection solutions or suspensions. These solutions or suspensions can be prepared from sterile powders or granules having one or more of the carriers mentioned for use in the formulations for oral administration. The crystalline or crystal-like lipopeptides can be dissolved in polyethylene glycol, propylene glycol, ethanol, corn oil, benzyl alcohol, sodium chloride, and/or various buffers. For intramuscular, parenteral or intravenous preparations, a sterile formulation of a crystalline or crystal-like lipopeptide compound or a suitable soluble salt form of the compound, for example the hydrochloride salt, can be dissolved and administered in a pharmaceutical diluent such as Water-for-Injection (WFI), physiological saline or 5% glucose. A suitable insoluble form of the crystalline or crystal-like lipopeptide also may be prepared and administered as a suspension in an aqueous base or a pharmaceutically acceptable oil base, e.g., an ester of a long chain fatty acid such as ethyl oleate.
- Injectable depot forms may be made by forming microencapsulated matrices of the crystalline or crystal-like lipopeptide in biodegradable polymers such as polylactide-polyglycolide. Depending upon the ratio of drug to polymer and the nature of the particular polymer employed, the rate of drug release can be controlled. Examples of other biodegradable polymers include poly(orthoesters) and poly(anhydrides). Depot injectable formulations are also prepared by entrapping the drug in microemulsions that are compatible with body tissues.
- For topical use the compounds of the present invention can also be prepared in suitable forms to be applied to the skin, or mucus membranes of the nose and throat, and can take the form of creams, ointments, liquid sprays or inhalants, lozenges, or throat paints. Such topical formulations further can include chemical compounds such as

WO 02/059145

PCT/US01/48886

dimethylsulfoxide (DMSO) to facilitate surface penetration of the active ingredient. For topical preparations, a sterile formulation comprising a crystalline or crystal-like lipopeptide, such as crystalline or crystal-like daptomycin, a suitable salt form thereof, may be administered in a cream, ointment, spray or other topical dressing. Topical 5 preparations may also be in the form of bandages that have been impregnated with a lipopeptide composition.

For application to the eyes or ears, the compounds of the present invention can be presented in liquid or semi-liquid form formulated in hydrophobic or hydrophilic bases as ointments, creams, lotions, paints or powders.

10 For rectal administration the compounds of the present invention can be administered in the form of suppositories admixed with conventional carriers such as cocoa butter, wax or other glyceride.

15 For aerosol preparations, a sterile formulation of a crystalline or crystal-like lipopeptide or a salt form of the compound may be used in inhalers, such as metered dose inhalers, and nebulizers. Aerosolized forms may be especially useful for treating respiratory infections, such as pneumonia and sinus-based infections.

20 Alternatively, the compounds of the present invention can be in powder crystalline or crystal-like form for reconstitution in the appropriate pharmaceutically acceptable carrier at the time of delivery. In another embodiment, the unit dosage form of the compound can be a solution of the compound or a salt thereof in a suitable diluent in sterile, hermetically sealed ampules. The concentration of the compound in the unit dosage may vary, e.g. from about 1 percent to about 50 percent, depending on the compound used and its solubility and the dose desired by the physician. If the compositions contain dosage units, each dosage unit preferably contains approximately 25 from 10-5000 mg of the active material, more preferably 50 to 1000 mg, and even more preferably 100 to 500 mg. For adult human treatment, the dosage employed preferably ranges from 100 mg to 3 g, per day, depending on the route and frequency of administration.

25 In a further aspect, this invention provides a method for treating an infection caused by a gram-positive bacteria in a subject. In a preferred embodiment, the method may be used to treat an infection caused by a gram-positive bacteria. The term "treating" is defined as administering, to a subject, a therapeutically-effective amount of a compound of the invention, both to prevent the occurrence of an infection and to control

WO 02/059145

PCT/US01/48886

- or eliminate an infection, e.g., an established infection. The term "subject", as described herein, is defined as a mammal, a plant or a cell culture. As used herein, the phrase "therapeutically-effective amount" means an amount of daptomycin, daptomycin-related lipopeptide or other antibacterial lipopeptide according to the present invention that prevents the onset, alleviates the symptoms, or stops the progression of a bacterial infection. In a preferred embodiment, a subject is a human or other animal patient in need of lipopeptide treatment. An established infection may be one that is acute or chronic. An effective dose is generally between about 0.1 and about 75 mg/kg crystalline or crystal-like lipopeptide, such as crystalline or crystal-like daptomycin or daptomycin-related lipopeptide, or a pharmaceutically acceptable salt thereof. A preferred dose is from about 1 to about 25 mg/kg of crystalline or crystal-like daptomycin or daptomycin-related lipopeptide or a pharmaceutically acceptable salt thereof. A more preferred dose is from about 1 to 12 mg/kg crystalline or crystal-like daptomycin, a crystalline or crystal-like daptomycin-related lipopeptide or a pharmaceutically acceptable salt thereof. An even more preferred dose is about 3 to 8 mg/kg crystalline or crystal-like daptomycin or daptomycin-related lipopeptide or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Exemplary procedures for delivering an antibacterial agent are described in U.S. Patent No. 5,041,567, issued to Rogers and in International PCT Publication WO 95/05384, the entire contents of which documents are incorporated in their entirety herein by reference.
- The crystalline or crystal-like lipopeptide, e.g., daptomycin, can be administered as a single daily dose or in multiple doses per day. The treatment regime may require administration over extended periods of time, e.g., for several days or for from two to four weeks. The amount per administered dose or the total amount administered will depend on such factors as the nature and severity of the infection, the age and general health of the patient, the tolerance of the patient to the lipopeptide and the microorganism or microorganisms involved in the infection. A method of administration is disclosed in WO 00/18419, published April 6, 2000, herein incorporated by reference.
- The methods of the present invention comprise administering a compound of the invention, or a pharmaceutical composition thereof to a patient in need thereof in an amount that is efficacious in reducing or eliminating the gram-positive bacterial infection. The lipopeptide may be administered orally, parenterally, by inhalation, topically, rectally, nasally, buccally, vaginally, or by an implanted reservoir, external pump or catheter. The lipopeptide may be prepared for ophthalmic or aerosolized uses.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

Compounds of the invention, or pharmaceutical compositions thereof also may be directly injected or administered into an abscess, ventricle or joint. Parenteral administration includes subcutaneous, intravenous, intramuscular, intra-articular, intra-synovial, cisternal, intrathecal, intrahepatic, intralesional and intracranial injection or infusion. In a 5 preferred embodiment, crystalline or crystal-like daptomycin, daptomycin-related lipopeptide or other lipopeptide is administered intravenously, subcutaneously or orally.

The method of the instant invention may be used to treat a patient having a bacterial infection in which the infection is caused or exacerbated by any type of gram-positive bacteria. In a preferred embodiment, crystalline or crystal-like daptomycin, 10 daptomycin-related lipopeptide or other lipopeptide, or pharmaceutical compositions thereof, are administered to a patient according to the methods of this invention. In another embodiment, the bacterial infection may be caused or exacerbated by bacteria including, but not limited to, methicillin-susceptible and methicillin-resistant staphylococci (including *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, 15 *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, and coagulase-negative staphylococci), glycopeptide intermediary-susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA), penicillin-susceptible and penicillin-resistant streptococci (including *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus lactis*, 20 *Streptococcus sangius* and *Streptococci Group C*, *Streptococci Group G* and viridans streptococci), enterococci (including vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant strains such as *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*), *Clostridium difficile*, *Clostridium clostridiiforme*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium ramosum*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium jeikeium*, 25 *Bifidobacterium spp.*, *Eubacterium aerofaciens*, *Eubacterium lenthum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Peptostreptococcus magnus*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus productus*, *Propionibacterium acnes*, 30 and *Actinomyces spp.*

The antibacterial activity of daptomycin against classically "resistant" strains is comparable to that against classically "susceptible" strains in *in vitro* experiments. In addition, the minimum inhibitory concentration (MIC) value for daptomycin against

WO 02/059145

PCT/US01/48886

susceptible strains is typically 4-fold lower than that of vancomycin. Thus, in a preferred embodiment, a compound of the invention, or a pharmaceutical composition of any one of these crystalline or crystal-like lipopeptides, is administered according to the methods of this invention to a patient who exhibits a bacterial infection that is resistant to other antibiotics, including vancomycin. In addition, unlike glycopeptide antibiotics, daptomycin exhibits rapid, concentration-dependent bactericidal activity against gram-positive organisms. Thus, in a preferred embodiment, compounds of the invention, or a pharmaceutical composition of any one of these crystalline or crystal-like lipopeptides, is administered according to the methods of this invention to a patient in need of rapidly acting antibiotic therapy.

The method of the instant invention may be used for a gram-positive bacterial infection of any organ or tissue in the body. These organs or tissue include, without limitation, skeletal muscle, skin, bloodstream, kidneys, heart, lung and bone. The method of the invention may be used to treat, without limitation, skin and soft tissue infections, bacteremia and urinary tract infections. The method of the invention may be used to treat community acquired respiratory infections, including, without limitation, otitis media, sinusitis, chronic bronchitis and pneumonia, including pneumonia caused by drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* or *Haemophilus influenzae*. The method of the invention also may be used to treat mixed infections that comprise different types of gram-positive bacteria, including aerobic, caprophilic or anaerobic bacteria. These types of infections include intra-abdominal infections, pneumonia, bone and joint infections and obstetrical/gynecological infections. The method of the invention also may be used to treat an infection including, without limitation, endocarditis, nephritis, septic arthritis and osteomyelitis. In a preferred embodiment, any of the above-described diseases may be treated using crystalline or crystal-like daptomycin, daptomycin-related lipopeptide, antibacterial lipopeptide, or pharmaceutical compositions of any one of these crystalline or crystal-like lipopeptides.

Crystalline or crystal-like daptomycin, daptomycin-related lipopeptide or other lipopeptide may also be administered in the diet or feed of a patient or animal. If administered as part of a total dietary intake, the amount of daptomycin or other lipopeptide can be less than 1% by weight of the diet and preferably no more than 0.5% by weight. The diet for animals can be normal foodstuffs to which daptomycin or other lipopeptide can be added or it can be added to a premix.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

- The method of the instant invention may also be practiced while concurrently administering another form of daptomycin or other lipopeptide antibiotic, e.g., one that is not crystalline or crystal-like, or with one or more antifungal agents and/or one or more antibiotics other than crystalline or crystal-like daptomycin or other crystalline or crystal-like lipopeptide antibiotics. Co-administration of an antifungal agent and an antibiotic other than crystalline or crystal-like daptomycin or another lipopeptide antibiotic may be useful for mixed infections such as those caused by different types of gram-positive bacteria, or those that caused by both bacteria and fungus. Furthermore, crystalline or crystal-like daptomycin or other lipopeptide antibiotic may improve the toxicity profile of one or more co-administered antibiotics. It has been shown that administration of daptomycin and an aminoglycoside may ameliorate renal toxicity caused by the aminoglycoside. In a preferred embodiment, an antibiotic and/or antifungal agent may be administered concurrently with a compound of this invention, or in a pharmaceutical composition comprising a compound of this invention.
- Antibacterial agents and classes thereof that may be co administered with a compound of the present invention include, without limitation, penicillins and related drugs, carbapenems, cephalosporins and related drugs, aminoglycosides, bacitracin, gramicidin, mupirocin, chloramphenicol, thiamphenicol, fusidate sodium, lincomycin, clindamycin, macrolides, novobiocin, polymyxins, rifamycins, spectinomycin, tetracyclines, vancomycin, teicoplanin, streptogramins, anti-folate agents including sulfonamides, trimethoprim and its combinations and pyrimethamine, synthetic antibacterials including nitrofurans, methenamine mandelate and methenamine hippurate, nitroimidazoles, quinolones, fluoroquinolones, isoniazid, ethambutol, pyrazinamide, para-aminosalicylic acid (PAS), cycloserine, capreomycin, ethionamide, prothionamide, thiacetazone, viomycin, evernimycin, glycopeptide, glycylcycline, ketolides, oxazolidinone; imipenen, amikacin, netilmicin, fosfomycin, gentamicin, ceftiraxone, Ziracin, LY 333328, CL 331002, HMR 3647, Linezolid, Synercid, Aztreonam, and Metronidazole, Epioprim, OCA_983, GV_143253, Sanfetrinem sodium, CS_834, Biapenem, A_99058.1, A_165600, A_179796, KA 159, Dynemicin A, DX8739, DU 6681; Cefluprenam, ER 35786, Cefoselis, Sanfetrinem celexetil, HGP_31, Cefpirome, HMR_3647, RU_59863, Mersacidin, KP 736, Rifaflazil; Kosan, AM 1732, MEN 10700, Lenapenem, BO 2502A, NE_1530, PR 39, K130, OPC 20000, OPC 2045, Veneprim, PD 138312, PD 140248, CP 111905, Sulopenem, ritipenam acoxyl, RO_65_5788,

WO 02/059145

PCT/US01/48886

Cyclothalidine, Sch_40832, SEP_132613, micacocidin A, SB_275833, SR_15402, SUN A0026, TOC 39, carumonam, Cefozopran, Cefetamet pivoxil, and T 3811.

In a preferred embodiment, antibacterial agents that may be co administered with a compound according to this invention include, without limitation, imipenem, amikacin, 5 netilmicin, fosfomycin, gentamicin, ceftriaxone, teicoplanin, Ziracin, LY 333328, CL 331002, HMR 3647, Linezolid, Synercid, Aztreonam, and Metronidazole.

Antifungal agents that may be co administered with a compound according to this invention include, without limitation, Caspofungin, Voriconazole, Sertaconazole, 10 IB_367, FK_463, LY_303366, Sch_56592, Sitaflloxacin, DB_289 polyenes, such as Amphotericin, Nystatin, Primaricin; azoles, such as Fluconazole, Itraconazole, and 15 Ketoconazole; allylamines, such as Naftifine and Terbinafine; and anti-metabolites such as Flucytosine. Other antifungal agents include without limitation, those disclosed in Fostel et al., Drug Discovery Today 5:25_32 (2000), herein incorporated by reference. Fostel et al. disclose antifungal compounds including Corynebardin, Mer_WF3010, Fusacandins, Arlichitin/LL 15G256, Sordarin, Cispentacin, Azoxybacillin, Aureobasidin and Khafrfungin.

Compounds of this invention, or a pharmaceutical composition of any one or more of these crystalline or crystal-like lipopeptides, may be administered according to this method until the bacterial infection is eradicated or reduced. In one embodiment, the 20 crystalline or crystal-like lipopeptide is administered for a period of time from approximately 3 days to approximately 6 months. In a preferred embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is administered for 7 to 56 days. In a more preferred embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is administered for 7 to 28 days. In an even more preferred embodiment, the crystalline or crystal-like lipopeptide is 25 administered for 7 to 14 days. The crystalline or crystal-like lipopeptide may be administered for a longer or shorter time period if it is so desired. In a preferred embodiment, the lipopeptide is daptomycin or daptomycin-related lipopeptide.

In order that this invention may be more fully understood, the following examples are set forth. These examples are for the purpose of illustration only and are not to be construed as limiting the scope of the invention in any way.

EXAMPLE 1

35

WO 02/059145

PCT/US01/48886

Daptomycin was prepared by conventional techniques. The daptomycin preparation was a pale yellow amorphous powder, with a solubility at 25°C of greater than 1 g/mL in water and a solubility of 2.8 mg/mL in ethanol. The amorphous daptomycin preparation was hygroscopic and decomposed at 215°C.

- 5 The remaining examples describe crystallizing or precipitating lipopeptides in the presence or absence of an organic precipitant (e.g., PEG).

EXAMPLE 2

In a microbatch crystallization, 25 µL of a daptomycin stock (20 mg/mL in methanol) was sequentially mixed with 15 µL of reagent stock (200 mM calcium acetate, 0.1 M cacodylate (pH 6.5), 18% [w/v] PEG 8000 and 15 µL ethylene glycol) to give a solution that was 27.5% aqueous component, 45% methanol and 27.5% ethylene glycol. Urchin-like crystals were formed at a yield of 50% with a purity of 98% as measured by HPLC.

15

EXAMPLE 3

A daptomycin stock was prepared by dissolving 440 mg daptomycin in 1 mL of a buffer containing 25 mM sodium acetate (pH 5.0) and 5 mM CaCl₂. Crystallization was done by the vapor diffusion (hanging drop) method, in which 5 µL of the daptomycin stock was added to 5 µL of 0.1 M tri-sodium citrate dihydrate (pH 5.6), and 35% [v/v] tert-butanol in water to form a drop. The drop was suspended over a reservoir solution (0.1 M tri-sodium citrate dihydrate (pH 5.6), and 35% [v/v] tert-butanol in water) in an air-tight environment until crystallization occurred. This method yielded urchin-like daptomycin crystals. See, e.g., Fig. 2.

25

EXAMPLE 4

5 µL of a daptomycin stock prepared as in Example 3 was added to 5 µL of a solution containing 0.1 M sodium cacodylate (pH 6.5), 0.2 M calcium acetate and 9% [w/v] PEG 8000. Crystallization was done by the vapor diffusion method as described in Example 3. This method yielded needle-like daptomycin crystals. See, e.g., Fig. 3.

EXAMPLE 5

WO 02/059145

PCT/US01/48886

5 μ L of a daptomycin stock prepared as in Example 3 was added to 5 μ L of a solution of 0.1 M sodium cacodylate (pH 6.5), 0.2 M zinc acetate and 9% [w/v] PEG 8000 containing 0.1 μ L benzamidine to give a final concentration of 220 mg/mL daptomycin. Crystallization was done by the vapor diffusion method as described in

5 Example 3. This method yielded rod-like daptomycin crystals. See, e.g., Fig. 4.

EXAMPLE 6

One mL of daptomycin (97.1% pure as determined by HPLC) at a concentration of 20-25 mg/mL in water was sequentially mixed with 231 μ L water, 77 μ L of calcium acetate (pH 6.0), 960 μ L propylene glycol and 231 μ L of 50% [w/v] PEG 4000. The solution was allowed to sit for 4-5 hours at 4°C. Urchin-like crystals were formed at a yield of 75%. The crystalline daptomycin was washed with isopropanol. The daptomycin was 98.4% pure as determined by HPLC.

EXAMPLE 7

Daptomycin (200 mg, 97.1% pure) was dissolved in 2.54 mL water. The daptomycin solution was sequentially mixed in order with 10.0 mL methanol, 0.78 mL 1 M calcium acetate (pH 6.0), 9.50 mL propylene glycol and 2.20 mL 50% [w/v] PEG 4000 to give a final volume of 25.02 mL. The mixture was tumbled at room temperature for 20 10-14 hours in a hematology mixer (Fischer). Crystals began to appear within a few hours. Final yield was approximately 70-80% after 14 hours. The crystals were harvested by centrifugation at 1000 rpm for 15 minutes. The supernatant was removed and the crystals were resuspended in 12.5 mL isopropanol. The daptomycin suspension was transferred to a column (Biorad) and the isopropanol was removed by allowing it to drip by gravity. The crystals were dried by a nitrogen stream. Any lumps were broken up during the drying procedure to obtain a uniform dry sample. Crystals prepared by this method were urchin-like and had a purity of 98.37%.

EXAMPLE 8

30 Daptomycin was crystallized according to Example 7 except that PEG 8000 was used in replacement of PEG 4000. The quantities of reagents used are identical to those

WO 02/059145

PCT/US01/48886

in Example 7. Crystals prepared by this method were urchin-like and had a purity of 98.84%.

EXAMPLE 9

- 5 Two daptomycin samples prepared according to Example 7 and one amorphous sample were analyzed for crystallinity using the USP <695> crystallinity test. Daptomycin particles were mounted in mineral oil on a glass slide and then were examined by polarizing light microscope (PLM). The particles were determined to be crystalline if they were birefringent (have interference colors) and had extinction 10 positions when the stage was rotated.
- The amorphous daptomycin sample consisted of lacy, flaky particles that were not birefringent. There were a few sliver-like areas in some of the flakes that had weak birefringence, but the particles were primarily amorphous. In contrast, the daptomycin samples prepared according to Example 7 consisted of polycrystalline particles with weak 15 birefringence and some extinction, indicating that they were primarily crystalline. See Fig. 5.

EXAMPLE 10

- Two daptomycin samples prepared according to Example 7 and one amorphous 20 sample were analyzed for crystallinity by x-ray powder diffraction. The samples were analyzed on a Siemens D500 Automated Powder Diffractometer (ORS 1D No. LD-301-4), which was operated according to ORS Standard Operation Procedure EQ-27 Rev. 9. The diffractometer was equipped with a graphite monochromator and a Cu ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$) x-ray source operated at 50 KV, 40 mA. Two-theta (θ) calibration is performed using an 25 NBS mica standard (SRM675). The samples were analyzed using the following instrument parameters:

Measuring Range for 2θ (degrees)	4.0 - 40.0
Step Width (degrees)	0.05
Measuring Time per Step (secs)	1.2
Beam Slits	1(1°), 2(1°), 3(1°), 4(0.15°), 5(0.15°).

Sample preparation was performed according to ORS Standard Operation Procedure MIC-7 Rev. 1 using a zero background sample plate.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

All samples were done using a Cu ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$) x-ray source. The amorphous daptomycin sample did not show any peaks by x-ray powder diffraction. See Fig. 6. In contrast, the two daptomycin samples both showed peaks by x-ray powder diffraction. The diffraction angle (2θ) of the first daptomycin sample (Fig. 7) was 19.225, 23.242, 5 23.427 and 23.603 (degree). The diffraction angle (2θ) for the second daptomycin sample (Fig. 8) was 10.966, 19.205 and 23.344 (degree). The first crystalline daptomycin sample also showed a small peak between 10-11°. See Fig. 7.

EXAMPLE 11

10 Daptomycin was dissolved in water. Sodium acetate was added to achieve a final concentration of 187 mM. Calcium chloride was added to achieve a final concentration of 28 mM. The daptomycin solution was mixed and isopropanol was added to a final concentration of 78.4%. The solution was mixed and incubated. A precipitated material was formed after incubation. The precipitated material appeared to be urchin-like crystals 15 of approximately 60 μm diameter by optical microscopy. The material was then dried. The dry material contained approximately 30-40% salt. After drying, powder x-ray diffraction was performed. The powder x-ray diffraction did not show the presence of crystals in the dried daptomycin precipitate.

EXAMPLE 12

20 One gram of daptomycin (approximately 91.5% purity as measured by HPLC) was added to 16.8 mL of distilled water and dissolved. 2.5 mL of 1M calcium acetate (pH 6.1) and 60 mL of isopropanol was added. The solution was placed in a 27°C water bath and permitted to equilibrate to temperature of the water bath. 5 mL aliquots of 25 isopropanol were slowly added until the solution became cloudy (a total of approximately 30 mL isopropanol). The solution was incubated overnight at 27°C to form a precipitate. The precipitate appeared to contain urchin-like crystals of approximately 60 μm by optical microscopy. See Figure 2.

The daptomycin precipitate was poured into a pressure filter/drying funnel and 30 filtered by gravity. The precipitate was washed twice with 25 mL each time of a washing solution (80% isopropanol and 20% solution A where solution A consists of 18mL of water and 2mL of glacial acetic acid) and allowed to drip by gravity overnight. The

WO 02/059145

PCT/US01/48886

precipitate was then transferred to a desiccator and dried under vacuum. After drying, powder x-ray diffraction was performed. The powder x-ray diffraction did not show the presence of crystals in the dried daptomycin precipitate. However, purity analysis of the precipitated material by HPLC showed that the material was 98.2% pure daptomycin.

- 5 Significantly, the daptomycin preparation after precipitation has significantly less anhydro-daptomycin than the daptomycin preparation before precipitation.

Without wishing to be bound by any theory, applicants believe that the conditions used to precipitate the daptomycin in Examples 11 and 12 actually produce a crystalline form of daptomycin but that the subsequent washing steps and/or drying steps cause the 10 crystalline daptomycin to revert to a non-crystalline form. Nonetheless, the non-crystalline daptomycin is still crystal-like as shown in Figure 3 by the birefringence of a crystal sample in polarized light.

EXAMPLE 13

15 A fermentation culture of *S. roseosporus* NRRL Strain 15998 is conducted in a controlled decanoic acid feed fermentation at levels that optimize the production of the antibiotic while minimizing the production of contaminants. The residual decanoic acid feed is measured by gas chromatography and the target residual level is 10 ppm decanoic acid from the start of induction (approximately at hour 30) until harvest. Centrifugation 20 of the culture and subsequent analysis of the clarified broth are used to measure the production of daptomycin by HPLC. The harvest titer is typically between 1.0 and 3.0 grams per liter of fermentation broth.

The fermentation culture is harvested either by microfiltration using a Pall-Sep or equivalent microfiltration system, or by full commercial-scale centrifugation and depth 25 filter. The clarified broth is applied to an anion exchange resin, Mitsubishi FP-DA 13, washed with of 30 mM NaCl at pH 6.5 and eluted with of 300 mM NaCl at pH 6.0-6.5. Alternatively, the FP-DA 13 column is washed with of 30 mM NaCl at pH 6.5 and eluted with of 300 mM NaCl at pH 6.0-6.5. The pH is adjusted to 3.0-4.8 and the temperature is adjusted to 2-15°C. Under these conditions, daptomycin forms a micelle. The 30 micellar daptomycin solution is filtered-washed using a 10,000 NMW ultrafilter (AG Technology Corp. UF hollow fiber or equivalent) in any configuration. The daptomycin micelles are retained by the filter, but a large number of impurities are eliminated because

WO 02/059145

PCT/US01/48886

they pass through the 10,000 NMW filter. Ultrafiltration of daptomycin micelles increases daptomycin purity to approximately 80-90%.

The daptomycin preparation is then crystallized or precipitated under sterile conditions using one of the methods described above. In a preferred embodiment, the daptomycin is crystallized or precipitated according to the protocol described in Examples 7, 8 or 12 except that it can be scaled up for large preparation of daptomycin. The crystalline or crystal-like daptomycin is separated from the crystallization/precipitation solution by filtration, preferably by vacuum filtration. The crystalline or crystal-like daptomycin is washed with washing solution (see Example 3).
10 The crystalline or crystal-like daptomycin is then vacuum dried under sterile conditions using a 0.65 m³ Klein Hastelloy-B double cone vacuum dryer or equivalent apparatus. Vials are then filled with either 250 or 500 mg of dried crystalline daptomycin per vial. Figure 9 shows a flowchart of this manufacturing method.

15 **EXAMPLE 14**

Fermentation of *S. roseosporus*, microfiltration of the fermentation culture and anion exchange chromatography is performed as described in Example 13. The daptomycin preparation is approximately 35-40% pure at this point. After anion exchange chromatography, the daptomycin is crystallized or precipitated according to the protocol described in Example 13. The daptomycin is then washed and dried according to the protocol set forth in Example 13. The dried crystalline or crystal-like daptomycin is then used to fill sterile vials as described in Example 13. Figure 6 shows a flowchart of this manufacturing method.

25 **EXAMPLE 15**

Fermentation of *S. roseosporus* and microfiltration of the fermentation culture is performed as described in Example 13. After microfiltration, the fermentation culture is subjected to size exclusion ultrafiltration as described in Example 13. The daptomycin preparation is approximately 35-40% pure at this point. After ultrafiltration, the daptomycin is crystallized or precipitated according to the protocol described in Example 13. The daptomycin is then washed and dried according to the protocol set forth in Example 13. The dried crystalline or crystal-like daptomycin is then used to fill sterile

WO 02/059145

PCT/US01/48886

vials as described in Example 13. Figure 7 shows a flowchart of this manufacturing method.

EXAMPLE 16

5 Fermentation of *S. roseosporus* and microfiltration of the fermentation culture is performed as described in Example 13. The daptomycin preparation is 5-10% pure at this point. After microfiltration, the fermentation culture is crystallized or precipitated according to the protocol described in Example 13. The daptomycin is then washed and dried and used to fill sterile vials as described in Example 13. Figure 8 shows a flowchart
10 of this manufacturing method.

EXAMPLE 17

CB-131547 (see Figure x), a cyclic lipopeptide analog of daptomycin, was prepared via a semi-synthesis route from daptomycin. The CB-131547 was a pale yellow
15 amorphous powder, with a solubility at 25 °C of ~80 mg/mL in normal saline.
CB-131547 (60 mg, ~90% pure) is dissolved in 2.5 mL water. The CB-131547 solution is sequentially mixed in order with 5.0 mL methanol, 0.2 mL 1 M calcium acetate (pH 6.0), 2.5 mL propylene glycol, and 1.0 mL 50% (w/v) PEG 4000 to give a final volume of 11.2 mL. The solution is allowed to sit for 4 to 24 hours at 4 °C. CB-
20 131547 crystals are formed at a yield of ~70% with a purity ~98.0% as determined by HPLC.

EXAMPLE 18

CB-131547 (see Figure x), a cyclic lipopeptide analog of daptomycin, was prepared via a semi-synthesis route from daptomycin. The CB-131547 was a pale yellow
25 amorphous powder, with a solubility at 25 °C of ~80 mg/mL in normal saline.

CB-131547 (60 mg, ~90% pure) is dissolved in 2.5 mL water. 0.2 mL 1 M calcium acetate (pH 6.0) and 8 mL of isopropanol is added. The solution is allowed to
30 equilibrate at room temperature (25 °C) for 5 minutes. One mL aliquots of isopropanol are slowly added until the solution becomes cloudy. The solution is stored at room temperature overnight to form crystals.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference. Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

CLAIMS

1. A crystalline or crystal-like lipopeptide or a salt thereof, wherein the lipopeptide is selected from the group consisting of daptomycin, A54145 and a daptomycin-related lipopeptide.
5
2. The crystalline or crystal-like lipopeptide or salt thereof, according to claim 1, wherein the salt is a divalent calcium salt.
3. The crystalline or crystal-like lipopeptide antibiotic or salt thereof, according to claim 1, wherein the lipopeptide antibiotic is daptomycin.
10
4. The crystalline or crystal-like lipopeptide or salt thereof, according to claim 3, wherein the salt is a divalent calcium salt.
5. The crystalline daptomycin according to claim 3, wherein an x-ray diffraction pattern of the crystalline daptomycin, using a Cu ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$) x-ray source, has a diffraction angle (2θ) = 10.9, 19.2 and 23.3 (degree) or a diffraction angle (2θ) = 19.2, 23.2, 23.4 and 23.6 (degree).
15
6. The crystal-like lipopeptide according to claims 1-4, wherein crystal-like means the compound has crystalline characteristics by birefringence, but does not have crystalline characteristics by x-ray powder diffraction.
20
7. The crystalline or crystal-like daptomycin according to claim 3, wherein the crystalline or crystal-like daptomycin comprises urchin-like or a cluster of needles, needle-like, or rod-like crystals.
25
8. The crystalline or crystal-like daptomycin according to claim 3, wherein the crystalline daptomycin has a purity of at least 95%.
30
9. The crystalline or crystal-like daptomycin according to claim 3, wherein the crystalline daptomycin or salt thereof has a purity of at least 97%.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

10. The crystalline or crystal-like daptomycin according to claim 3, wherein the crystalline daptomycin or salt thereof contains no single impurity greater than 1%.

5 11. The crystalline or crystal-like daptomycin according to any one of claims 8-10, wherein the purity is measured by HPLC.

12. The crystalline or crystal-like lipopeptide according to claim 1, wherein a crystal of the lipopeptide is at least 5 µm.

10 13. The crystalline or crystal-like lipopeptide according to claim 12, wherein the crystal is at least 50 µm.

15 14. The crystalline or crystal-like lipopeptide according to either of claims 12 or 13, wherein the lipopeptide is daptomycin.

15 15. The crystalline lipopeptide according to claim 1, wherein the crystalline lipopeptide exhibits a higher stability than an amorphous form of the lipopeptide.

20 16. The crystalline lipopeptide according to claim 15, wherein the crystalline lipopeptide exhibits higher stability to heat, light, degradation or humidity than the amorphous form.

25 17. The crystalline lipopeptide according to claim 16, wherein the stability is measured by antibiotic activity or degradation of the lipopeptide antibiotic.

30 18. The crystalline lipopeptide according to claim 15, wherein the lipopeptide is daptomycin.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

19. The crystalline daptomycin according to claim 18, wherein the crystalline lipopeptide exhibits lower conversion to anhydro-daptomycin or the β -isomer of daptomycin than the amorphous form of daptomycin.

5 20. The crystalline lipopeptide according to claim 1, which is a daptomycin-related lipopeptide.

10 21. A pharmaceutical composition comprising a crystalline or crystal-like lipopeptide antibiotic and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the lipopeptide antibiotic is selected from the group consisting of daptomycin, A54145, and a daptomycin-related lipopeptide.

15 22. The pharmaceutical composition according to claim 21, wherein the crystalline or crystal-like lipopeptide is daptomycin.

23. The pharmaceutical composition according to claim 22, wherein the crystalline or crystal-like daptomycin is enterically coated for oral administration.

20 24. The pharmaceutical composition according to claim 22, wherein the crystalline or crystal-like daptomycin is formulated in a dose of 3 to 75 mg/kg.

25 25. The pharmaceutical composition according to claim 22, wherein the carrier enhances the oral availability of daptomycin.

26. The pharmaceutical composition according to claim 22, which is in the form of micronized particles or microspheres.

27. A container comprising the pharmaceutical composition according to claim 21.

28. The pharmaceutical composition according to claim 26, which is used as an aerosol.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

29. A formulation comprising a crystalline or crystal-like lipopeptide antibiotic and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the lipopeptide antibiotic is selected from the group consisting of daptomycin, A54145 and a daptomycin-related lipopeptide.

30. The formulation according to claim 29, which is a pharmaceutical formulation, a food formulation, a feed formulation, a veterinary formulation, a cosmetic formulation or a personal care formulation.

31. The formulation according to claim 29, that is a pharmaceutical formulation, wherein the formulation further comprises another antibiotic, a stabilizing agent, an agent to aid in absorption, a pH buffering agent or an inorganic salt.

32. The formulation according to claim 29 that is a feed formulation, wherein the formulation further comprises animal feed and may optionally comprise another antibiotic or vitamins.

33. The formulation according to claim 29, that is a personal care formulation, wherein the personal care formulation is a washing formulation, a soap, a shampoo or an antiperspirant.

34. The formulation according to claim 29, that is a veterinary formulation, wherein the formulation is a soap, a shampoo or a pharmaceutical composition.

35. A method for administering a crystalline or crystal-like lipopeptide, a pharmaceutically acceptable salt thereof or a pharmaceutical composition thereof, wherein the lipopeptide is selected from the group consisting of daptomycin, A54145 and a daptomycin-related lipopeptide, comprising the step of administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the

WO 02/059145

PCT/US01/48886

crystalline or crystal-like lipopeptide, the pharmaceutically acceptable salt thereof or the pharmaceutical composition thereof.

36. The method according to claim 35, wherein the lipopeptide antibiotic has a purity of greater than 95%.

5 37. The method according to claim 36, wherein the lipopeptide antibiotic is daptomycin.

10 38. The method according to claim 37, wherein the daptomycin is a crystalline daptomycin and an x-ray diffraction pattern of the crystalline daptomycin has a diffraction angle (2θ) = 10.9, 19.2 and 23.3 (degree) using a Cu ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$) x-ray source.

15 39. The method according to claim 37, wherein the daptomycin is a crystal-like daptomycin and the crystal-like daptomycin has crystalline characteristics by birefringence but does not have crystalline characteristics by x-ray powder diffraction.

20 40. The method according to claim 35, wherein the crystalline or crystal-like lipopeptide is administered as a micronized particle.

41. The method according to claim 35, wherein the crystalline or crystal-like lipopeptide is administered as a targeted release form.

25 42. The method according to either of claims 40 or 41, wherein the lipopeptide is daptomycin.

30 43. The method according to claim 35, wherein the oral administration is done subcutaneously, intravenously or intramuscularly.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

44. A method for storing a lipopeptide, wherein the lipopeptide is selected from the group consisting of daptomycin, A54145 and a daptomycin-related lipopeptide, comprising the steps of

- 5 a) providing a dissolved solution of a lipopeptide;
- b) crystallizing or precipitating the lipopeptide;
- c) collecting and drying the lipopeptide; and
- d) storing the lipopeptide;

wherein the crystalline or crystal-like lipopeptide is more stable than an amorphous form of the lipopeptide.

10

45. A method for manufacturing a crystalline or crystal-like lipopeptide, wherein the lipopeptide is selected from the group consisting of daptomycin, A54145 and a daptomycin-related lipopeptide, comprising the steps of

- 15 a) providing an amorphous form of a lipopeptide;
- b) crystallizing or precipitating the lipopeptide; and
- c) collecting the crystalline or crystal-like lipopeptide.

20

46. The method according to claim 44, wherein said collecting is performed by filtration.

47. The method according to claim 46, further comprising the step of washing the lipopeptide after step b).

25

48. The method according to either of claims 45 or 46, further comprising the step of drying the lipopeptide after step c).

49. The method according to claim 48, further comprising the step of sterilizing the lipopeptide after drying.

30

50. The method according to claim 45, wherein step c) is performed under sterile conditions.

WO 02/059145

PCT/US01/48886

51. The method according to claim 50, wherein step b) is performed under sterile conditions.

52. The method according to claim 51, further comprising the step of drying the lipopeptide after step c) under sterile conditions.

5

53. The method according to claim 44, wherein the purity of the crystalline lipopeptide is higher than the amorphous form of the lipopeptide.

10

54. The method according to claim 53, wherein the purity of the amorphous form is approximately 90% and the purity of the crystalline or crystal-like form is greater than 95%.

15

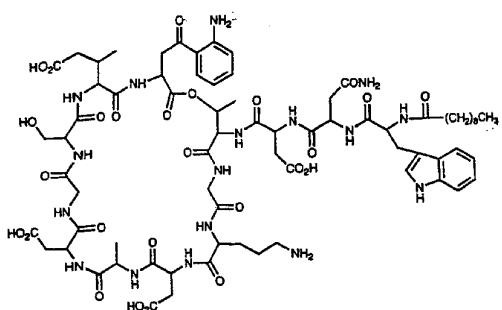
55. The method according to claim 53, wherein the purity of the amorphous form is approximately 93%, and the purity of the crystalline or crystal-like form is greater than 95%.

56. The method according to claim 53, wherein the purity of the amorphous form is approximately 93%, and the purity of the crystalline or crystal-like form is approximately 98%.

20

WO 02/059145

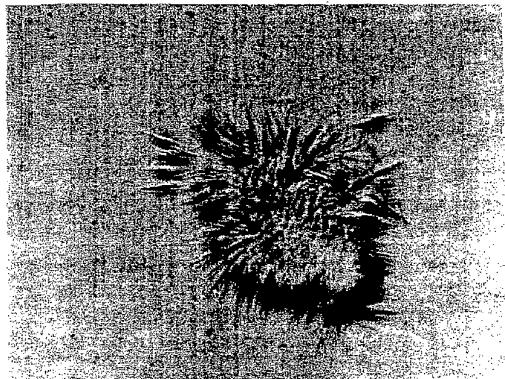
PCT/US01/48886

Figure 1

WO 02/059145

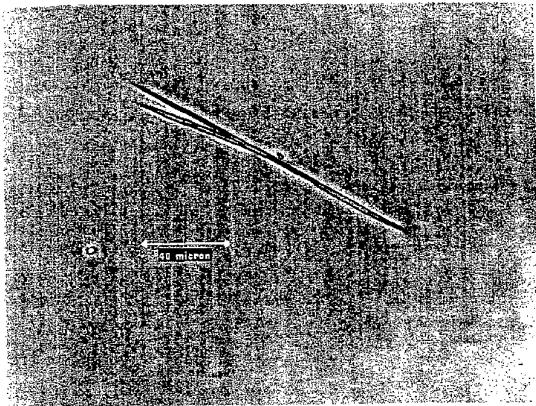
PCT/US01/48886

Figure 2



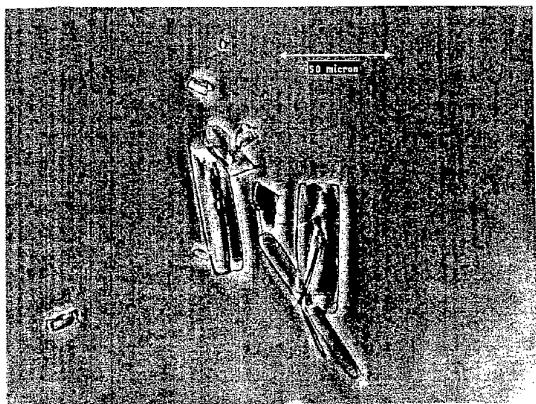
WO 02/059145

PCT/US01/48886

Figure 3

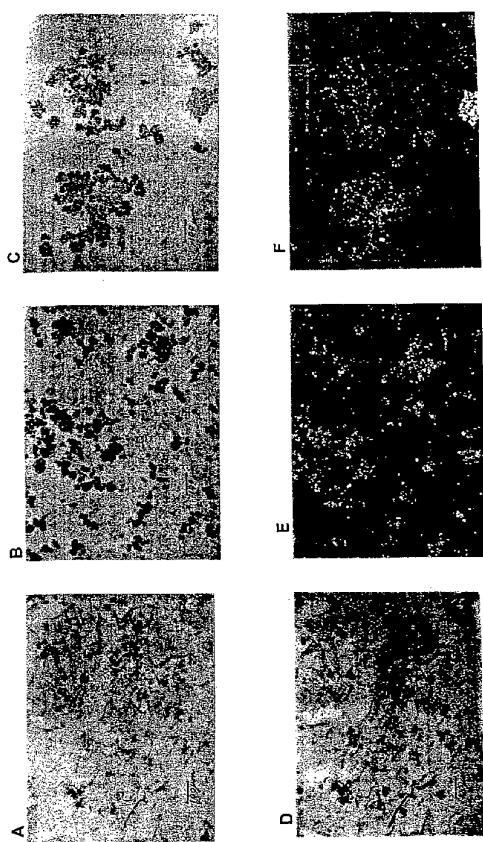
WO 02/059145

PCT/US01/48886

Figure 4

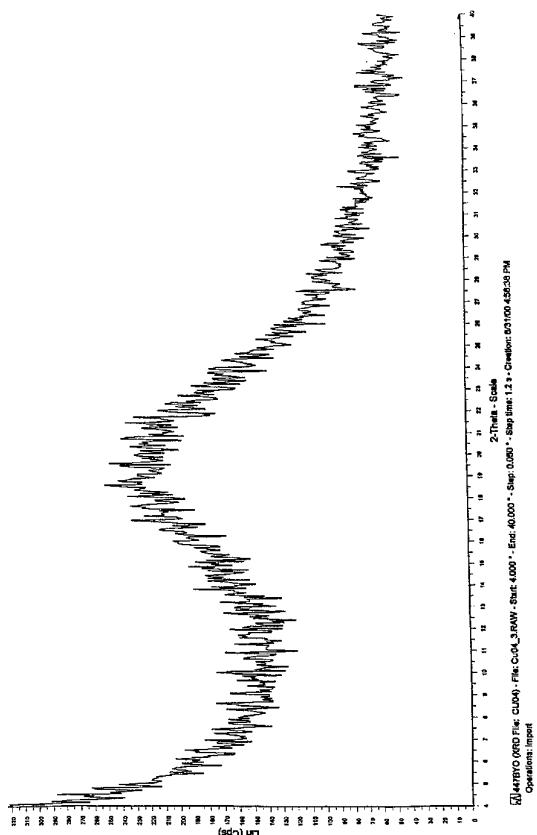
WO 02/059145

PCT/US01/48886

Figure 5

WO 02/059145

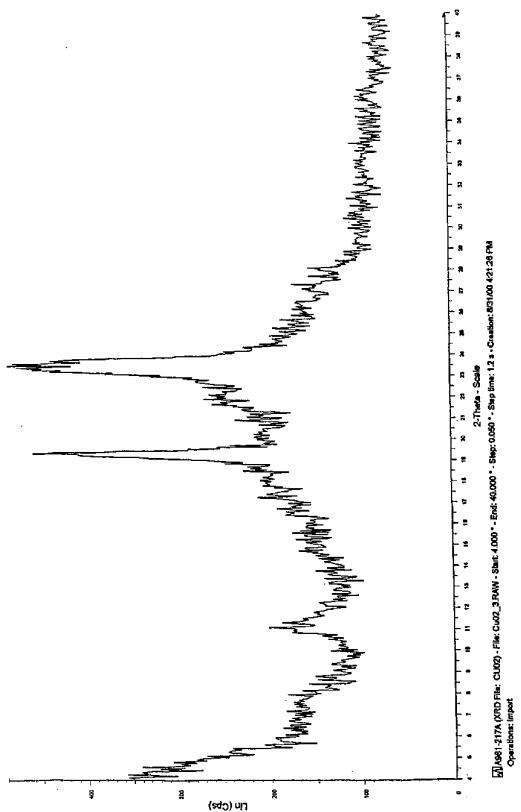
PCT/US01/48886

Figure 6

WO 02/059145

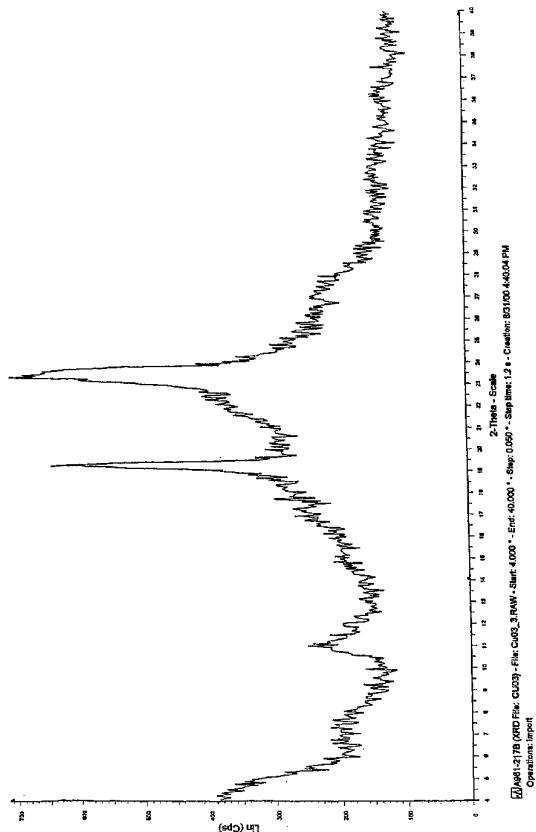
PCT/US01/48886

Figure 7



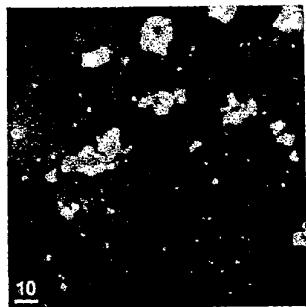
WO 02/059145

PCT/US01/48886

Figure 8

WO 02/059145

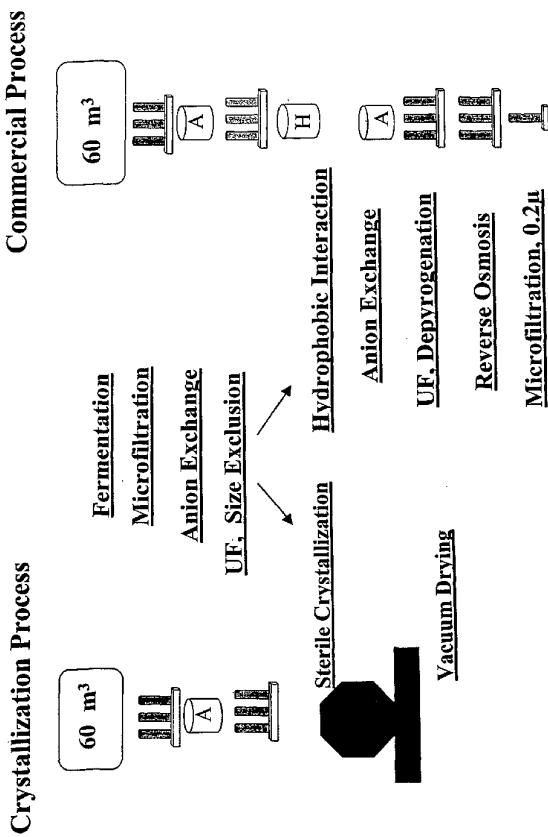
PCT/US01/48886

Figure 9

WO 02/059145

PCT/US01/48886

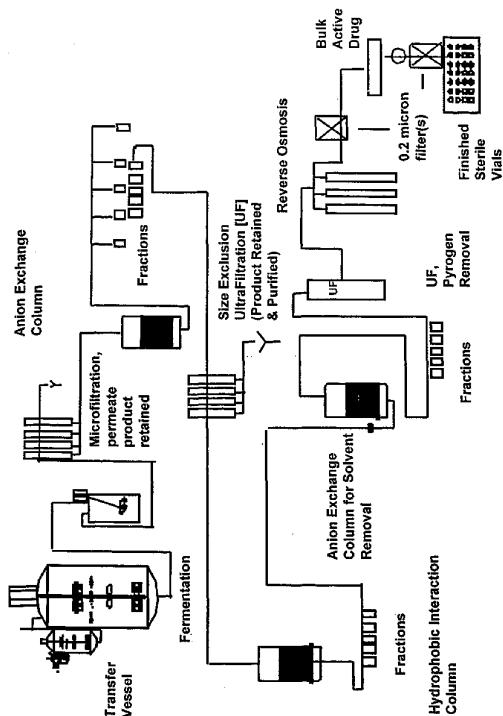
Figure 10



WO 02/059145

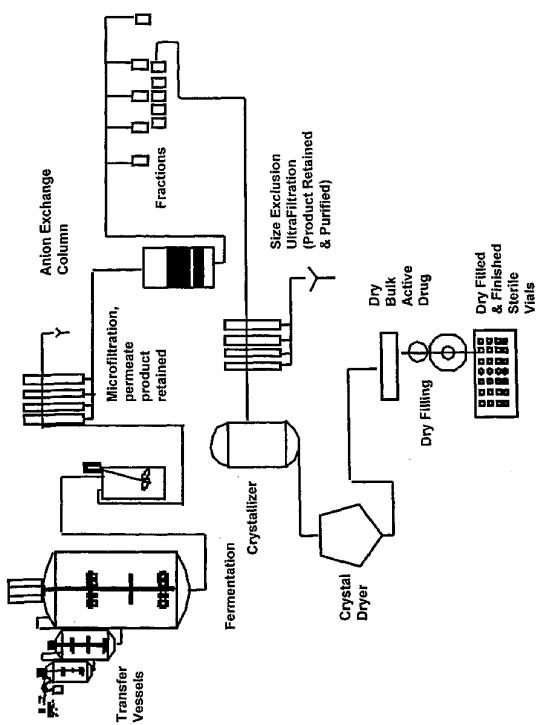
PCT/US01/48886

Figure 11



WO 02/059145

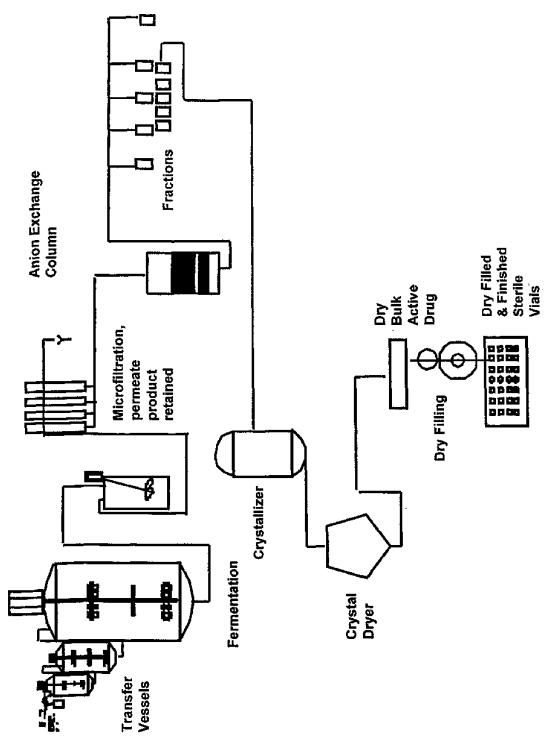
PCT/US01/48886

Figure 12

WO 02/059145

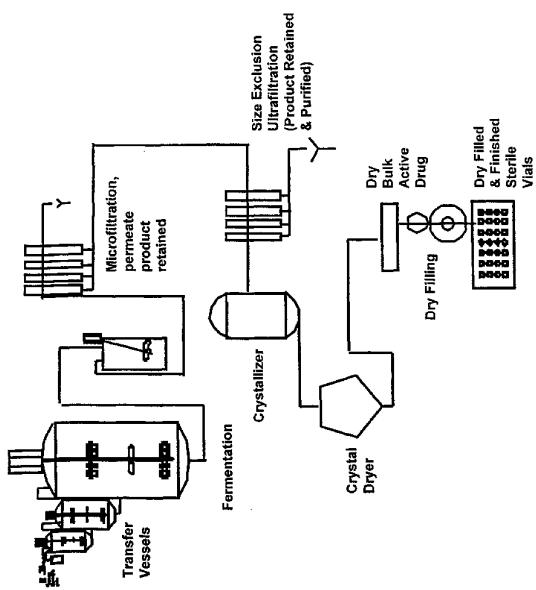
PCT/US01/48886

Figure 13



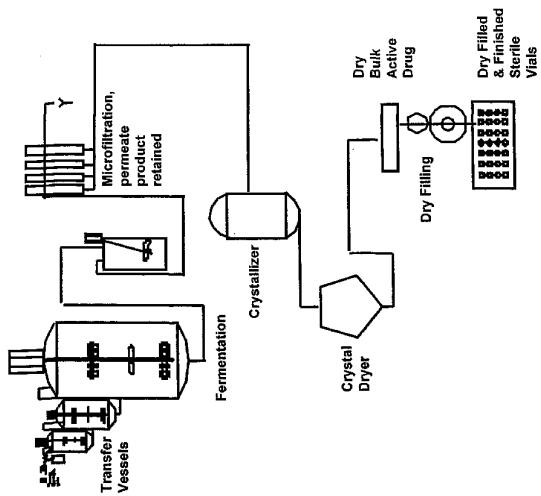
WO 02/059145

PCT/US01/48886

Figure 14

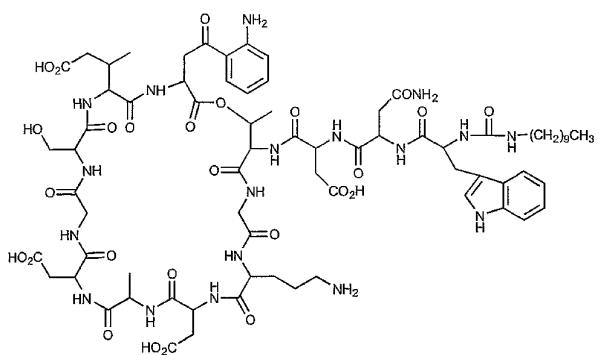
WO 02/059145

PCT/US01/48886

Figure 15

WO 02/059145

PCT/US01/48886

Figure 16

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/48886
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) :C07K 7/64, 19/58 US CL :514/0, 11; 550/517, 521 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : NONE		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched None		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, MEDLINE, WPIDS, EAST, WEST search terms: crystal, crystallization, daptomycin, A61P45, A-21978C		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 386 951 A2 (ELI LILLY AND COMPANY) 09 December 1990, see entire document.	1-5, 7-56
A	US 4,537,717 A (ABBOT et al.) 27 August 1985, see entire document.	1-5, 7-56
A	US 5,039,789 A (FUKUDA et al.) 13 August 1991, see entire document.	1-5, 7-56
A	US 4,994,270 A (BOECK et al.) 19 February 1991, see entire document.	1-5, 7-56
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited solely for the publication date of another citation or other special reasons (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 25 JUNE 2002		Date of mailing of the international search report 11 JUL 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-8280		Authorized officer AMIT GUPTA Telephone No. (703)-308-0196 

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/48886				
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)						
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:						
<p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 6 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>						
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)						
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:						
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>						
Remark on Protest <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.					
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.					

Form PCT/ISA/910 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)*

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 9/14	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	C 0 7 K 1/14	Z N A
C 0 7 K 1/14	C 0 7 K 7/54	
C 0 7 K 7/54	C 1 2 P 21/04	
C 1 2 P 21/04	A 6 1 K 37/02	

(31)優先権主張番号 60/341,315

(32)優先日 平成13年12月13日(2001.12.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 キース , デニス

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 9 4 2 モントクレアーメンドルテラス 8

(72)発明者 レイ , ジャン - ジ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 5 8 1 ウエストボロー ロイ ストリート 5

F ターム(参考) 4B064 AG01 CA04 CE15 DA02

4C076 AA11	AA16	AA31	BB01	BB13	BB15	BB16	CC32	FF25
4C083 AD411	BB48	CC17	CC22	CC38				
4C084 AA02	AA07	BA01	BA18	BA24	BA36	CA04	MA13	MA41 MA52
MA66	NA14	ZB35						
4H045 AA10	AA20	AA30	BA10	BA16	BA33	BA55	CA11	EA29 FA73
GA05	GA40	GA45						