



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년08월10일
(11) 등록번호 10-1173310
(24) 등록일자 2012년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/14 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7008951
(22) 출원일자(국제) 2003년11월14일
심사청구일자 2008년11월14일
(85) 번역문제출일자 2005년05월18일
(65) 공개번호 10-2005-0094396
(43) 공개일자 2005년09월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/036127
(87) 국제공개번호 WO 2004/045636
국제공개일자 2004년06월03일
(30) 우선권주장
60/427,654 2002년11월18일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌
US5750509 A

전체 청구항 수 : 총 10 항

(73) 특허권자
비큐론 파마세티컬스 인코포레이티드
미국 10017 뉴욕주 뉴욕 이스트 42번 스트리트
235
(72) 발명자
카발레리, 마르코
이탈리아 아이-21047 사론노 비아 지 페라리 9
헨켈, 티모시
미국 19312 펜실베이니아주 베르윈 심리 드라이브
1113
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영, 장수길

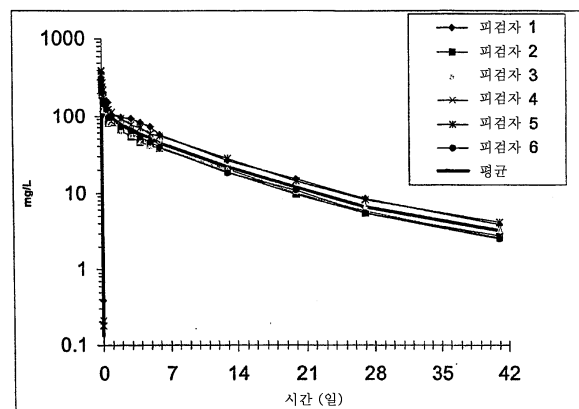
심사관 : 송건형

(54) 발명의 명칭 박테리아 감염 치료를 위한 달바반신 투여 방법

(57) 요약

본 발명은 박테리아 감염의 치료를 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법은 박테리아 감염, 특히 피부 및 연조직의 그람-양성 박테리아 감염의 치료를 위한 달바반신의 투여를 포함한다. 투약 투여계획은 달바반신의 주 당 1회를 포함하며, 이는 흔히 1 주일 이상 동안 혈류에 치료 농도를 유지하여 박테리아 감염에 대한 지속적인 치료 활성을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

자베스, 다니엘라

이탈리아 아이-22070 카시나 리자르디 비아 볼타 4

말라바르바, 아드리아노

이탈리아 아이-20082 부치나스코 비아 로마 5

모스코니, 조르지오

미국 19355 펜실베이니아주 말버른 란캐스터 애버뉴
쿠르만커뮤니티 우드뷰 아파트먼트 3307

스토그뉴, 마르틴

미국 19422 펜실베이니아주 블루 벨 페르구손 레인
1870

화이트, 리차드, 제이.

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 6363 크리스티
애버뉴아파트먼트 1917

(30) 우선권주장

60/485,694 2003년07월08일 미국(US)

60/495,048 2003년08월13일 미국(US)

60/496,483 2003년08월19일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

달바반신(dalbavancin) 요소 B₀, MAG 및 안정화 물질로서의 당을 포함하고, 상기 요소 B₀의 함량은 존재하는 모든 달바반신 성분의 75 몰% 이상이고, 상기 MAG의 함량은 존재하는 모든 달바반신 성분의 4 몰%를 초과하지 않는, 박테리아 감염 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 안정화 물질이 만니톨인 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 안정화 물질이 만니톨 및 락토오스의 혼합물인 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 요소 B₀의 함량이 존재하는 모든 달바반신 성분의 80 몰% 이상인 제약 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 MAG의 함량이 존재하는 모든 달바반신 성분의 3.5 몰%를 초과하지 않는 제약 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 MAG의 함량이 존재하는 모든 달바반신 성분의 3 몰%를 초과하지 않는 제약 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 MAG의 함량이 존재하는 모든 달바반신 성분의 2 몰%를 초과하지 않는 제약 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 MAG의 함량이 존재하는 모든 달바반신 성분의 1 몰%를 초과하지 않는 제약 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 MAG의 함량이 존재하는 모든 달바반신 성분의 0.5 몰%를 초과하지 않는 제약 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 달바반신 요소 A₀, A₁, B₁, C₀ 및 C₁으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 달바반신 요소를 추가로 포함하는 제약 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 달바반신 조성물 및 박테리아 감염 치료 방법에서의 상기 조성물의 사용 방법에 관한 것이다.

[0002] 관련 출원의 교차-참조문헌

[0003] 본 출원은 2002년 11월 18일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 제60/427,654호, 2003년 7월 8일에 출원된 제60/485,694호, 2003년 8월 13일에 출원된 제60/495,048호, 및 2003년 8월 19일에 출원된 제60/496,483호의 우선권의 이익을 주장하며, 모든 개시는 그 전체가 본원에 참조문헌으로 삽입되어 있다.

배경기술

[0004] 미국 질병 조절 및 예방 센터 (U. S. Center for Disease Control and Prevention)에 따르면, 병원의 혈류 감염은 미국의 제1 사망 원인이다. 미국에서 매년 삽입되는 7백만개의 중심 정맥 카테터 (CVC) 중 대략 5 %가 1 회 이상의 혈류 감염 에피소드 (대략 연간 350,000회)와 관련되어 있다. 카테터-관련 혈류 감염은 박테리아가 정맥내 카테터를 통하여 혈류로 진입할 때 발생하며, 생명을 위협할 수 있다.

[0005] 피부 및 연조직 감염 (SSTIs)은 일반적인 의학적 상태이며, 종종 외상 또는 수술 과정의 결과이다. 건강한 피부상에서 발견되는 것을 포함하는 임의의 병원균도 감염을 야기할 수 있지만, 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 및 스트렙토코커스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*)은 심부 조직 감염 환자로부 터 가장 흔히 단리된다. 많은 SSTI는 심도에 있어서, 경증에서 중증도 (moderate)이며, 경구 항균제 및 국소 세정으로 성공적으로 치료가 가능하다. 반대로, 잠재적인 위험 인자 (예를 들어, 혈관 약화, 당뇨)를 갖는 환자에

서 자주 발생하는 보다 중증이거나 합병 감염 및(또는) 치료가 어렵거나 다중-내성 박테리아에 의하여 야기되는 감염은 강력한 정맥내 항균 치료 및 침습적인 수술적 변연절제술을 필요로 할 수 있다.

[0006] 스태필로코카이 (*Staphylococci*)는 임상적 치료적 문제점이고, 1960년대 초반 부터 더욱더 병원 감염과 관련되어 왔다. 코아글라아제-양성 중 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스 (MRSA)는 지역사회-획득 및 병원의 감염 둘다에서 오랫동안 문제점이었고, 몇몇 코아글라아제-음성 스태필로코카이는 특히 중환자실의 중환자 치료 시에 기회감염 인간 병원체로서 인식되었다. 임상적인 문제의 또다른 주요 원인은 세계 많은 부분의 페니실린-내성 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*) 균주의 단리가 증가하는 것이다.

[0007] 글리코펩티드 항생제 반코마이신 및 테이코플라닌은 다중-약물-내성 그램-양성 병원체, 특히 MRSA, 코아글라아제-음성 스태필로코카이 (CoNS), 및 엔테로코카이 (enterococci)에 의하여 야기되는 심각한 병원 감염에 있어서 사용되었다. 반코마이신 및 테이코플라닌은 MRSA에 의하여 야기되는 감염에 대하여 사용되었고, 최근까지 모든 단리물은 균일하게 감수성이었다. 그러나, 테이코플라닌 및 반코마이신에 중간 감수성 또는 내성인 스태필로코커스 아우레우스 균주의 단리가 빈도가 증가하며 보고되어 왔다. 내성 메카니즘에 기초하여 "VanA", "VanB" 또는 "VanC"로 구분되는 다수의 반코마이신-내성 균주가 보고되었다. 그러므로, 대안적인 치료 선택이 필요하다.

[0008] 테이코플라닌은 대부분의 그램-양성 박테리아에 대하여 적어도 반코마이신만큼 활성이며, 더 적은 유해 사례를 야기하는 것으로 나타난다. 두 형태의 치료는 완전한 회복을 내기 위하여 적어도 하루 1회 이상의 투약을 필요로 한다. 현재, 이러한 병원체 중 일부에 의하여 야기되는 심각한 감염에 대한 치료적 선택권은 매우 제한되어 있다. 반코마이신에 대한 그램-양성 병원체의 내성이 출현하면서, 매우 바람직한 증가된 유효성에 대한 잠재성을 갖는 신규한 항생제의 이용가능성이 생겼다.

[0009] 또한, 현재-이용가능한 치료법 보다 적은 빈도의 투약계획이 특히 비경구, 예를 들어 정맥내 또는 근육내 항생제 투여에 있어서 환자의 안락을 증진하기에 바람직할 것이다. 병원 입원은 가끔 비경구 수단에 의한 수일간의 항생제 투여에 대한 필요 때문에 요구되며, 외래 환자에게 있어서 보다 적은 빈도의 투약이 상기 치료를 가능하게 하기 때문에 이로울 것이다.

[0010] 보다 적은 빈도의 투약은 항생제 투약계획의 바람직한 특성이지만, 투여되는 항생제의 "적정약물 농도 (pharmaceutical window)", 즉 독성 프로파일의 치료받는 환자에게 심각한 유해 반응을 야기하여 위험에 처하게 하지 않고 투여될 다량의 단일 용량을 허용하기에 충분히 이용가능하여야 한다. 더욱이, 항생제가 적절한 적정약물 농도를 나타낼 때에도, 바람직한 투약 간격에 걸쳐 치료적 유효성을 유지하기 위하여 적절한 혈청 반감기를 나타낼 경우에만 보다 적은 빈도의 투약이 가능하다. 혈청 농도가 여전히 살균적으로 유효한 최저 (though) 농도에 도달할 때, 항생제의 혈청 반감기는 약물 생체내 수명 및 투여후 시간 둘다를 가리킨다. 제1 용량의 항생제의 투여 후의 시간에 걸친 혈청 최저 농도는, 생체내 항생제의 최소 살균 농도를 유지하기 위하여 추가의 용량이 투여되어야 할 때를 지시한다.

[0011] 상기의 관점에서, 매 5-7일 또는 그 이상마다 1회의 투약 간격으로 투여될 수 있는 1종 이상의 항생제 내성 박테리아 균주, 특히 MRSA에 대한 항생제 보유 활성은 상업적 가치가 있으며 당업계의 오랜 필요를 만족시킬 것이다.

[0012] 발명의 요약

[0013] 본 발명은 달바반신의 박테리아 감염의 치료 또는 예방을 위한 조성물, 방법 및 키트를 제공한다. 놀랍게도, 달바반신의 안정화된 제제는 생체내에서 항박테리아 성질을 유지하면서 매 5-7일 또는 그이상마다 약 1회의 치료 투약 계획을 가능하게 하는 연장된 혈청 반감기 및 적정약물 농도 둘다를 나타낸다고 발견되었다.

[0014] 따라서, 한 측면에서, 5일 또는 그이상 동안 개체에 달바반신의 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 혈장 농도를 제공하기에 충분한 양의 달바반신의 단위 용량, 안정제 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 제약 조성물은 일반적으로 개체에게 투여되기 위한 제약학상 허용되는 형태, 예를 들어 제약학상 허용되는 수성 제제로 제제화된다. 상기 제약 조성물은 바람직하게는 비경구, 예를 들어 정맥내 또는 근육내 경로로 투여된다. 따라서, 이 바람직한 실시태양에서 이러한 제약 조성물은 통상적으로 무균이다.

[0016] 일부 실시태양에서, 건조 분말 (예를 들어, 동결건조) 형태로 개체에게 투여하기 전에 제약학상 허용되는 담체, 예를 들어 무균 수성 제제중에서 재구성하는 달바반신의 단위 용량을 제공한다. 한 실시태양에서, 제약학상 허용되는 담체는 물 중의 5 % 텍스트로오스를 포함한다. 본 발명의 제약 조성물은 박테리아 감염의 치료 또는 예

방을 필요로 하는 포유동물, 예를 들어 인간에게 투여될 수 있다. 일부 실시태양에서, 제약 조성물은 달바반신이 아닌 1종 이상의 항생제, 예를 들어 그람-음성 박테리아에 유효한 (예를 들어, 살균) 항생제 및(또는) VanA 반코마이신-내성 박테리아 균주와 같은 달바반신이 유효하지 않은 그람-양성 종에 대하여 유효한 항생제를 포함할 수 있다.

[0017] 1종 이상의 안정화 물질이 건조 분말 (예를 들어, 동결건조) 제제로서 및(또는) 개체에게 투여되기 전에 수성 제제로서 보관 중에 1종 이상의 달바반신 성분의 분해를 억제하기 위하여 사용된다. 시간에 걸쳐서, 분해되면 생체내에서 잠재적으로 유해 효과를 유발할 수 있는 덜 활성이고(이거나) 불활성인 성분의 바람직하지 않은 형성을 야기할 수 있다. 바람직한 안정제는 비이온성 성분, 예를 들어 당 또는 당 알코올, 예를 들어 모노-, 디-, 또는 폴리사카라이드, 또는 그의 유도체, 예를 들어 만니톨, 락토오스, 수크로오스, 소르비톨, 글리세롤, 셀룰로오스, 트레할로오스, 말토오스, 또는 텍스트로오스, 또는 그의 혼합물을 포함한다.

[0018] 다른 측면에서, 5일 이상 동안 개체에서 달바반신의 치료적으로 유효한 혈장 농도를 제공하기에 충분한 양의 1 이상의 단위 용량의 달바반신 및 제약학상 허용되는 담체를 투여하는 것을 포함하는, 박테리아 감염의 치료를 필요로 하는 개체에서 박테리아 감염 치료를 위한 방법을 제공한다. 달바반신의 치료적으로 유효한 혈장 농도는 일반적으로 혈장 1 리터 당 약 4 mg 이상의 달바반신이다. 한 실시태양에서, 투여되는 달바반신의 투여량은 테이코플라닌 및 반코마이신과 같은 약물의 표준적 치료에 비교하여 임상적으로 유효하고 또한 유해 부작용을 감소시키는 양이다.

[0019] 달바반신은 단일 용량으로서 또는 다중 용량으로서 투여될 수 있다. 한 실시태양에서, 달바반신의 약 100 mg 내지 약 4000 mg, 예를 들어 3000 mg의 단일 용량을 투여한다. 다양한 실시태양에서, 단일 달바반신 용량은 약 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 또는 3 그램 이상을 포함할 수 있다.

[0020] 다른 실시태양에서, 2 회의 용량을 약 5 일 내지 약 10 일 간격, 예를 들어 1 주일 간격으로 투여한다. 제1 용량은 달바반신의 약 500 내지 약 5000 mg일 수 있고, 제2 용량은 달바반신 약 250 mg 내지 약 2500 mg일 수 있다. 제1 용량은 제2 용량에서 함유되는 달바반신의 양의 약 1.5 내지 약 3배, 흔히 약 2배 이상을 포함한다. 예를 들어, 제1 용량은 달바반신의 약 1000 mg일 수 있고, 제2 용량은 약 500 mg일 수 있다. 2회의 용량을 투여하는 방법에서, 제2 용량을 투여하기 전의 개체에서의 달바반신의 최저 혈장 농도는 혈장 1 리터 당 달바반신 일반적으로 약 4 mg 이상, 흔히 약 10 mg 이상, 흔히 약 20 mg 이상, 더욱 흔히 약 30 mg 이고, 보다 더욱 흔히 혈장 1 리터 당 달바반신 약 40 mg 이상이다.

[0021] 흔히, 본 발명의 방법은 비경구 투여, 예를 들어 정맥내 투여를 포함한다. 일부 실시태양에서, 약 30 분 이상에 걸쳐서 일어나도록 제어되는 투여 속도로 정맥내로 투여된다.

[0022] 본 발명의 방법은 그람-양성 박테리아 감염, 예를 들어 스태필로코커스 아우레우스 또는 스트렙토코커스 피오케네스 피부 및 연조직 감염을 치료하기 위하여 사용할 수 있다. 일부 실시태양에서, 감염은 페니실린-내성 및(또는) 다중-약물 내성이다.

[0023] 다른 실시태양에서, 적어도 약 1일, 3일, 5일, 1주일, 또는 10일 또는 그이상 동안 개체에게 예방적으로 유효한 혈장 농도의 달바반신을 제공하기에 충분한 양의 달바반신의 단위 용량 하나 이상, 및 제약학상 허용되는 담체를 투여하는 것을 포함하는 박테리아 감염의 예방 방법을 제공한다. 달바반신의 용량은 예를 들어 약 100 mg 내지 약 1000 mg일 수 있다. 일부 실시태양에서, 의료 과정 또는 병원 입원 전, 도중, 또는 이어서 투여한다.

[0024] 본 발명의 치료 또는 예방 방법은 달바반신이 아닌 1종 이상의 항생제, 바람직하게는 그람-음성 박테리아에 대하여 유효하지 않은 항생제 및(또는) 예를 들어 달바반신이 유효하지 않은 그람-양성 균주, 예를 들어 VanA 균주에 대하여 유효한 항생제를 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0025] 다른 측면에서, 개체에 약 5일 이상 동안 치료적으로 유효한 혈장 농도 또는 약 1일 이상 동안 예방적으로 유효한 달바반신의 혈장 농도를 제공하기에 충분한 양의 달바반신의 단위 용량 하나 이상, 및 박테리아 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 설명문을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 제1 용량이 제2 용량에 포함된 달바반신의 양의 1.5 내지 3배, 흔히 약 2배 이상인, 2 종의 단위 용량을 함유할 수 있다. 키트는 또한 바람직하게는 그람-음성 박테리아에 대하여 유효한 달바반신이 아닌 항생제를 포함할 수 있다.

[0026] 한 실시태양에서, 건조 분말 (예를 들어, 동결건조) 달바반신 조성물을 함유하는 제1 용기 및 달바반신 조성물과 혼합하는 소정량의 생리학상 허용되는 수용액을 함유하는 제2 용기를 포함하는 키트가 제공된다. 상기 용액은 바람직하게는 무균 수용액이다. 한 실시태양에서, 키트는 개체로 달바반신 조성물을 투여하기 위한 송달 수

단, 예를 들어 주사기 또는 정맥내 투여 수단을 포함한다.

발명의 상세한 설명

- [0040] 본 발명은 개선된 투여 투약계획 및 달바반신의 신규 조성물, 및 항생제-내성 박테리아 감염의 개선된 치료 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 매 5-7일 또는 그이상 마다 1회의 투약 계획으로 투여할 수 있는, MRSA와 같은 박테리아의 1종 이상의 항생제 내성 균주에 대한 활성을 갖는 달바반신 조성물을 제공한다.
- [0041] BI 397 또는 VER001과 같은 과학 문헌에도 언급되어 있는 달바반신은 반-합성 글리코펩티드 혼합물이고, 그 특성은 미국 특허 번호 제5,606,036호, 제5,750,509호, 제5,843,679호 및 제5,935,238호에서 보고되었다.
- [0042] 본원에 사용된 용어 "달바반신"은 1종 이상의, 바람직하게는 2종 이상의, 이하에서 기재되는 "A₀", "A₁", "B₀", "B₁", "C₀" 및 "C₁"로 지칭되는 근접하게 관련된 동족체를 포함하는 조성물, 또는 그의 단량체, 다중체 (즉, 이량체 또는 그 이상의 다중체), 호변이성질체, 에스테르, 용매화물, 또는 제약학상 허용되는 염을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "이량체" 또는 "다중체"는 호모이량체 또는 호모다중체, 즉 동일 달바반신 동족체의 단량체로 이루어진 이량체 또는 다중체, 또는 헤테로이량체 또는 헤테로다중체, 즉 2종 이상의 다른 달바반신 동족체의 단량체로 이루어진 이량체 또는 다중체를 지칭한다. 달바반신은 흔히 이하에서 기재되는 "MAG", 비-동족체 변형물을 포함한다. 별개로, 달바반신 동족체 및 MAG는 본원에서 간혹 "달바반신 성분"을 지칭한다.
- [0043] 달바반신은 문헌[Malabarba and Donadio (1999) Drugs of the Future 24 (8): 839-846]에 기재된 바와 같이 천연 글리코펩티드 복합체 A-40,926의 화학적 변형에 의하여 제조한다. 달바반신의 주요 성분은 전체 복합체의 75 %를 넘는 양의 요소 B₀ (Factor B₀)이다.
- [0044] 달바반신 조성물에 존재하는 성분 각각의 양은 예를 들어, 달바반신의 전구체인 천연 글리코펩티드 복합체 A-40926의 제조에 사용되는 발효 조건 (예를 들어, 미국 특허 번호 제5,843,679호 참조), 발효 브로쓰로부터 A-40926를 회수하는데 사용되는 조건, A-40926의 당 잔기의 카르복실기를 선택적으로 에스테르화하는데 사용되는 화학 반응, 펩티딜 카르복실기를 아미드화하는데 사용되는 조건, N-아실아미노글루쿠론산 작용의 카르복실기의 에스테르를 비누화하는데 사용되는 조건, 합성 혼합물로부터 달바반신을 회수하는데 사용되는 조건 등을 포함하는 각종 인자에 의하여 정해진다.
- [0045] 바람직한 실시태양에서, 달바반신 조성물은 약 80 내지 약 98 중량%의 B₀ 성분을 포함한다. 특히 바람직한 실시태양에서, 달바반신은 하기 양의 B₀을 포함한다.

표 1

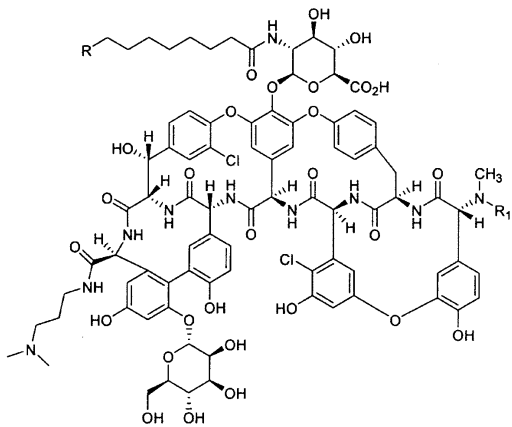
[0046] 달바반신 조성물 중의 B₀ 성분의 바람직한 양

| 바람직함 ¹ | 더욱 바람직함 ¹ | 더욱더 바람직함 ¹ |
|-------------------|----------------------|-----------------------|
| 80-98 | 80-97 | 80-96 |
| 81-98 | 81-97 | 81-96 |
| 82-98 | 82-97 | 82-96 |
| 83-98 | 83-97 | 83-96 |
| 84-98 | 84-97 | 84-96 |
| 85-98 | 85-97 | 85-96 |
| 86-98 | 86-97 | 86-96 |
| 87-98 | 87-97 | 87-96 |
| 88-98 | 88-97 | 88-96 |
| 89-98 | 89-97 | 89-96 |
| 90-98 | 90-97 | 90-96 |

[0047] ¹ 각각의 범위는 MAG를 포함하는 달바반신 조성물 중에 존재하는 전체 달바반신 성분에 대한 B₀의 몰%를 나타낸다.

[0048] 몇몇 달바반신 성분의 화학 구조를 하기 화학식 I에서 나타내었다.

화학식 I



[0049]

| 달바반신 성분 | R | 분자량 |
|----------------|--|--------|
| A ₀ | -CH(CH ₃) ₂ | 1802.7 |
| A ₁ | -CH ₂ CH ₂ CH ₃ | 1802.7 |
| B ₀ | -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ | 1816.7 |
| B ₁ | -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ | 1816.7 |
| C ₀ | -CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂ | 1830.7 |
| C ₁ | -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ | 1830.7 |

[0050]

[0051]

상기 모든 달바반신 성분은 다수의 그람-양성 박테리아에 대하여 살균적으로 활성이다. 그러나, 다른 성분 존재하는 아실글루코코나민 잔기가 없는 "MAG"로 지칭되는 비-동족체 달바반신 성분은 다른 달바반신 성분보다 생체내 및 시험관내 둘다에서 살균적으로 덜 유효하다. MAG는 1종 이상의 다른 달바반신 성분의 분해 생성물로 생각된다. 따라서, 바람직한 실시태양에서, 달바반신 중의 MAG의 양은 MAG를 포함하여 존재하는 모든 달바반신 성분의 약 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1 또는 0.5 몰% 미만이다.

[0052]

달바반신은 펩티도글리칸의 D-알라닌-D-알라닌-중결 전구체로의 결합에 의하여 박테리아 세포벽의 생합성을 억제한다고 생각된다. 달바반신의 이량체 또는 그 이상의 다중체는 친유성 측쇄의 박테리아의 세포막과의 상호작용에 의한 항박테리아 특성을 추가로 갖는다. 예를 들어, 문헌[Malabarba and Ciabatti, et al. (2001) Current Medicinal Chemistry 8: 1759-1773] 참조. 달바반신 다중체에 대한 추가의 상세한 설명은 본원에 그 전체가 참조문헌으로 삽입된 대리인 번호 34231-20052.00의 "박테리아 감염의 치료를 위한 달바반신 조성물 (DALVAVANCIN COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS)"의 미국 일련번호 10/___에서 찾을 수 있다.

[0053]

시험관내 비임상적 및 임상적 데이터는, 달바반신이 MRSA 및 CoNS, 및 반코마이신에 별로 감수성이지 않거나 내성인 VanB 및 VanC 표현형을 포함하는 모든 스트렙토코칼 및 비-VanA 엔테로코칼 종에 의하여 유발된 심각한 그람-양성 감염의 치료에 유익하다는 것을 나타낸다.

[0054]

달바반신은 테이코플라닌 및 반코마이신보다 스타필로코카이 (일부 테이코플라닌-내성 균주 포함)에 대하여 시험관내에서 더욱 활성이다. 달바반신은 테이코플라닌 또는 반코마이신보다 페니실린-내성 균주를 포함하는 스트렙토코카이에 대하여 우수한 활성을 갖는다. 달바반신은 약물 내성 균주를 포함하는 다수의 그람-양성 박테리아에 대하여 시험관내 및 생체내에서 활성이다.

[0055]

달바반신은 통상적으로 달바반신 조성물로서 개체에 투여된다. 본원에 사용된 용어 "달바반신 조성물" 또는 "달바반신 제제"는 조성물, 상기 언급한 바와 같이 통상적으로 달바반신 및 1종 이상의 다른 비-달바반신 성분, 예를 들어 제약학적 허용되는 담체, 안정제, 완충액, 또는 다른 유사 성분을 포함하는 제약 조성물을 지칭한다.

[0056]

실시예 1에서 나타난 바와 같이, 달바반신은 1주의 복용 간격에서 유효하다. 그러므로, 다른 치료 선택에 대한 달바반신의 장점은 주 1회 기초로 이 항생제를 투여할 수 있다는 것이며, 이로써 환자 순응도를 최대화하고, 비경구 항생제 투여의 필요성을 잠재적으로 최소화하거나 비경구 항생제 투여를 위한 병원 입원 기간을 감소시킨

다. 보다 적은 빈도의 투약은 흔히 외래-환자 기초의 치료를 가능하게 하여, 이로써 치료 비용을 감소시킨다. 실시예 1에서 추가로 나타난 바와 같이, 제1 용량의 투여 대략 1주 후의 달바반신의 제2 용량은 제1 용량의 대략 절반이고, 예기치 않게 치료 효능의 현저한 개선을 제공하게 된다.

[0057] 사용 방법

[0058] 박테리아 감염 치료를 필요로 하는 개체에게 달바반신의 투여 방법을 제공한다. 치료는 예방, 치료법, 또는 회복을 포함할 수 있다. 방법은 치료적 또는 예방적 유효량의 달바반신의 단위 용량 하나 이상의 투여를 포함한다.

[0059] 본원에 사용된 "치료적 유효량"은 바람직한 치료적 결과 (예를 들어, 박테리아 감염의 감소 또는 제거)를 가능하게 할 달바반신의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 1 이상의 용량으로 투여할 수 있다. "예방적 유효량"은 박테리아 감염에 감수성이고(이거나) 접촉할 수 있는 개체 (예를 들어, 의료 과정 또는 병원 입원, 또는 박테리아 감염이 있는 개체에 노출)에 투여할 때 미래의 박테리아 감염의 심도를 예방하거나 감소하기에 충분한 달바반신의 양을 지칭한다. 달바반신은 일반적으로 제약학상 허용되는 담체에 투여된다.

[0060] 달바반신은 흔히 물에 자유로이 용해되는 염산염으로서 제공된다.

[0061] 통상적으로, 달바반신은 개체에 투여될 때 수 일, 흔히 약 5일 이상, 1주일, 또는 10일 이상 동안 달바반신의 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 혈장 농도를 제공하기에 충분한 달바반신의 양을 포함하는 달바반신 제제의 "단위 용량"으로서 투여된다.

[0062] 본원에 사용된 "개체"는 척추동물, 통상적으로 포유동물, 흔히 인간을 지칭한다.

[0063] MAG가 다른 동족체보다 짧은 반감기를 갖는다고 생각되지만, 상기 언급한 달바반신의 모든 동족체는 혈장 중의 연장된 반감기, 흔히 9일 또는 그이상을 나타낸다. 긴 반감기는 반코마이신 또는 테이코플라닌보다 투약 사이의 간격이 길게 한다. 실시예 1에서 기재된 바와 같이, 달바반신의 주간의 투약은, 반코마이신에 흔히 사용되는 하루 2회 투약 계획 또는 테이코플라닌에 일반적으로 사용되는 하루 1회 계획에 대조적으로 박테리아 감염의 조절에 있어서 유효하다. 달바반신의 보다 적은 빈도의 투약은 특히 치료 투약계획에 대한 개선된 편의 및 환자 순응도에 있어서, 반코마이신 및 테이코플라닌에 대하여 현저한 치료 장점을 제공한다. 놀랍게도, 다른 가능한 치료 선택 보다 적은 빈도의 고용량 (즉, 놀라운 고농도 및 오래 지속되는 혈청 농도를 야기)을 투여할 수 있다. 보다 적은 빈도의 투약에 필요한 농도에서 달바반신은 생체내에서 최소 유효 효과를 나타내고, 넓은 적정 약물 농도를 나타내고, 또한 추가로 달바반신의 혈중 농도는 전체 치료 프로토콜에서 최소 살균 농도를 넘어서 유지되어 달바반신의 연장된 혈청 반감기를 나타내기 때문에 달바반신에 이용가능한 신규 용량 투약계획은 개선된 효과를 야기한다. 연장된 혈청 반감기와 함께 많은 적정약물 농도의 조합은 달바반신의 보다 적은 빈도의 투약을 가능하게 한다.

[0064] 또한, 달바반신은 바람직하게는 달바반신의 1종 이상의 성분의 분해를 억제하는 안정제와 제제화한다. 한 바람직한 실시태양에서, 달바반신은 만니톨:달바반신의 1:2 중량비로 제제화된다. 다른 바람직한 실시태양에서, 달바반신은 만니톨:락토오스:달바반신의 1:1:4 중량비로 제제화된다.

[0065] 일부 실시태양에서, 달바반신 제제는 수 일, 흔히 약 5 내지 약 10일 이상, 흔히 약 1주일 이상 동안 약물의 치료적으로 유효한 (즉, 살균) 혈장 농도를 유발하는 용량으로 투여된다. 일반적으로, 달바반신은 5일 이상 동안 약 4 mg/l의 최소 살균 농도로 또는 그보다 높은 농도로 혈장 중에 유지된다. 흔히, 달바반신은 5일 이상 동안, 흔히 약 1 주일 또는 그이상 동안 약 5 mg/l 이상, 흔히 약 10 mg/l 이상, 흔히 약 20 mg/l 이상, 흔히 약 30 mg/l 이상, 흔히 약 40 mg/l 이상의 혈장 농도를 유지한다. 달바반신의 혈장 농도는 당업계에 잘 알려진 방법, 예를 들어 액체 크로마토그래피, 질량 분석기 또는 미생물학적 생물분석법으로 측정할 수 있다. 혈장 중 달바반신의 정량 방법의 예를 실시예 5에서 제공하였다.

[0066] 달바반신 혈장 농도 수준의 상한은 일반적으로 치료될 환자 집단에서의 허용될 수 없는 유효 효과를 억제하는 용량에 의하여 정해진다.

[0067] 달바반신 조성물은 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 단일 용량으로서 투여될 때, 달바반신 조성물은 바람직하게는 5일 이상, 바람직하게는 7일 이상, 및 더욱 바람직하게는 10일 이상 생체내에서 항박테리아 특성을 나타내는 달바반신의 충분한 양을 함유하도록 제제화된다.

[0068] 다중 용량을 사용할 때, 달바반신은 2주 이상 동안 주 1회로 투여될 수 있다. 한 실시태양에서, 달바반신은 2 용량 이상으로, 흔히 약 5 내지 약 10일 간격으로 2 용량으로, 더욱 흔히 2주 동안 주 1회로 투여된다. 실시예

1에서 나타난 바와 같이, 상기 투약 계획은 종래의 항생제 치료 프로토콜을 넘는 현저한 장점을 제공한다.

- [0069] 달바반신 조성물은 또한 2일 이상 또는 1주일 이상 간격으로 또는 1회 이상의 격주 용량 (biweekly dose)으로 다중 용량으로 투여할 수 있다. 일부 실시태양에서, 달바반신 조성물은 주 1회 투여되고, 이어서 격주로 투여되고, 또는 월 1회 투여된다. 일부 실시태양에서, 2, 3, 4, 5, 6주 또는 그이상 동안 주 1회 간격으로 투여된다.
- [0070] 가장 이롭게, 보다 적은 빈도의 보다 고용량이 사용되기 때문에 매일의 투약이 필요하지 않다. 단일 또는 다중 용량은 예를 들어, 약 0.1 내지 약 5 그램의 범위일 수 있다. 약 0.1 내지 약 4 그램, 예를 들어, 약 3 그램의 단일 용량을 각종 감염 치료에 투여할 수 있다. 다중 용량 (예를 들어 주 1회)을 투여하는 경우, 각 용량은 예를 들어 약 0.25 내지 약 5.0 그램의 범위일 수 있다.
- [0071] 감염을 치료하기 위하여 단일 용량을 투여하는 실시태양에서, 용량은 예를 들어 약 0.1 내지 약 5 그램, 또는 약 0.5 내지 약 4 그램, 또는 약 1 내지 약 3.5 그램, 또는 약 2 내지 약 3 그램, 예를 들어, 약 3 그램일 수 있다. 일부 실시태양에서, 약 1, 1.5, 2, 2.5, 또는 3 그램의 단일 용량을 박테리아 감염 치료를 위하여 투여한다. 단일 용량을 예방을 위하여 투여하는 실시태양에서, 용량은 예를 들어, 약 0.1 내지 약 3 그램, 또는 약 0.1 내지 약 1 그램, 예를 들어 약 0.5 또는 약 0.25 그램일 수 있다.
- [0072] 다중 용량을 포함하는 투약 계획에서, 개별 용량은 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 실시태양에서, 제1의 보다 높은 용량을 투여하는데, 즉 예를 들면 1회 이상의 후속되는 용량의 약 1.5 내지 3배이다. 예를 들어, 제1 용량은 약 0.5 그램 내지 약 5 그램이고 제2 용량은 약 0.25 그램 내지 약 2.5 그램일 수 있거나, 제1 용량이 약 0.8 내지 약 2 g이고 제2 용량이 약 0.4 내지 약 1 그램일 수 있거나, 또는 제1 용량이 약 0.4 내지 약 3 g이고 제2 용량이 약 0.2 내지 1.5 g일 수 있다.
- [0073] 일부 실시태양에서, 제1 용량이 달바반신의 후속되는 용량의 약 2배를 포함하는 2회 이상의 용량을 투여한다. 한 실시태양에서, 제1 용량은 달바반신 약 1 그램을 포함하고, 후속 용량은 약 0.5 그램을 포함한다. 다른 실시태양에서, 제1 용량은 달바반신 약 0.5 그램을 포함하고, 후속 용량은 약 0.25 그램을 포함한다.
- [0074] 일부 실시태양에서, 달바반신 조성물을 동일하거나 다른 양의 2회 용량으로 2일 이상 또는 약 1주일 간격 이상으로 투여한다. 흔히 달바반신의 약 0.2 내지 약 1.5 그램의 2회 용량이 약 5 내지 약 10 일 간격, 더욱 흔히 약 1주일 간격으로 투여된다. 한 실시태양에서, 달바반신의 약 1 그램의 제1 용량 및 달바반신의 약 0.5 그램의 제2 용량을 약 1주일 간격으로 투여한다.
- [0075] 다중 투약 계획에서, 투여 사이의 시간은 예를 들어, 약 5 내지 약 10 일, 흔히 약 1주일 범위일 수 있다. 투여 빈도는 예를 들어 주 2회 용량 또는 주 다수회 용량일 수 있다. 투약 간격 또는 용량 사이의 시간은 예를 들어 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15일 또는 그이상일 수 있다. 주어진 투약의 수는 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6 용량 또는 그이상일 수 있고, 초기 용량 후의 각 용량은 선택된 투여 간격 후에 주어진다.
- [0076] 다중 투약 계획에서, 흔히 "최저 농도" 또는 달바반신의 제1 용량 후이고 제2 용량 투여 직전의 혈장 중의 달바반신의 농도는 약 4 mg/l 이상이다. 바람직하게는, 약 1주일과 같은 투약 간격 말기의 최저 농도는 약 20 mg/l 이상, 더욱 바람직하게는 약 30 mg/l 이상, 더욱더 바람직하게는 약 40 mg/l 이상이다.
- [0077] 달바반신은 비경구, 예를 들어 근육내 (i.m.), 정맥내 (i.v.), 피하 (s.c.), 복강내 (i.p.), 또는 수막내 (i.t.)로 투여할 수 있다. 투약 계획 및 실제 투여 용량은 감염의 특성 및 심도, 연령, 체중, 및 환자의 일반적 건강 및 특정 환자의 달바반신에 대한 내성과 같은 상기 인자들에 따라 다양할 수 있지만, 건강 전문가에 의하여 확정할 수 있을 것이다. 한 실시태양에서, 달바반신 1 그램 정맥내 투여 후 1주일 후에 0.5 그램 정맥내 투여가 후속된다.
- [0078] 예를 들어 정맥내로의 환자로의 약물의 투여 및 전달은 조절된 속도로 수행할 수 있어서, 혈중 농도는 너무 빠르게 증가하거나 침전이 일어나도록 하지 않는다. 일부 실시태양에서, 약물이 혈류 중에서 내재 단백질(들)과 복합체를 형성하도록 하는 적절한 속도로 투여된다. 특정 이론에 치우치지 않고, 인간 혈청 알부민과 같은 내재 단백질은 1 또는 2 분자의 달바반신 동족체 단량체와 생체내에서 복합체를 형성할 수 있다. 달바반신 충분한 양이 존재할 때, 2 몰 이하의 달바반신 동족체가 내재 단백질에 결합할 것이고, 이 복합체는 2개의 다른 결합 부위에서 달바반신의 별개의 동족체 분자의 결합에 의하여 형성된다고 믿어진다. 다르게는, 이량체 달바반신이 내재 단백질 상의 단일 결합 부위로의 결합되는 것이 가능하다. 앞서 설명한 달바반신-내재 단백질 복합체에 대한 추가의 상세한 설명은, 본원에 그 전체가 참조문헌으로 삽입된 대리인 번호 제34231-20053.00호로 현재 출

원된, 제목 "단백질-달바반신 복합체로 박테리아 감염을 치료하는 조성물 및 방법(COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING BACTERIAL INFECTIONS WITH PROTEIN-DALBAVANCIN COMPLEXES)"인 미국 일련 번호 10/___에서 찾을 수 있다.

- [0079] 주입 지속기간은 예를 들어 약 1분 내지 약 2시간일 수 있다. 예를 들어, 용량이 약 0.5 내지 약 1 그램일 때, 약 30분의 주입 지속기간이 사용될 수 있다. 조절된 속도 조건 하에서의 정맥내 투여는 생리학적 pH 시험관내에서 용액상에서 얻을 수 있는 것의 초과량의 신체 내 달바반신 농도를 생성시킬 수 있다. 이론에 치우치지 않으려 하지만, 이는 달바반신과 혈청 알부민과 같은 내재 단백질(들)과의 복합체 형성 때문일 수 있고, 이는 달바반신을 흡수하기 위한 혈장의 수용력을 증가시킬 수 있다.
- [0080] 시험관내 또는 생체외의 달바반신 복합체의 형성은 보다 신속한 투여, 예를 들어 약 1분 이상, 약 10분 이상 또는 약 20분 이상을 가능하게 한다. 상기 복합체는 인간 혈청 알부민 및(또는) 다른 내재 단백질을 달바반신과 혼합하여 얻을 수 있고, 시험관내 또는 생체외에서 복합체를 형성하고, 그후 이 복합체를 치료할 환자에게 투여한다. 다르게는, 인간 혈청 알부민 또는 다른 내재 단백질을 자가 공급원으로부터 또는 단백질에 대한 유전자를 함유하도록 변형된 미생물을 발현시켜서 얻을 수 있다.
- [0081] 투여되는 달바반신의 양은 본원에 개시된 임의의 용량일 수 있다. 달바반신 용량은 일반적으로 약물이 연장된 기간 동안, 흔히 5일 이상, 더욱 흔히 약 1주일 또는 그 이상 동안 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 (즉, 살균) 혈장 농도에서 유지되도록 선택된다. 약 1주일 이상 (또는 약 5 내지 약 10일) 동안 살균 농도를 생산하고 유지하는 달바반신의 용량의 투여가 바람직하다. 살균 농도는 24 시간에 걸친 시험관내 실험의 초기에 존재하는 박테리아의 약 99%를 죽이는데 필요한 달바반신의 농도로서 정의된다. 혈장 중 달바반신의 최소 살균 농도는 통상적으로 약 4 mg/l이다.
- [0082] 치료될 수 있는 적응증은 합병 및 비합병 (uncomplicated) 피부 및 연조직 감염 (SSTI), 혈류 감염 (BSI), 카테터-관련 혈류 감염 (CRBSI), 골수염, 보철물 연결부 감염, 수술 예방, 심장내막염, 병원 또는 지역사회 획득 폐렴, 폐렴구균성 폐렴, 열성 호중성 백혈구감소증의 경험적 치료, 관절극 감염, 및 장치 감염 (예를 들어, 페이스 메이커 및 내부 심장 체세동기)을 포함한다. 스태필로코커스 (*Staphylococcus*), 스트렙토코커스 (*Streptococcus*), 네이세리아 (*Neisseria*) 또는 클로스트리듬 (*Clostridium*) 속 감염, 특히 스태필로코커스 아우레우스, 스태필로코커스 에피데미디스 (*Staphylococcus epidermidis*), 스태필로코커스 헤몰리티커스 (*Staphylococcus hemolyticus*), 스트렙토코커스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*), 군 A 및 C 스트렙토코커스 (*Groups A and C Streptococcus*), 네이세리아 고노레아 (*Neisseria gonorrhoeae*), 또는 클로스트리듬 디피실 (*Clostridium difficile*)와 같은 그람-양성 또는 항생제-내성 박테리아 감염을 치료할 수 있다.
- [0083] 본 발명은 피부 및 연조직 감염 (SSTIs)의 치료 방법을 제공한다. 이 치료를 받을 수 있는 환자는 심부 또는 표재 감염을 가질 수 있다. 주요 농양, 감염 궤양, 중화상, 또는 심부 및 광범위 연조직염과 같은 SSTI는 보다 깊은 연조직을 포함하고(하거나) 심각한 외과적 수술을 필요로 할 수 있다. 감염된 수술 상처를 또한 치료할 수 있다.
- [0084] 피부 및 피부 구조 감염의 임상적 외양은 경증 모낭염 (mild folliculitis)에서 중증 괴사 근막염 (severe necrotizing fasciitis)까지 다양할 수 있다. 획득 양상은 지역사회-획득 피부 및 피부 구조 감염으로 다양할 수 있으며, 이는 흔히 직업적 노출 또는 레크레이션 활동으로 인한 손상에 의하여 진행되고, 보통 매우 다양한 병원체와 관련되어 있다. 병원-획득 피부 및 피부 구조 감염은 일반적으로 수술 과정, 욕창 발현 및 카테터 삽입과 관련되어 있다. 수술후 감염은 3번째로 가장 빈번한 병원의 감염이고, 국립 병원 감염 역학관리 시스템 (National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS))에 보고된 모든 병원의 감염의 17 %에 해당한다. 가장 빈번한 감염원은 환자의 내원성 세균이다. 스태필로코커스 아우레우스, 코아글라아제-음성 스태필로코커스, 및 엔테로코커스 종 (*Enterococcus spp.*)이 가장 빈번하게 SSTI에서 단리되는 병원체이다.
- [0085] SSTI 감염의 증상은 홍반, 압통 또는 통증, 열 또는 국소 온감, 배농 또는 분비물, 종창 또는 경화, 발적, 또는 파동성을 포함할 수 있다. 본 발명의 방법으로 치료받을 수 있는 환자는 심부 또는 합병 감염 또는 외과적 수술이 필요한 감염을 갖는 환자, 또는 당뇨 또는 말초혈관병을 앓는 환자를 포함한다. 이러한 감염은 흔히 그람-양성 박테리아, 예를 들어 스태필로코커스 또는 스트렙토코커스 종, 예를 들어 스태필로코커스 아우레우스 또는 스트렙토코커스 피오게네스에 의하여 유발된다. 피부 또는 연조직 박테리아 감염의 치료 방법은 치료를 필요로 하는 개체에게 앞서 논의한 투약 계획에 따라서 앞서 논의한 양으로 달바반신의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시태양에서, 달바반신 조성물을 2회 용량으로, 흔히 약 5 내지 약 10일 간격으로, 더욱 흔히 약 1주일 간격으로 정맥내 투여한다. 일부 실시태양에서는, 제1 용량은 제2 용량의 달바반신의 2배 이상

을 포함한다. 한 실시태양에서는, 제1 용량은 약 1000 mg이고, 제2 용량은 약 500 mg이다.

[0086] 본 발명은 또한 박테리아 감염, 예를 들어 스태필로코커스 아우레우스, 또는 네이세리아 또는 클로스트리듐 속 박테리아에 의한 감염의 발생의 예방 방법을 제공한다. 본 발명의 예방 방법에서, 달바반신의 예방적 유효량을 예를 들어 의료 과정에 걸쳐서 박테리아 감염에 걸리기에 감수성일 수 있는 개체에게 투여한다. 흔히, 달바반신을 약 1일 이상, 약 3일 이상, 약 5일 이상, 또는 약 1주일 또는 그이상 동안 예방적으로 유효한 혈장 농도를 제공하기에 충분한 양으로 투여한다. 달바반신 조성물을 감염에 대한 예방 단계로서 수술 전에 또는 후에 예를 들어, 비경구적으로, 예를 들어 근육내 (i.m.), 정맥내 (i.v.), 복강내 (i.p.), 피하 (s.c.), 또는 수막내 (i.t.) 주사로 투여할 수 있다. 달바반신 조성물을 감염을 예방하기 위하여 병원과 같은 의료 치료 시설에서 수술 또는 입원과 같은 침습 의료 과정 직전 또는 후속하여, 또는 1일 이상 또는 약 1주일 전에 또는 후속하여 또는 도중에 투여할 수 있다. 개체가 박테리아 감염된 개체에 노출되었거나 노출될 상황을 포함하는, 개체가 박테리아 감염에 걸릴 수 있는 가능성이 있거나 개연성이 있는 임의의 상황에서 예방적 방법을 사용할 수 있다. 예방 방법에 있어서, 수 일 내지 약 1주일 간격으로 투여되는 동일하거나 다른 양의 단일 용량 또는 2 이상의 용량으로 달바반신 조성물을 투여할 수 있다. 한 실시태양에서, 달바반신 조성물은 혈류 관련 감염을 예방하기 위하여 정맥내 카테터를 삽입하기 전에 또는 동시에 투여할 수 있다.

[0087] 예방 방법에 있어서, 달바반신 조성물을 상기 투약 계획 중 어느 하나에 따라서 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여할 수 있다. 흔히, 달바반신 조성물은 약 0.1 내지 약 3 그램, 또는 약 0.1 내지 약 1 그램, 예를 들어 약 0.25 그램 또는 약 0.5 그램을 포함하는 단일 용량으로서 투여된다. 한 실시태양에서, 약 0.25 그램의 단일 용량을 약 2분 내지 약 1시간, 예를 들어, 약 30분에 걸쳐 정맥내 투여한다. 다른 실시태양에서, 달바반신 조성물은 다른 제약적 (예를 들어, 항생제) 치료와 동시에 정맥내로 투여한다.

[0088] 상기 치료 또는 예방 방법 중 하나에서, 달바반신 조성물을 1종 이상의 다른 항생제와 동시에 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 일부 실시태양에서, 1종 이상의 그램-음성 박테리아 중 및(또는) 달바반신이 유효하지 않은 그램-양성 박테리아 군주에 유효한 (예를 들어, 살균) 1종 이상의 다른 항생제를 달바반신 외에 투여한다. 일부 실시태양에서, 달바반신 및 그램-음성 박테리아종에 대하여 유효한 (예를 들어, 살균) 1종 이상의 항생제를 달바반신 조성물 중에 혼합물로서 투여한다.

[0089] 제약 조성물

[0090] 본 발명은 상기 방법에 따라서 달바반신의 투여를 위하여 제제화된 제약 조성물을 제공한다. 본 발명의 제약 조성물은 조성물이 개체에 투여되었을 때, 수 일, 흔히 약 3일 이상, 약 5일 이상, 또는 약 1주일 또는 그이상 동안 달바반신의 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 혈장 농도를 제공하기에 충분한 양의 달바반신, 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 달바반신의 단위 용량 형태일 수 있다. 일반적으로, 달바반신의 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 혈장 농도는 혈장 1 리터 당 약 4 mg 이상이다. 달바반신의 혈장 농도는 앞서 기재한 것과 같은 당업계에 잘 알려진 방법에 의하여 측정될 수 있다.

[0091] 달바반신은 임의로 개체로의 투여를 위한 제약학상 허용되는 형태, 임의로 제약학상 허용되는 비-독성 염일 수 있다.

[0092] 달바반신의 적절한 염의 예는 유기산 및 무기산, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 트리클로로아세트산, 숙신산, 시트르산, 아스코르브산, 락트산, 말레산, 글루탐산, 캄포르산, 글루타르산, 글리콜산, 프탈산, 타르타르산, 라우르산, 스테아르산, 살리실산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 소르브산, 피크르산, 벤조산, 신남산 등의 산과 표준 반응에 의하여 형성되는 염을 포함한다. 달바반신과 염을 형성할 수 있는 염기의 대표적인 예는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 수산화물, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 및 바륨 수산화물, 암모니아 및 지방족, 지환족, 또는 방향족 유기 아민, 예를 들어 메틸아민, 디메틸아민, 디에틸아민, 에탄올아민 및 피콜린을 포함한다. (예들 들어, 미국 특허 번호 제5,606,036호를 참조.)

[0093] 일부 실시태양에서, 정맥내 주사와 같은 비경구 투여에 적절한 달바반신의 제약학상 허용되는 수성 제제가 제공된다. 상기 수성 제제의 제조에 있어서, 당업계에 잘 알려진 방법을 사용할 수 있고, 당업계에 보통 사용되는 임의의 제약학상 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 다른 첨가제를 사용할 수 있다. 한 실시태양에서, 정맥내 주사를 위한 제약학상 허용되는 수성 제제는 5 % 텍스트로오스를 포함한다.

[0094] 비경구 투여를 위한 제약 조성물은 달바반신 및 생리학상 허용되는 희석제, 예를 들어 탈이온수, 생리학적 식염수, 5 % 텍스트로오스, 수산화성 용매 (예를 들어, 에틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 등), 비수성 비히클 (예를 들어 오일, 예를 들어 옥수수유, 면실유, 낙화생유 및 참기름), 또는 다른 보통 사용되는 희

석제를 포함한다. 제제는 추가로 가용화제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 또는 다른 공지 가용화제, 용액을 안정화하기 위한 완충액 (예를 들어, 시트레이트, 아세테이트 및 포스페이트) 및(또는) 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산 또는 소듐 바이술파이트)를 포함할 수 있다. (예를 들어, 미국 특허 번호 제 6,143,739호 참조). 다른 적절한 제약 담체 및 그의 제제는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin]에 기재되어 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 본 발명의 제약 제제는 또한 허용되는 수준의 미립자 (예를 들어, 무입자)를 함유하고 비-발열성 (예를 들어, 미국 약전의 주사가능 물질의 조건을 만족)으로 제조할 수 있다.

[0095] 한 실시태양에서, 용해되기에 충분한 부피의 물 및 바람직하게는 탈이온수의 양으로, 흔히 안정제 또는 안정제의 혼합물을 함유하는 달바반신의 건조된 (예를 들어, 동결건조) 용량이 용해된 제약 조성물을 제공한다. 통상적으로, 용해에 충분한 물의 양은 대략 10 mL이고, 달바반신 용액의 결과 pH는 3.0이 넘고, 약 3.5 내지 4.5이다. 이 용액을 정맥내 투여를 위한 드립백 (drip bag)에 함유되는 양으로 5 % 텍스트로오스를 흔히 함유하는 수성 희석제의 제2 양으로 첨가함으로써 희석하여 달바반신 용액의 pH를 약 5 내지 5.5로 높인다. 다른 실시태양에서, 드립백 중의 달바반신 용액의 pH는 약 4.5이다. 수용액의 제2 양은 탈이온화되거나 또는 무균일 수 있고, 또는 탈이온화되면서 무균일 수 있다. 한 실시태양에서, 수성 희석제는 5 % 텍스트로오스이다.

[0096] 비경구 투여를 위한 제약 조성물은 달바반신의 살균 유효성이 유지되는 조건 하에서, 임의로 부형제를 포함하는 앞서 기재한 치료적 또는 예방적 유효량의 달바반신의 단위 용량 하나 이상을 함유하는 무균 바이알 중에 제조할 수 있다. 조성물은 건조 (예를 들어, 동결건조) 분말의 형태일 수 있다. 사용하기 전에, 생리학상 허용되는 희석제를 첨가할 수 있고, 환자에게 투여하기 위하여 주사기를 통하여 용액을 끌어당길 수 있다. 앞서 기재한 제약 제제를 e-빔 또는 감마 멸균 방법, 또는 무균 여과를 포함하는 임의의 허용되는 수단에 의하여 멸균할 수 있다.

[0097] 비경구 투여를 위한 통상적인 제제는 최종 제제 1 mL 당 약 0.1 내지 약 100 mg, 약 0.5 내지 약 50 mg, 약 1 내지 약 10 mg, 또는 약 2 내지 약 4 mg의 농도의 달바반신을 포함할 수 있다.

[0098] 일부 실시태양에서, 본 발명에 따른 제약 조성물은 달바반신의 혼합물 및 1종 이상의 추가의 항생제를 포함한다. 바람직하게는 혼합물 중의 1종 이상의 비-달바반신 항생제는 1종 이상의 그람-음성 박테리아 종에 대하여 유효하며 (예를 들어 살균), (예를 들어 아스트레오남), 및(또는) 달바반신이 유효하지 않은 1종 이상의 그람-양성 박테리아 균주에 대하여 유효하다 (예를 들어 일네졸리드 또는 답토마이신). 혼합물은 또한 앞서 기재한 제약학상 허용되는 담체를 포함할 수 있다.

[0099] 일부 실시태양에서, 본 발명의 제약 조성물은 달바반신의 1종 이상의 성분을 덜 활성이거나 비활성 물질, 예를 들어 MAG로 분해되는 것을 억제하는 1종 이상의 안정화 물질을 포함한다. 본원에 사용된 "안정화 물질" 또는 "안정제"는 조성물 중 달바반신의 1종 이상의 구성 성분, 예를 들어, B₀의 농도를 안정화하는 물질을 지칭한다. "안정화 유효량"은 달바반신 조성물의 1종 이상의 성분의 장기간 안정성을 개선하기에 충분한 안정제의 양을 지칭한다. 일부 실시태양에서, 안정화 유효량은 2종 이상의 안정화 물질의 혼합물에 의하여 제공될 수 있고, 이들 각각은 단독으로 안정화 효과를 제공하기에 충분한 양으로 존재하지 않는다.

[0100] 안정제의 예는, 예를 들어 비이온성 물질, 예를 들어 당, 예를 들어, 모노-, 디-, 또는 폴리사카라이드, 또는 그의 유도체, 당 알코올, 또는 폴리올을 포함한다. 상기 안정화 물질은 예를 들어 만니톨, 락토오스, 수크로오스, 소르비톨, 글리세롤, 셀룰로오스, 트레할로오스, 말토오스, 라피노오스, 또는 그의 혼합물을 포함한다.

[0101] 한 실시태양에서, 제약 조성물은 1:2 중량비의 만니톨:달바반신을 포함한다. 다른 실시태양에서, 제약 조성물은 1:2:4 중량비의 만니톨:락토오스:달바반신을 포함한다. 놀랍게도, 만니톨 및 락토오스의 조합이 단독 물질보다 우수한 안정화 효과를 제공한다는 것을 발견하였다. 흔히, 본 발명의 제약 조성물의 pH는 예를 들어, 약 3 내지 약 5, 예를 들어 약 3.5 또는 약 4.5이다.

[0102] 일부 실시태양에서, MAG의 형성을 감소시키기 위하여 하나 이상의 과정을 사용할 수 있다. 예를 들어, 형성되는 MAG의 양을 감소시키기 위하여 만니톨과 같은 안정화 물질의 존재 시의 달바반신의 동결 건조를 사용할 수 있다.

[0103] 달바반신 조성물은 안정성을 개선하기 위하여 약 5°C와 같이 주위 온도보다 낮은 온도에서 흔히 저장한다.

[0104] **효능의 개선 및 부작용의 감소**

[0105] 고용량 농도 (즉, 놀랍게도 고농도의 장기간-지속되는 혈청 농도를 야기)에서 달바반신의 주 1회 투약은 본원의

실시예에서 나타나는 바와 같이, 매일 또는 심지어 하루 2-4회로 투여되는 종래의 항생제의 저용량의 표준 치료법에서 관찰되는 것과 유사하거나 더 우수한 놀라운 우수한 안전성 프로파일을 나타낸다. 달바반신의 놀랍게 고용량 (즉, 놀랍게도 높고 장기간-지속되는 혈청 농도를 야기)은 다른 항생제보다 적은 빈도로 유해한 부작용 없이 개선된 효능 및 환자 순응도를 가능하게 한다.

[0106] 실시예 1에서 논의한 바와 같이, 달바반신으로 치료하면 유해 사례의 발생률이 낮아진다. 심각한 유해 사례는 사망을 야기하거나 생명을 위협하거나 병원에 입원하게 하거나 병원 입원의 지속시키거나, 또는 지속되거나 현저한 장애 또는 불능을 야기하는, 임의의 용량에서 발생하는 임의의 유해 약물 사례를 포함한다. 실시예 1에서 기재된 상 II 시도에서, 설사, 오심, 고혈당증, 사지 통증, 구토 및 변비와 같은 90 %의 유해 반응은 심도에 있어서 경증부터 중등도이다. 실시예 1의 시도에서 달바반신의 사용은 연구 약물 치료에 관련된 심각한 관련 유해 사례를 야기하지 않았다.

[0107] **키트**

[0108] 본 발명은 또한 박테리아 감염의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 예를 들어 달바반신의 단위 용량 하나 이상을 포함하는 본 발명의 제약 조성물, 및 박테리아 감염을 치료 또는 예방을 위한 사용과 관련되어 건강 관리 제공자에게 정보를 제공하는 설명문을 포함한다. 설명문은 인쇄 형태 또는 또는 플로피 디스크, CD 또는 DVD와 같은 전자 매체 형태 또는 설명문을 얻을 수 있는 웹사이트 주소 형태로 제공될 수 있다. 흔히, 달바반신의 단위 용량은 개체에 투여될 때, 개체 내에서 5일 이상 동안 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 혈장 농도의 달바반신이 유지되도록 하는 용량을 포함한다. 일부 실시태양에서, 키트는 5일 이상 간격, 흔히 약 1주일 간격으로 투여될 2 단위 용량을 포함하고, 흔히 제2 용량의 약 1.5 내지 약 3배인 달바반신의 제1 용량을 포함한다. 달바반신은 흔히 무균 수성 제약 조성물 또는 건조 분말 (예를 들어, 동결건조) 조성물로서 포함된다.

[0109] 적절한 포장에 제공된다. 본원에서 사용된 "포장"은 시스템에서 관례적으로 사용되고, 정해진 한계내에서 개체로 투여하기에 적절한 달바반신 조성물을 고정될 수 있는 고체 기질 또는 물질을 지칭한다. 상기 물질은 유리 및 플라스틱 (예를 들어, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 및 폴리카르보네이트) 병, 바이알, 종이, 플라스틱 및 플라스틱-호일 적층 외피 등을 포함한다. e-빔 멸균 기법이 사용되는 경우, 포장은 내용물의 멸균을 가능하게 하도록 충분한 저밀도이어야 한다.

[0110] 키트는 또한 임의로 달바반신 투여를 위한 장치, 예를 들어 정맥내 투여를 위한 주사기 또는 장치 및(또는) 투여를 위한 건조 분말 (예를 들어, 동결건조) 조성물을 제조하기 위한 무균 용액, 예를 들어, 5 % 텍스트로오스와 같은 희석제를 포함할 수 있다.

[0111] 본 발명의 키트는 달바반신 이외에도, 상기 방법에 기재된 바와 같이 달바반신과 사용하기 위한 비-달바반신 항생제 또는 비-달바반신 항생제의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0112] 이하의 실시예에서, 하기 약자는 하기 의미를 갖는다. 약자가 정의되지 않는 경우, 이는 일반적으로 허용되는 의미를 갖는다.

[0113] AcOH = 아세트산

[0114] AcONa = 소듐 아세테이트

[0115] aq. = 수성

[0116] AST = 아스파르테이트 아미노 트랜스퍼라아제

[0117] ALT = 알라닌 아미노 트랜스퍼라아제

[0118] BV = 충전 부피

[0119] CV = 변동 계수

[0120] d = 직경

[0121] D = 달톤

[0122] DCC = 디시클로헥실카르보디아미드

[0123] DMEPA = 3-(디메틸아미노)-프로필아민

- [0124] DMSO = 디메틸 술폰아미드
- [0125] eq = 당량
- [0126] EU = 내독소 단위
- [0127] g = 그램
- [0128] GC = 기체 크로마토그래피
- [0129] HCl = 염산
- [0130] H₂O = 물
- [0131] HOBT = 1-히드록시벤조티아졸 수화물
- [0132] HPLC = 고성능 액체 크로마토그래피
- [0133] H₂SO₄ = 황산
- [0134] IPA = 이소프로필아민
- [0135] IU = 국제 단위
- [0136] KF = 플루오르화 칼륨
- [0137] Kg = 킬로그램
- [0138] L = 리터
- [0139] LC/MS/MS = 액체 크로마토그래피/질량 분석/질량 분석
- [0140] LDH = 락테이트 데히드로게나아제
- [0141] LSC = 액체 섬광 계수
- [0142] m³ = 세제곱 미터
- [0143] MeOH = 메탄올
- [0144] mg = 밀리그램
- [0145] mL = 밀리리터
- [0146] mol = 몰
- [0147] MW = 분자량
- [0148] N = 노르말
- [0149] NaOH = 수산화 나트륨
- [0150] NMP = N-메틸-2-피롤리돈
- [0151] QTD = 정량적 조직 분포
- [0152] Rt = 체류 시간
- [0153] sd = 표준 편차
- [0154] TEA = 트리에틸아민
- [0155] 하기 실시예에는 본 발명을 예시하려는 목적이며 한정하려는 것이 아니다.

실시예

- [0156] 실시예 1. 심부 피부 및 연조직 감염에서의 주 1회 달바반신의 효능 및 안전성

[0157] 이 무작위적이고 조절된 연구는 달바반신의 2종의 용량 투약계획의 안전성 및 효능을 평가한다. 심부 피부 구

조를 포함하거나 외과적 수술을 필요로 하는 피부 및 연조직 감염 (SSTI)의 성인 환자를 3 군으로 무작위적으로 나누었다: 연구 암 (Study arm) 1은 제1일에 정맥내 주사 (IV)를 통하여 달바반신 1100 mg을 받았다: 연구 암 2는 제1일에 1 g의 달바반신을 IV로 받고, 제8일에 500 mg의 달바반신을 IV로 받았다: 연구 암 3은 "표준적 치료 (standard of care)"를 받았다. 임상적인 미생물 반응 및 유해 사례를 평가하였다.

[0158] 분석을 위한 집단

[0159] 62명의 환자를 무작위 추출하여 연구하였다: 모두 연구 약물 처치의 1 이상의 용량을 받았다. 4개의 연구 집단을 안정성 및 효능에 대하여 측정하고, 하기와 같이 정의하였다: 치료-의향 (intent-to-treat) (ITT) 집단은 연구 약물 (모든 무작위 연구 주제)의 1 이상의 용량을 받은 모든 환자를 포함한다. 미생물학적치료-의향 (MITT) 집단은 기저치에서 배양-확인된 (culture-confirmed) 그람-양성 병원체를 갖는 모든 ITT 환자이다. 임상적으로 평가가능한 집단은 1) 모든 연구 참여 조건을 이행하는 사람, 2) 경구 단계-저하 (step-down) 치료법 (표준적 치료군에만 적용)을 제외하고는 제4일 후에 그람-양성 감염을 위한 항균 치료에 변화가 없는 사람, 3) 팔로우-업 (follow-up) (FU) 측정 방문을 하는 사람 (치료 실패가 아닌 경우), 및 4) 프로토콜 승인되지 않은 동시 항미생물을 받지 않는 사람 (치료 실패가 아닌 경우)로 정의된다. 미생물학적-평가가능한 집단은 기준선에서 배양-확인된 그람-양성 병원체를 갖는 임상적-평가가능한 환자의 하위세트이다.

[0160] 본 연구 집단을 표 2에서 나타내었다.

표 2

[0161] 달바반신 SSTI 치료를 위한 연구 집단

| 집단 | 연구 암 1 제1일에 달바반신 1100 mg | 연구 암 2 제1일에 달바반신 1000 mg, 제8일에 500mg | 연구 암 3 "표준적 치료" |
|--------------------|--------------------------------|---|--------------------|
| 무작위 ITT | 20 | 21 | 21 |
| 치료받음 | 20 (100 %) | 21 (100 %) | 21 (100 %) |
| 연구 완결 | 18/20 (90 %) | 20/21 (95.2 %) | 21/21 (100 %) |
| EOT에서 임상 적 평가 | 16/20 (80 %) | 17/21 (81 %) | 21/21 (100 %) |
| FU에서 임상적 평가 | 13/20 (65 %) | 17/21 (81 %) | 21/21 (100 %) |
| MITT | 14/20 (70 %) | 13/21 (61.9 %) | 14/21 (66.7 %) |
| EOT에서 미생 물학적 평가 | 13/20 (65 %) | 11/21 (52.4 %) | 14/21 (66.7 %) |
| FU에서 미생물 학적 평가 | 11/20 (55 %) | 11/21 (52.4 %) | 14/21 (66.7 %) |

[0162] ITT- 치료-의향

[0163] MITT- 배양 확인된 그람-양성 감염의 ITT 환자의 하위세트

[0164] EOT- 치료 종결

[0165] FU- 팔로우 업

[0166] 피검자의 평균 연령은 50-55 세이다 (18-56 세 범위). 치료 암의 성에 약간의 차이가 있으나, 전체 연구 집단은 동수의 남성 및 여성을 포함하였다. 환자 집단은 백인이 우세하였다. 이러한 결과는 ITT 및 임상적 평가가능 집단 둘다에서 일관되었다.

[0167] 62명의 환자가 등록되었고, 연구 암 1에 20 명 및 연구 암 2 및 3에 각각 21 명이 등록되었다. 표준적 치료의 가장 일반적인 비교물질은 클린다마이신, 세프트리악손, 반코마이신 및 세파졸린이다. 연구 암 3의 치료의 평균 기간은 15일이었다.

[0168] 기저치 병원체 및 감수성

[0169] 62명의 ITT 환자 중, 66 % (14 명의 단일-용량 달바반신, 13 명의 2-용량 달바반신, 14 명의 표준적 치료)가 단

리된 그램-양성 병원체 (MITT 집단)의 예비치료를 받았다. 가장 일반적인 병원체는 S. 아우레우스이다. 기저치에서의 병원체의 분포는 표 3에서 나타내었다.

표 3

MITT 집단에서의 기저치 그램-양성 병원체 및 달바반신 MIC 범위

| 병원체 수 | 단일 용량 달바반신 (1100 mg) (N=14) | 2-용량 달바반신 (1000 mg/500 mg) (N=13) | 표준적 치료 계획 (N=14) |
|----------------------------|-----------------------------------|---|---------------------|
| 모든 에스. 아우 레우스 | 13 (0.12) | 11 (0.12) | 10 (0.016-0.25) |
| 메티실린-감수성 | 7 | 6 | 8 |
| 메티실린-내성 | 6 | 5 | 2 |
| 군 B 스트렙토코 커스 | 0 | 2 (0.016) | 2 (0.016) |
| 스트렙토코커스 피오게네스 | 0 | 1 (0.016) | 1 (0.016) |
| 기타 스트렙토코 커스 및 비특정 균주 | 3 (0.016) | 2 (0.016) | 4 (0.016) |

임상적 미생물학적 반응

3개의 치료 투약계획의 유효성은 환자의 임상적 반응 및 증명되거나 추정되는 미생물학적 반응을 측정하여 결정하였다. 일차적인 효능 종말점은 임상적으로 평가가능한 집단을 위한 팔로우-업 방문에서의 임상적 반응이다. EOT 및 FU 방문에서의 임상적 반응을 성공 (치료 또는 개선) 또는 실패 (불확정한 결과를 포함)로 분류하였다. 성공으로 분류된 환자는 그의 감염에 있어서 추가의 전신적 항박테리아 치료를 받아서는 안된다. 실패는 SSTI를 위하여 신규한 또는 추가의 전신성 항박테리아 제제가 필요한 SSTI의 국소적 또는 전신성 징후 및 증상의 지속으로서 정의하였다.

제2 효능 변수인 미생물학적 결과를 미생물적으로 증명된 SSTI (즉, 1종 이상의 동정된 기저치 병원체)를 갖는 환자의 하위 집단에서 측정하였다. 미생물학적 반응을 기저치에서 동정된 각 그램-양성 병원체에서 측정하였다 (즉, 박멸, 추정 박멸, 지속, 추정 지속). 팔로우-업 배양을 수행하지 않은 환자에 있어서, 기저치 병원체를 위한 미생물학적 반응을 임상적 반응을 기초로 추정하였다. EOT 및 FU 방문에서의 환자의 미생물학적 반응을 성공 (즉, 모든 그램-양성 미생물이 박멸되거나 추정 박멸됨) 또는 실패 (즉, 다수의 병원체가 부분적으로 박멸되며, 1종 이상의 그램-양성 미생물이 지속되거나 지속된다고 추정됨)으로 등급을 나누었다. EOT 및 FU 방문 둘다에서, 콜로니화 및 중복감염이 측정되었다. FU 방문에 있어서, 환자의 세균학상 반응은 재발을 포함할 수 있다.

임상적 효능

임상적 성공율을 표 4에 나타내었다. 임상적 평가가능 집단에서, 단일-용량 달바반신에서 61.5 %의 환자, 2-용량 달바반신에서 94.1 %, 및 표준적 치료군에서 76.2 %가 FU 측정 시에 성공으로 분류되었다. 또한 기저치에서 심부 및 합병 SSTI를 갖는다고 분류된 환자의 실험적 하위분석에서, 2-용량 달바반신 치료법이 단일-용량 달바반신 및 표준적 치료 (각각 58.3 % 및 73.7 %) 보다 높은 임상적 성공율 (93.8 %)로 제공되었다.

2 용량 달바반신으로 치료함에 따라서 더욱 유리한 반응에 대한 일정한 경향을 갖는 보조적인 ITT (supportive ITT) 및 미생물학적-평가가능 집단에서 EOT 및 FU 측정 둘다에서 유사한 성공율을 나타내었다 (표 3). MITT 집단에서, 메티실린-내성 S. 아우레우스 (MRSA)을 갖는 환자에서 FU 측정시 임상적 성공율이 단일-용량 달바반신에서 50 % (3/6), 2-용량 달바반신에서 80 % (4/5), 및 표준적 치료 투약계획으로 치료한 환자에서 50 % (1/2)였다.

표 4

[0177] 분석 집단의 임상적 성공률 및 치료 군

| 집단 | 단일 용량 달바반신 (1100 mg) | 2-용량 달바반신 (1000 mg/500 mg) | 표준적 치료 계획 |
|------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------|
| EOT에서의 ITT | 15/20 (75.0) | 19/21 (90.5) | 17/21 (81.0) |
| FU에서의 ITT | 12/20 (60.0) | 19/21 (90.5) | 16/21 (76.2) |
| EOT에서의 MITT | 10/14 (71.4) | 12/13 (92.3) | 10/14 (71.4) |
| FU에서의 MITT | 7/14 (50.0) | 12/13 (92.3) | 9/14 (64.3) |
| EOT에서 임상적 평가가능 | 13/16 (61.5) | 16/17 (94.1) | 17/21 (81.0) |
| FU에서 임상적 평가가능 | 8/13 (61.5) | 16/17 (94.1) | 16/21 (76.2) |
| EOT에서 미생물학적 평가가능 | 10/13 (76.9) | 10/11 (90.9) | 10/14 (71.4) |
| FU에서 미생물학적 평가가능 | 6/11 (54.5) | 10/11 (90.9) | 9/14 (64.3) |

[0178] 미생물학적 효능

[0179] 상이한 병원체에 대한 상이한 치료 계획의 성공률을 표 5에서 나타내었다. 미생물학적-평가가능 집단에서, 모든 미생물의 FU에서의 박멸/추정 박멸율은 단일-용량 달바반신에서 58.3 % (7/12)이고, 2-용량 달바반신에서 92.3 % (12/13)이고, 표준적 치료 군의 환자에서 70.6 % (12/17)이었다. 지속되는 단리물에서, 달바반신 MIC에 변화가 없었다. FU에서, S. 아우레우스 박멸율은 단일-용량 달바반신 (50 %) 및 표준적 치료 (60 %) 치료법에 비교하여 2-용량 달바반신 군 (90 %)에서 보다 높았다. MITT 집단에서도 유사한 발견을 관찰하였다; 2-용량 달바반신은 80 %의 MRSA 단리물을 박멸하였다 (표 5).

표 5

[0180] FU 측정시에 미생물의 ITT 집단에서의 병원체에 의한 성공률

| | 단일 용량 (1100 mg) 달바반신 | 2-용량 (1000 mg/500 mg) 달바반신 | 표준적 치료 계획 |
|--------------|----------------------|----------------------------|----------------|
| 전체 미생물 | 7/16 (43.8 %) | 14/16 (87.5 %) | 12/17 (70.6 %) |
| 모든 S. 아우레우스 | 5/13 (38 %) | 9/11 (82 %) | 6/10 (60 %) |
| 메티실린-감수성 | 2/7 (29 %) | 5/6 (83 %) | 5/8 (63 %) |
| 메티실린-내성 | 3/6 (50 %) | 4/5 (80 %) | 1/2 (50 %) |
| 기타 스트렙토코커스 종 | 2/3 (67 %) | 4/4 (100 %) | 5/7 (71 %) |

[0181] 미생물학적-평가가능 및 MITT 집단에서, EOT 및 FU 시의 미생물학적 성공률을 표 6에서 요약하였다. 2-용량 달바반신 및 표준적 치료 투약계획으로 치료한 환자에 대한 방문에서 필적할 만한 미생물학적 성공률이 보고되었고 (대략 64% 내지 77%), 여기서 달바반신의 단일 용량을 받은 환자는 낮은 성공률 (< 40%)을 갖는다. 미생물학적-평가가능 집단에서의 EOT/FU에서의 미생물학적 성공률은 임상적 반응의 발견에 필적하였다: 단일-용량 달바반신에서 38.5%/27.3%, 2-용량 달바반신에서 72.7%/72.7%, 및 표준적 치료 치료법에서 71.4%/64.3%. MITT 집단에서도 유사한 결과를 관찰하였다 (데이터는 도시하지 않음).

표 6

[0182] 미생물학적 성공률

| | 단일 용량 (1100 mg) 달바반신 | 2-용량 (1000 mg/500 mg) 달바반신 | 표준적 치료 계획 |
|---------|----------------------|----------------------------|--------------|
| MITT 집단 | | | |
| EOT | 5/14 (35.7) | 10/13 (76.9) | 10/14 (71.4) |
| FU | 3/14 (21.4) | 9/13 (69.2) | 9/14 (64.3) |

| 미생물학적 측정가능집단 | | | |
|--------------|-------------|-------------|--------------|
| EOT | 5/13 (38.5) | 8/11 (72.7) | 10/14 (71.4) |
| FU | 3/11 (27.3) | 8/11 (72.7) | 9/14 (64.3) |

[0183] 약물동력학적 분석

[0184] 달바반신 치료 군으로 무작위 추출된 환자에 있어서, 달바반신 혈장 농도의 측정을 위하여 제8일에 혈액 5 ml를 얻었다. 제8일에 500 mg 달바반신 용량을 받도록 무작위 추출된 환자에 있어서, 제2 용량의 투여 직전에 혈액을 얻었다. 단일-용량 달바반신 군으로 무작위 추출된 환자에서 제10일 및 제24일에, 또한 달바반신의 2 용량을 받은 환자에서 제20일 및 34일에 추가의 5 ml 혈액 샘플을 얻었다.

[0185] 달바반신 혈장 농도를 검증된 액체 크로마토그래피 및 질량 분광기 방법을 사용하여 측정하였다. 정량의 하한은 혈장에서 500 ng/ml이었다.

[0186] 단일-용량 투약 계획에서의 연구 제8, 10 및 24일에 수집한 평균 달바반신 농도는 각각 31.1 ± 7.1 , 25.2 ± 4.8 및 10.2 ± 3.5 mg/l (평균 \pm SD)이었다. 연구 제8 (제2 용량 이전), 20, 및 34일의 2-용량 투약계획에 따른 달바반신 농도는 각각 30.4 ± 8.2 , 21.2 ± 10.0 및 9.0 ± 4.4 mg/l이었다. 예상되는 바와 같이, 모든 환자는 제1 용량에 따라서 제1주에 걸쳐 달바반신 농도가 20 mg/l를 넘었고, 제8일에 500 mg의 IV 추가 용량으로 추가의 1주일 동안 20 mg/l가 넘는 농도를 유지하였다. 일반적으로 약 4 내지 10mg/l였다.

[0187] 안전성 평가

[0188] 연구 약물의 1 이상의 용량을 받은 각 환자를 비정상적 임상 실험적 시험 결과 및 활력 징후를 포함하는, 유해 사례 (AE)를 모니터링하여 약물 안전성을 평가하였다. AE는 연구자에 의하여 그의 심도 (경증, 중등도, 중증, 생명위협)으로, 또한 관련 연구약물과의 관계 (관련없음, 거의 관련 없음, 관련 가능, 및 대개 관련)으로 평가하였다.

[0189] AE 데이터의 요약은 표 7에서 나타내었다. 유해 반응의 대부분 (90 %)는 심도에 있어서 경증 내지 중등도로 간주되었다. 모든 심각한 유해 반응 (5 환자에서 8 사례)은 연구 약물 치료와 관련이 없었다. 1회 이상의 치료 위급 AE가 보고된 모든 환자 중 대략 59% (19명의 단일-용량 달바반신, 16명의 2-용량 달바반신, 21명의 표준적 치료)가 연구 약물과 관련 가능하거나 또는 대개 관련된 것으로 분류되는 사례를 경험하였다. 특히, 단일-용량 달바반신에서 11명 (55 %), 2-달바반신에서 10명 (48 %), 및 표준적 치료 환자 12명 (57 %)에서 약물-관련 AE가 보고되었다. 달바반신 및 표준적 치료군에서 가장 빈번하게 보고되는 약물-관련 AE는 설사 및 오심이었다. 상이한 치료군에서 관찰되는 AE의 유형의 요약은 표 8에 나타내었다.

[0190] 달바반신-치료 환자 중 AE로 인하여 조기에 치료를 중단한 환자는 없었다. 대개 약물 관련된 제1일에 담마진을 발현한 1명의 환자, 및 연구 약물과 관련되지 않은 AE를 갖는 2명 (P. 아에루지노사로 중독감염 및 증가된 반코마이신 최저 농도)을 포함하는, 표준적 치료 투약계획의 21명 중 3명 (14%)의 환자는 AE로 인하여 치료를 조기에 중단하였다.

표 7

[0191] 유해 사례 (AE) 데이터의 요약

| | 단일 용량 달바반신 (N=20) | 2-용량 달바반신 (N=21) | 표준적 치료 (N=21) |
|--------------------------------|----------------------|---------------------|------------------|
| ≥ 1 AE | 95% | 76.2% | 100% |
| % 중증 AE | 15% | 9.5% | 4.8% |
| ≥ 1 AE 치료와 관련 가능/대개 관련 | 55% | 48% | 57% |
| 연구 약물치치의 중단을 야기하는 AE | 0 | 0 | 14.3% |
| ≥ 1 중증 AE | 2 (10%) | 2 (9.5%) | 1 (4.8%) |

표 8

가장 일반적 유해 사례

| | 단일 용량 달바반신 (N=20) | 2-용량 달바반신 (N=21) | 표준적 치료 (N=21) |
|-------|----------------------|---------------------|------------------|
| 설사 | 20% | 9.5% | 28.6% |
| 오심 | 10% | 28.6% | 9.5% |
| 고혈당증 | 5% | 14.3% | 19% |
| 사지 통증 | 10% | 9.5% | 9.5% |
| 구토 | 10% | 14.3% | 4.8% |
| 변비 | 5% | 4.8% | 14.3% |

토의

[0194] 이 개방형 무작위 II 상 시도 (open-label, randomized Phase II trial)는 달바반신이 SSTI를 갖는 성인의 치료에 유효하다는 것을 나타내었다. 등록된 환자 다수는 심부 또는 합병 감염 (> 90%) 및 외과적 수술을 필요로 하는 감염을 가지며, 대략 45 %가 당뇨를 앓고 있었다.

[0195] 2회의 주1회 용량의 달바반신은 단일-용량의 달바반신 또는 표준적 치료 투약계획 보다 수치적으로 높은 임상적 반응 속도를 가졌다. ITT 및 임상적-평가가능 집단 둘다에서 얻은 데이터는, 달바반신 (1000 mg, 500 mg 주 1회) 2회의 순차적인 주 1회 주사가능 물질 용량의 투약계획이 SSTI의 치료에 유효하다는 것을 제시하였다. 표준적 치료군을 13일의 평균 기간 동안 치료하였다. 팔로우-업에서, 2-용량 달바반신으로 치료한 임상적-평가가능 환자의 94 %가, 표준적 치료 투약계획을 받은 환자 76% 및 단일-용량 달바반신을 받는 환자 61.5 %에 비교하여 임상적 성공으로 간주되었다.

[0196] S. 아우레우스는 기저치에서 가장 빈번하게 단리되는 미생물이다. 이 시도에서, 대략 83 %의 환자가 S. 아우레우스로 감염되었고, 모든 S. 아우레우스 균주의 38 %가 MRSA였다. 대부분의 감염 (80 %)는 단일 병원체에 의하여 유발되었다. MRSA를 비롯한 그람-양성 단리물에 대한 달바반신의 MIC는 0.016 내지 0.25 mg/L였다.

[0197] 미생물학적 성공률은 임상적-평가가능 집단의 임상적 반응에 필적하였다. 모든 조합된 미생물에 있어서, 2-용량 주 1회 달바반신 투약계획으로 치료하면 단일-용량 달바반신 (58 %) 및 표준적 치료 요법 (71 %)에 비교하여 2주 후 치료 측정에서 보다 높은 박멸율 (92 %)을 제공하게 된다. 전체적으로, S. 아우레우스 박멸율은 각각 90 %, 50 % 및 60 % 환자에서 관찰되었다. MITT 집단에 있어서, MRSA 박멸율은 2-용량 달바반신 투약계획에서 80 %이고, 이에 비해 단일-용량 달바반신 및 표준적 치료 요법 둘다에서 50 %였다.

[0198] 단일-용량 및 2-용량 주 1회 치료 기간 (각각 제10일 또는 제20일)의 마지막에서 관찰되는 달바반신의 농도는 두번째의 주1회 용량에 따른 약물 축적이 거의 없다는 것을 암시하였다. 2-용량 투약계획에서 관찰되는 높은 임상적 성공률은, 1주일 간격으로 분리된 2 용량의 달바반신에서 지속적인 농도의 약물 또는 약물 노출이 제공된다는 시간-의존적 살균의 증거가 된다. 주 1회 투약 간격의 마지막에 측정되는 달바반신 혈장 농도는 이 시도에서 발견되는 것을 포함하는 다수의 SSTI (< 0.03 내지 0.5 mg/L)에 대한 병원체에서 보고된 MIC₉₀보다 실질적으로 높았다. 이 농도는 또한 4 내지 10mg/l인 최소 살균 농도를 넘는다.

[0199] 유해 반응의 전체 비율은 달바반신 투약계획 및 표준적 치료군 둘다에 대한 것과 유사하였다. 위장관-관련 유해 사례 (즉, 설사 및 오심)이 3 치료군에서 가장 일반적으로 보고되었다. 이러한 사례 중 다수는 경증이고 자기제한성 (self-limited)이었다. 달바반신으로 비-처리 환자는 유해 반응으로 인하여 조기에 연구를 중단하지 않았으며, 보고된 글리코펩티드에 기인할 수 있는 심각한 유해 사례를 나타내지 않았으나, 표준적 치료군 중 14 %는 유해 효과로 인하여 중단하였다. 그러므로, 신규한 용량 투약계획은 표준적 치료에 비교하여 유해 부작용을 감소시켰다. 이 시도의 데이터로부터 달바반신이 임의의 정도의 임상적으로 현저한 간독성 또는 신독성을 야기한다는 증거를 발견할 수 없다.

[0200] 2-용량 투약계획은 합병 SSTI 환자의 치료에 효과적인 것으로 나타났다. 두 용량에서 달바반신은 표준적 치료군의 유해 사례 프로파일과 유사한 유해 사례 프로파일을 갖고, 이 임상적 시도에서 우수한 내약성을 나타내었다.

[0201] 실시예 2. 건강한 피검자에서의 약물동력학 및 달바반신의 신장 배설

[0202] 이 연구의 1차적인 목적은 약물의 치료적 용량을 받은 건강한 피검자에서 달바반신의 약물동력학을 특징화하고, 신장 배설의 정도를 계산하는 것이다. 이는 개방적이고 비교적이지 않은 연구이다.

[0203] 연구 약물 처리

[0204] 18 내지 65세의 건강한 남성 또는 여성 피검자에 30분에 걸쳐서 주입되는 달바반신의 단일 1000 mg IV 용량을 투여하였다.

[0205] 1명의 여성 및 5명의 남성인 6명의 피검자를 등록하고, 연구 약물처치를 받고, 연구의 모든 측면을 완결하였다. 3명의 피검자는 백인이고, 3명의 피검자는 아프리카인-미국인이었다. 평균 연령은 29.8세 (22 내지 63세 범위)였다. 평균 신장은 68.6인치 (63 내지 75 범위)이고, 평균 체중은 179.6 lbs (140 내지 244)였다.

[0206] 약물동력학

[0207] 연구 제1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 및 42일에 혈액 및 소변 (24-시간 수집)을 수집하였다. 혈액 샘플을 헤파린화 튜브로 넣고, 원심분리하였다. 혈장을 분리하고, 분석시까지 -20℃에서 동결하여 보관하였다. 혈장 및 소변 샘플을 검증된 LC/MS/MS 방법을 사용하여 달바반신에 대하여 분석하였다. 본 분석법의 정량의 하한은 소변 및 혈장에 있어서 500 ng/mL였다.

[0208] 달바반신 약물동력학 파라미터를 윈놀린TM 소프트웨어 (WinNonlinTM software) (파르사이트 코퍼레이션 (Pharsight Corporation))을 사용하여 비-구획 방법 (non-compartmental method)으로 측정하였다. 피크 농도 (C_{max}) 값을 관찰된 데이터에서 직접 얻었다. 혈장 농도-시간 곡선 하의 면적 (AUC)를 선형 사다리꼴 법칙을 사용하여 계산하였다. 청소율 (Clearance (CL))은 용량/AUC로 계산하였다. 소실 반감기 ($t_{1/2}$)를 로그 농도 대 시간 곡선의 로그-선형부의 선형 회귀로부터 측정하였다. 분포 용적 (V_z)의 측정은 회귀 파라미터를 사용하여 계산하고, 정상 상태에서의 분포 용적 (V_{ss})는 1차 모멘트 곡선 하의 면적 (AUMC)을 용량으로 곱하고 AUC로 나누어서 계산하였다. 소변에 배설되는 달바반신의 누적량은 소변 배설 속도의 적분값 (AURC)으로 측정하였다. CL_R 또는 신장 청소율을 비율: $CL_R = AURC/AUC$ 로서 결정하였다.

[0209] 시간에 따른 달바반신의 혈장 농도를 모든 피검자에 대하여 도 1에서 나타내었다. 약물동력학 파라미터를 표 9에서 나타내었다. 모든 피검자에서 농도가 유사하였다. 피크 혈장 농도는 대략 300 mg/L였고, 주입 종결 직후에 얻어졌다. 달바반신은 10 L가 넘는 겉보기 분포 용적을 나타내었고, 세포외액에 잘 분포된 것으로 추정되었다.

[0210] 달바반신을 9-12일의 $t_{1/2}$ 로 느리게 소실되었다. 전체 약물 청소율은 0.0431 ± 0.0074 L/hr였다. 소변으로 변화하지 않고 배설되는 약물의 측정 분획은 투여 용량의 42%이고, 신장 청소율은 0.018 L/h로 측정되었다. 피검자에서 관찰되는 변동성은 모든 약물동력학 파라미터에 걸쳐서 22 % 미만의 변동계수로 낮았다.

표 9

| | 약물동력학적 파라미터 | | | | | | | | |
|-----|-------------------|----------------|---------------|------------|-----------|---------------|------------|------------|---------------|
| | C_{max} mg/L | $t_{1/2}$ h | AUC mg.h/L | V_z L | CL L/h | V_{ss} L | AURC mg | % 신장 배설 | CL_R L/h |
| 평균 | 301 | 257 | 23843 | 16.0 | 0.0431 | 11.5 | 419 | 41.9 | 0.0181 |
| Sd | 65 | 21 | 4526 | 3.1 | 0.0074 | 2.13 | 27 | 2.7 | 0.0036 |
| CV% | 21.6 | 8.1 | 19.0 | 19.5 | 17.1 | 18.6 | 6.4 | 6.4 | 20.1 |
| Min | 243 | 227 | 19844 | 11.7 | 0.0332 | 8.58 | 379 | 37.9 | 0.0130 |
| Max | 394 | 282 | 30100 | 19.6 | 0.0504 | 13.9 | 448 | 44.8 | 0.0226 |

[0211]

[0212] 안정성 측정

[0213] 유해 사례를 기록하고, 심도 및 연구 약물과의 관계를 측정하였다. 실험적 데이터 (분배 소변분석의 CBC, 화학 패널)를 수집하고, 기저치로부터의 변화 및 범위 밖의 값을 측정하였다. 물리적 검사인 ECG, 및 활력 징후를 얻고, 기저치로부터의 변화를 측정하였다.

[0214] 달바반신은 본 연구에서 우수한 내약성이었다. 본 연구 중에 피검자 사망 또는 심각한 유해 사례가 보고되지

않았으며, AE로 인하여 연구를 조기에 중단한 피검자가 없었다.

[0215] 모든 자원자는 모두 경증 강도인 1 이상의 AE를 나타내었다. 3명의 자원자는 연구 약물처치와 관련가능한 AE를 보고하였다: 한 피검자에서 상승된 ALT (값 46 IU/L, 정상의 상한 40 IU/L); 한 피검자에서 호산구증가증 (값 $0.5 \times 10^3 / \mu\text{L}$, 정상의 상한 $0.4 \times 10^3 / \mu\text{L}$), 상승된 LDH (값 303 IU/L, 정상의 상한 90 IU/L), 상승된 ALT (값 54 IU/L, 정상의 상한 40 IU/L), 상승된 AST (값 42 IU/L, 정상의 상한 40 IU/L); 및 한 피검자에서 이명.

[0216] 기저치-후의 혈액학, 화학, 활력 징후 및 ECG 결과에 대한 경향성은 없었다.

[0217] 토의

[0218] 단일 1000 mg IV 용량의 달바반신은 우수한 내약성이었다. 1000 mg의 단일 정맥내 주입 후에, 45mg/l가 넘는 달바반신의 혈장 농도가 7일 이상 동안 유지되었다. 이는 살균으로 알려진 상기 농도 (4-32 mg/l)보다 높았다. 이는 주 1회 투약계획으로서의 달바반신의 용도를 뒷받침하였다. 소변 소실 프로파일은, 소변으로 대략 40%가 배설되어 신장 배설이 중요한 소실 경로라는 것을 나타내었다. 이 발견은 동물에서의 관찰과 일관되었다. 신장은 유일한 소실 경로가 아니기 때문에, 신장 손상된 환자에게 달바반신의 투약 조절이 필요하지 않을 것이다.

[0219] 실시예 3. 등은 적정 마이크로열량측정을 사용한 달바반신의 단백질 결합

[0220] 단백질로의 달바반신의 결합은 마이크로칼 VP-ITC (Microcal VP-ITC) 기기를 사용하여 25 및 37°C에서 20 mM 포스페이트, 150 mM NaCl (pH 7.4) 중에서 등은 적정 마이크로열량측정 (ITC)에 의하여 측정하였다. 통상적인 실험에서, $25 \times 10 \mu\text{l}$ 의 단백질 ($\approx 150 \mu\text{M}$)을 달바반신 용액 ($25 \mu\text{M}$)을 함유하는 열량계 셀로 주사하였다. 실제 단백질 및 달바반신 농도를 280 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 대조군 실험은 동일한 조건 하에서 단백질을 희석열을 설명하기 위하여 완충액 (달바반신이 없음)으로 단백질을 주사하는 것을 포함하였다. 비교를 위하여, 테이코플라닌을 사용하여 일부 필요한 변형을 한 유사한 실험을 수행하였다.

[0221] 달바반신으로의 실험을 하기 단백질 각각으로 수행하였다: 인간 알부민, 개 알부민, 래트 알부민; 소 알부민; 및 인간 α -당단백질. 테이코플라닌을 인간 알부민 및 α -당단백질로 연구하였다. 2개의 상이한 온도에서의 결합 친화도의 비교를 표 10에서 나타내었다.

표 10

[0222] 겉보기 결합 친화도의 비교 ($K_a \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)

| | 25°C | 37°C |
|----------------|---------------------|---------------------|
| <u>달바반신</u> | | |
| 인간 알부민 | 1.35 (± 0.2) | 1.33 (± 0.15) |
| 래트 알부민 | 3.1 (± 0.5) | 2.8 (± 1.8) |
| 개 알부민 | 0.62 (± 0.09) | 0.50 (± 0.13) |
| 소 알부민 | 1.38 (± 0.14) | |
| α -당단백질 | 1.84 (± 0.36) | 4.8 (± 2.3) |
| <u>테이코플라닌</u> | | |
| 인간 알부민 | 0.96 (± 0.08) | |
| α -당단백질 | 0.07 (± 0.01) | |

[0223] 인용된 \pm 에러는 피팅 루틴 (fitting routine)에서 얻은 표준 편차이다.

[0224] 희석열에 대한 보정 후에, 통합된 열 효과를 표준 마이크로칼 오리진 소프트웨어 패키지 (standard Microcal ORIGIN software package)로 간단한 단일-부위 결합 모델을 사용하는 비-선형 회귀로 분석하였다. 각 주사에 대한 기초 데이터 ($\mu\text{cal}/\text{초}$)를 첨가 당 전체 열 효과를 내기 위하여 통합하고, 그후 주사물 (injectant)의 kcal/mole을 얻기 위하여 주사물의 양으로 나누었다. 동일한 통합을 대조 희석 효과에 적용하고, 이를 실제 적정 데이터로부터 감산하였다. 이는 결합 정도가 전체 열 발산 (또는 흡수)에 비례하는 결합 곡선의 차이를 제공하였다. 그후 이를 각종 표준 결합 모델에서 비-선형 회귀 방법으로 분석하였다. 가장 간단한 모델은 간단한 비-경쟁적 결합 평형을 가정하여, 3개의 파라미터를 얻었다:

[0225] $K_a (=1/K_{\text{diss}})$ 는 결합 연합 (분리 상수)이다

[0226]

ΔH = 결합 엔탈피 (결합에 관련된 신호의 크기)

[0227]

N = 결합 부위의 수 (결합 모델이 정확하다고 가정)

[0228]

비-경쟁적 결합을 가정하여, N 은 샘플에서 모든 이용가능한 결합 부위를 포화시키기 위하여 필요한 주사물의 (상대적) 몰수이다. 달바반신 실험에 있어서, 달바반신은 “샘플” 이고, 단백질 (HSA 등)의 “주사물”이다. 이러한 예비 결과는 결합이 비교적 약하고, 달바반신의 열악한 용해도 때문에, 결합 화학양론 (N)을 명확하게 측정하기가 어렵다는 것을 나타낸다. 그러나, 도 2에서 나타난 바와 같이, 모든 경우에, 데이터는 $N < 1$ (즉, 달바반신으로의 한 단백질에 1개 미만)에 잘 부합하였다. 결과적으로, $N=0.5$ 의 값은, 예상되는 것보다 모든 달바반신에 결합하는 단백질의 몰의 단지 절반을 취한다는 것을 의미한다. 즉, 각 단백질은 2개의 달바반신 분자에 명백하게 결합한다. 달바반신은 단백질과 1:1로 결합하는 이량체를 형성할 수 있다. 결합 화학양론 모델의 결과는, 1:1 결합을 나타내는 테이코플라닌과는 달리 2 달바반신 분자가 1몰의 단백질에 결합한다는 것을 제시한다.

[0229]

표 11은 인간 혈청 알부민(6×10^{-4} M) 및 α -글리코펩티드 (1.5×10^{-5} M)의 생리학적 농도를 가정하여, 1-500 μ M의 범위의 항생제 농도에 결합하는 계산된 백분율을 나타낸다. 이를 임상적 상황에 관련하여, 남성의 달바반신의 피크 농도는 대략 300 mg/L 또는 165 μ M이었다.

표 11

[0230]

혈장 단백질로의 테이코플라닌 및 달바반신의 계산된 결합 백분율

| 항생제 농도 (μ M) | 달바반신 | 테이코플라닌 |
|-------------------|------|--------|
| 인간 알부민 | | |
| 1 | 98.8 | 98.3 |
| 10 | 98.8 | 98.3 |
| 100 | 98.7 | 98.0 |
| 165 | 98.6 | ND |
| 250 | 98.5 | ND |
| 500 | 98.0 | ND |
| 인간 α -당단백질 | | |
| 1 | 73.0 | 9.6 |
| 10 | 68.2 | 9.1 |
| 100 | 26.2 | 6.0 |
| 165 | 16.9 | ND |
| 250 | 11.4 | ND |
| 500 | 5.9 | ND |

[0231]

ND= 수행되지 않음

[0232]

이러한 실험에서, 인간 혈청 알부민으로의 달바반신의 결합은 98%를 초과하였다. 결합 분획은 선택된 범위의 달바반신 농도, 즉 1-500 μ M에 걸쳐 상당히 일정하였다. 이 범위는 남성에서의 치료적 농도를 포함하였다. α -당단백질로의 달바반신의 결합은 테이코플라닌의 결합보다 컸다. 달바반신은 시험되는 모든 종으로부터의 단백질에 걸쳐서 유사한 K_d 값을 가지며, 다른 근원의 혈장 단백질에 대한 낮은 친화도 및 높은 수용력을 나타내었다. 이러한 결과는 달바반신의 독특한 약물동력학 특성의 일부를 설명하는데 도움이 된다. 2:1 달바반신:단백질 복합체의 결합 및 형성은 또한 연장된 반감기, 및 세포외 물 부피에 근접한 겉보기 분포 용적을 설명하였다. 낮은 친화도는 1%에 근접한 유리 분획의 화합물에서 예상되는 것을 훨씬 초과하는 관찰된 생체내 활성을 설명하는데 도움이 된다. 혈장 단백질에 대한 높은 수용력은 생리학적 pH에서 화합물의 낮은 용해도에도 불구하고 얻어지는 비교적 높은 혈장 농도를 설명하는데 도움이 된다.

[0233]

실시예 4. 래트에서의 약물동력학 특성 및 달바반신의 조직 분포

[0234]

20 mg/kg [3 H]-달바반신의 단일 IV 주입한 래트에서 2종의 연구를 수행하였다. 투여후 70일에 걸쳐서 추출물 및 40 개가 넘는 상이한 조직을 70일에 걸쳐서 수집하고, 약물-유래의 방사능활성의 조직 분포 및 약물동력학을 측정하였다.

- [0235] HPLC-정제된 [^3H]-달바반신을 이러한 연구에 사용하였다. 방사성표지된 약물을 삼중수소 교환에 의하여 생성하고, HPLC로 정제하였다.
- [0236] 랫 질량 균형 (rat mass balance) 연구
- [0237] 수컷 랫트에 달바반신의 단일 정맥내 (IV) 주입에 따른 달바반신의 배설 패턴을 측정하기 위하여 질량 균형 연구를 수행하였다.
- [0238] 15마리의 스프라그-돌리 (Sprague-Dawley) 랫트에 ^3H -달바반신 (20 mg/kg, 100 μCi /랫)의 단일 IV 용량을 투여하였다. 용량 투여에 따라서, 소변 및 대변을 복용 (3 마리/최종 수집 시간) 후에 14, 36 및 70 일에 24시간 간격으로 수집하였다. 물 및 메탄올 케이지 세척물을 또한 수집하였다. 수집 기간이 종결시에 시체를 분석하였다. 모든 샘플을 액체 섬광 계수 (LSC)로 전체 방사능활성 용량을 분석하였다.
- [0239] 랫트에서 ^3H -달바반신의 IV 투여 후에, 약물-유래의 방사능활성을 소변 (배설된 방사능활성의 $\sim 2/3$) 및 대변 (배설된 방사능활성의 $\sim 1/3$) 둘다에서 제거되었다. 방사능활성의 대략 절반이 제1 주일 내에 소변 및 대변에서 제거되었고, 이는 대략 1주일 동안 혈장 $t_{1/2}$ 과 일관되었다. 복용 후 70일에, 용량의 4.5 %만이 시체에 남아있었다. 케이지 세척에서는 무시할만한 방사능활성이 나타났다. 사실상 모든 투여된 방사능활성이 본 연구 중에 설명되었다 (소변, 대변, 시체, 케이지 세척, 및 삼중수소 교환).
- [0240] 랫 정량적 조직 분포 (OTD) 연구
- [0241] 수컷 랫트로 달바반신의 단일 IV 주입 후에 달바반신의 조직 분포를 측정하기 위하여 정량적 조직 분포 연구를 수행하였다.
- [0242] 41마리의 스프라그-돌리 랫트에 ^3H -달바반신 (20 mg/kg, 50 μCi /랫)의 단일 IV 주입을 하였다. 랫트 (시점마다 3마리)를 혈액, 혈장 및 조직 (시체 포함)을 수집하기 위하여 복용 후에 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 336, 840, 1176 및 1680 시간에 안락사시켰다. 모든 샘플을 LSC로 분석하였다.
- [0243] 농도-시간 프로파일을 신장, 간, 비장, 혈액, 혈장, 폐 및 피부를 포함하는 40개가 넘는 조직에서 측정하였다. 피부를 포함한 조직에서의 약물-유래 방사능활성의 농도 및 $t_{1/2}$ 값은 혈장에서 관찰되는 것과 필적하였다. 달바반신은 주입 후 12 시간 내에 약물-유래 방사능활성의 정량가능한 농도를 갖는 모든 조직에 신속하고 광범위하게 분포한다고 관찰되었다. 대부분의 조직은 투여 후 24시간 내에 최대 농도 (C_{\max})에 도달하였다. 5일에 관찰된 회수 방사능활성은 임의의 단일 조직에서 용량의 $< 5\%$ 였다. 복용 후 70일에, 시체만이 투여된 방사능활성의 $> 1\%$ (2.34%)를 유지하였다. 그러므로, 달바반신은 임의의 단일 조직, 기관 또는 혈액 세포 성분에 축적되지 않는다. 이 건강한 동물 모델에서 CNS의 방사능활성의 농도는 낮았지만 관찰되었다. 달바반신은 혈장과 유사하거나 더 높은 약물-유래 방사능활성의 농도로 피부를 투과한다고 나타났다. 약물-유래 방사능활성의 혈장에 대한 혈액 비율은 시간에 걸쳐서 비교적 일정하게 유지되었, < 1 였다.
- [0244] QTD 연구의 일부로서, 담즙 샘플을 투여 후 384시간 (16일)에 걸쳐 담즙관 삽관된 랫트 (4마리의 동물)로부터 수집하였다. 용량의 거의 11%가 투여 후 384시간에 걸쳐서 담즙에서 회수되었다. 이는 대변에서 발견되는 약물-유래 방사능활성의 대부분을 나타내었다.
- [0245] **실시예 5. HPLC-MS/MS에 의한 혈장 중의 달바반신의 정량적 측정**
- [0246] HPLC-MS/MS 방법을 하기와 같이 혈장 중의 달바반신의 정량적 측정을 위하여 개발하였다.
- [0247] 달바반신 교정 및 품질 대조군 기준의 준비
- [0248] 탈이온수 중에서 달바반신을 용해하여 달바반신 저장 용액을 제조하여 1000 $\mu\text{g/ml}$ 용액을 제조하고, 탈이온수로 순차적으로 희석하여 500, 50 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 용액을 제조하였다.
- [0249] 상기와 같이 제조된 달바반신 저장 용액 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 적절한 부피로 인간 혈장을 섞어서 100, 60 및 40 $\mu\text{g/ml}$ 달바반신 농도의 교정 기준을 제조하였다. 20 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 교정 기준을 인간 혈장을 적절한 부피의 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 섞어서 제조하고, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 교정 기준을 인간 혈장을 적절한 부피의 10 $\mu\text{g/ml}$ 저장 용액과 섞어서 제조하였다.
- [0250] 90 및 30 $\mu\text{g/ml}$ 달바반신의 품질 조절 기준을 인간 혈장을 적절한 부피의 상기와 같이 제조된 1000 $\mu\text{g/ml}$ 달바

반신 저장 용액과 섞어서 제조하였다. 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 품질 조절 기준을 인간 혈장을 적절한 부피의 50 $\mu\text{g/ml}$ 용액과 섞어서 제조하였다.

[0251] 내부 표준 작업 용액의 제조

[0252] A-40926의 디에틸-아미노-프로필-아미노 유도체인, 내부 표준 BI-K0098의 30 $\mu\text{g/ml}$ 작업 용액을 하기와 같이 제조하였다. 대략 10 mg의 BI-K0098를 대략 10 ml의 이동상 A (80 %의 10 mM 암모늄 포르메이트/포름산, pH 3 (v/v), 10 %의 아세트니트릴 (v/v), 및 10 % 2-프로판올 (v/v)) 중에 용해시켜, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 내부 표준 저장 용액을 제조하였다. 그후 저장 용액 (300 μl)을 이동상 A로 10 ml 부피로 희석하여 30 $\mu\text{g/ml}$ 내부 표준 용액을 제조하였다.

[0253] 분석 샘플의 제조

[0254] 샘플을 혈장 중의 달바반신 농도의 정량적 측정을 위하여 하기와 같이 제조하였다. 앞서 기재된 바와 같이, 고정 또는 품질 조절 기준의 50 μl 에, 100 μl 의 내부 표준 작업 표준 용액을 첨가하고 혼합하였다. 혼합물을 실온에서 5분 동안 평형화하도록 하고, 250 μl 의 아세트니트릴을 첨가하였다. 그후 혼합물을 10초 동안 볼텍싱하고, ALC 마이크로-원심분리기 4214에서 약 10,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. 상등액을 투명한 튜브로 이동하고, 사반트 스피드-백 시스템 (Savant Speed-Vac System)에서 약 40°C에서 증발시켜서 건조하였다. 그후 샘플을 이동상 150 μl 에서 재현탁하였다.

[0255] 분석 방법

[0256] 상기와 같이 분석을 위하여 제조한 50 μl 샘플을 페노페넥스 주피터 (Phenomenex Jupiter) C₁₈ 칼럼 (50 x 2 mm, C₁₈ 5 μm 300 Å)으로 주사하고, 0.3 ml/min 유속에서 구매 HPLC 조건 하에서 분석하였다. 구매 조건은 이하와 같다: 초기, 80 % 이동상 A/20 % 이동상 B (20 % 10 mM 암모늄 포르메이트/포름산, pH 3 (v/v), 40% 아세트니트릴 (v/v), 40% 2-프로판올(v/v)); 1분 20% 이동상 A/80% 이동상 B; 2분 20% 이동상 A/80% 이동상 B; 2.5 분, 초기 조건으로 돌아감.

[0257] HPLC 시스템을 양성 이온화 모드에서 작동하는 터보 이온 스프레이 (turbo ion spray)를 갖는 PE SCIEX API-2000 삼중 사중극자 (triple quadrupole) 질량 분석기로 연결하였다. 공기를 사용하여 이온 공급원에서 스프레이를 생성하였다. 프로브 온도를 커튼 기체 (curtain gas)로서 질소로 500 °C로 설정하였다. 충돌 체로서 질소를 사용하여 다중 반응 모니터링 (MRM)을 사용하였다. 분석물을 하기 이온 전이를 모니터링하여 검출하였다: 달바반신에 대하여 909.3 Da→1429.3 Da, 내부 표준 (BI-K0098)에 대하여 923.3 Da→1457.3 Da였다. 질량 분석기 오염을 피하기 위하여, 크로마토그래피 진행의 시작 후 제1 분에 및 2.5 분에 후-칼럼 유량 전환을 수행하였다.

[0258] 소프트웨어 샘플 조절 1.4 (Software Sample Control 1.4)를 사용하여 데이터 분석을 얻었고, 소프트웨어 맥쿠안 1.6 (software MacQuan 1.6)을 사용하여 크로마토그래피 피크의 적분 및 통계적 데이터 평가를 하였다.

[0259] 보정 곡선

[0260] 분석 방법의 선형성을 보정 표준을 분석하여 보정 곡선을 얻음으로써 측정하였다. 혈장 샘플 중의 달바반신의 농도를 달바반신과 내부 표준 사이의 피크 면적 비율을 계산하여 결정하였다.

[0261] 인간 혈장의 0.5-100 μg 달바반신/ml의 분석 범위에 걸친 달바반신 농도의 보정 곡선을 등식 $y = A + Bx$ (1/x 중량)을 사용하여 구성하였고, 여기서 A는 곡선의 절편을 나타내고, B는 곡선의 기울기를 나타내고, x는 보정 표준의 달바반신의 농도 ($\mu\text{g/ml}$)를 나타내고, y는 내부 표준에 대한 달바반신의 피크 면적비를 나타낸다. 3개의 별개의 보정 곡선을 구성하였다. 이 결과는 달바반신/내부 표준 면적비 및 달바반신 농도가 분석 범위에 걸쳐 선형으로 변화한다는 것을 나타낸다. 정량의 하한 (LLQ)는 인간 혈장 1ml 당 0.5 μg 달바반신이었다. 보정 곡선의 기울기는 재현성이 있고, 그의 상관 계수는 0.9995가 넘는다.

[0262] 혈장 중의 달바반신의 안정성

[0263] 혈장 샘플 중의 달바반신의 안정성을 1.5 및 90 $\mu\text{g/ml}$ 의 2개의 다른 농도에서 상기와 같이 제조한 인간 혈장 샘플의 3개의 리플리케이트 품질 조절 표준을 분석하여 시험하였다. 3주기의 동결-해동 처리 후에도 달바반신의 농도가 안정함을 검출하였다. 처리한 샘플의 달바반신의 농도는 실온에서 24시간 후에 안정하였다. 0시간에서의 샘플에 대하여 달바반신의 농도의 감소는 관찰되지 않았다.

[0264] 실시예 6. 달바반신 질량 분석법 분석

[0265] 용액 중의 달바반신 다중체의 본질을 조사하고, 달바반신 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율에 영향을 미치는 조건을 전자분사 이온 질량 분석법 (ESI-MS)에 의하여 결정하였다.

[0266] 양성 이온 모드에서 작동하는 삼중 사중극자 분석기, 터보 이온 스프레이 공급원이 장착된 어플라이드 바이오시스템 API III+ (Applied Biosystem API III+) 질량 분석기를 사용하여 실험을 수행하였다. 최적의 조건을 하기 표 12에서 기재하였다.

표 12

[0267] 어플라이드 바이오시스템 API III+ 질량 분석기 상에서의 달바반신 분석을 위한 기기의 조건

| 이온스프레이 공급원: | | MS 분석기: | |
|-------------------|-----------------|--------------|---------|
| 이온스프레이 전압 | 5000 V | 계면 플레이트 전압 | 650 V |
| 입구 플레이트 전압 | 80 V | Q0 로드 오프셋 전압 | 40 V |
| 커텐 기체 흐름 | 0.6 L/분 | | |
| 네블라이저 기체 흐름 | 1.2 L/분 | Q1 파크 질량 | 1000 |
| 액체 흐름 | 5 μ l/분 | Q1 분해능 | 120.8 |
| 계면 가열기 | 60 $^{\circ}$ C | | |
| | | Q1 델타 질량 | 0.2 |
| 스캔 조건 (Q1 스캔): | | Q1 로드 오프셋 전압 | 27 V |
| 단계 | 0.1 amu | 렌즈 7 전압 | -50 V |
| 정지시간 | 1 msec | Q2 로드 오프셋 전압 | -50 V |
| | | Q3 파크 질량 | 1000 |
| | | Q3 분해능 | 110 |
| | | Q3 델타 질량 | 0 |
| | | Q3 로드 오프셋 전압 | -70 V |
| | | 렌즈 9 전압 | -250 V |
| | | 파라데이 플레이트 전압 | -250 V |
| | | 채널 전자 증폭기 전압 | -3800 V |

[0268] 용액 중의 달바반신

[0269] 8:2 물:이소프로판올 용액에 용해된 0.1 mg/ml의 달바반신을 함유하는 달바반신 용액으로 기기의 파라미터를 설정하였다. 용액의 달바반신의 스펙트럼을 용액 주사 직후에 500-2000 amu 범위에서 얻었다. 도 3에서 나타난 바와 같은 결과 스펙트럼은 달바반신 다중체의 존재를 나타낸다. 비-제한적인 예로서, 스펙트럼의 흔적은 $(2nM+y)^{+3}$ 이온종으로서 존재하는 B_0 호모다중체에 기여할 수 있고, 여기서 n은 호모다중체의 다양성을 나타내는 양의 정수이고, 예를 들어 다중체가 호모이량체이면 n=1이고, 다중체가 호모사중체이면 n=2이고, M은 단량체의 질량을 나타내고, y=n 및 $^{+3}$ 은 3 이온 전하를 더한 것을 나타낸다. 예를 들어, n=1, y=1 이고 M이 B_0 의 질량일 때, B_0 의 호모이량체 종이 제공된다. 이 호모이량체 종은 질량 스펙트럼에서 $(2M)^{+3}$ 이온 흔적으로 할당되었다.

[0270] 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율에 달바반신 농도의 영향

[0271] 단량체에 대한 다중체의 모비율에 달바반신 농도의 영향은 상기 조건을 사용하여 질량 분석법에 의하여 평가하였다. 스펙트럼을 20, 40, 60 및 80 μ g/mL의 농도에서 달바반신 용액의 직접 주입에 의하여 얻었다. 주 피크의 강도를 달바반신 농도의 함수로서 나타내고, 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율을 도 4에서 나타난 바와 같이 측정하였다.

[0272] 데이터는 달바반신 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율이 농도가 증가함에 따라서 증가하는 것을 나타내었다. 이는 개체에 투여될 수 있는 높은 약물 로딩 용적을 설명하는데 도움이 될 수 있다. 단량체의 저장소로서 다중체의 역할은, 침전물을 형성하기 위한 보다 고농도의 샘플의 경향성을 감소시킬 수 있고 개체로 투여할 수

있는 농도를 증가할 수 있다. 다중체의 존재는 개체로 달바반신의 용량의 신속한 투여를 가능하게 할 수도 있다.

[0273] 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율의 측정 방법의 비-제한적 예를, 예를 들어 도 3에 나타난 이온 A와 B의 피크 강도 사이의 비율을 측정함으로써 제공하였다. 피크 A의 강도를 피크 B로 나누어서 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율의 측정치를 제공하였다.

[0274] 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율 상의 pH의 영향

[0275] 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율에의 용액 pH의 영향을 상기 기기적 조건에서 이하의 용액 pH 값에서 평가하였다: 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 및 5.5. 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율을 각각의 pH 값에서 측정하고, 도 5에 나타난 바와 같이 pH에 대하여 플로팅하였다. pH가 증가할 수록 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율이 증가한다고 측정되었다.

[0276] 이론에 치우치지 않고, 제1 달바반신 단량체에 대한 카르복실레이트기와 같은 이온성기는 제2 달바반신 단량체에 대하여 3차 질소기와 같은 반대로 대전된 이온과의 이온 상호작용을 형성하여 달바반신 다중체의 안정화를 보조한다고 믿어진다. 상기 이온 상호작용은 pH에 의하여 영향을 받을 수 있다. 보다 높은 pH에서 달바반신이 다중체로서 존재하는 경향이 증가하는 것은 이온 상호작용이 다중체 안정화에서 중요하다는 것을 나타낸다고 생각된다. 특히, 아마도 카르복실레이트기와 같은 임의의 작용기가 낮은 pH 값에서는 양성자화될 수 있기 때문에 다중체 안정성에 기여하는 이온 상호작용의 방해로 인하여 달바반신 다중체가 보다 낮은 pH에서 불안정화된다고 믿어진다.

[0277] 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율에 대한 용액 이온 강도의 영향

[0278] 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율에 대한 용액 이온 강도의 영향을 질량 분석기로 측정하였다. 울트라 마크 1621, 카페인 및 MRFA (L-메티오닐-아르기닐-페닐알라닐-아르기닌)을 사용하여 전자분사 모드에서 미리 맞추고 보정한 피크간 LCQ^{DeCa} 이온 트랩 기기 (Finnigan LCQ^{DeCa} ion trap instrument) 상에서 전자분사 양성 모드에서 질량 스펙트럼을 얻었다. 모든 질량 스펙트럼을 표 13에서 나열한 조건을 사용하여 기록하였다. 조사된 샘플 파라미터를 표 14에 나열하였다.

표 13

[0279] MS 조건

| | |
|--|-----------|
| 샘플 유입 조건 | |
| 모세관 온도 (°C) | 200 |
| 시트 기체 (Sheat gas) (N ₂ , 임의 단위) | 40 |
| 샘플 유입 전압 설정: | |
| 극성 | 양성 |
| 공급원 전압 (kV): | 4.70 |
| 모세관 전압 (V): | 34 |
| 튜브 렌즈 오프셋 (V): | -60 |
| 전체 스캔 조건: | |
| 스캔 범위 (amu): | 500-2000 |
| 마이크로스캔의 수: | 3 |
| 최대 이온 시간 (ms): | 200 |
| 줌 스캔 조건: | |
| 스캔 범위 (amu): | 1218-1228 |
| 마이크로스캔의 수: | 5 |
| 최대 이온 시간 (ms): | 50 |

표 14

[0280] 샘플 파라미터

| 샘플 | $\mu\text{g/ml}$ | 용매 | pH |
|------|------------------|------------------------------------|----|
| 달바반신 | 100 | $\text{COO}^- \text{NH}_4^+$ 5mM | 5 |
| | 100 | $\text{COO}^- \text{NH}_4^+$ 50mM | 5 |
| | 100 | $\text{COO}^- \text{NH}_4^+$ 100mM | 5 |

[0281] 샘플 물 용액을 하워드 (Harward) 주사기 펌프를 통하여 $10 \mu\text{l}/\text{분}$ 에서 주입하고, 질량 스펙트럼을 도 6-8에서 나타난 바와 같이 얻었다.

[0282] 얻어진 스펙트럼은 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율이 이온 강도에 의하여 영향을 받음을 나타내었다. 완충액 농도의 증가는 다중체 질량 흔적의 감소에 상응하며, 이로써 단량체에 대한 달바반신 다중체 모비율의 감소에 상응한다고 발견되었다.

[0283] 언급한 바와 같이, 이온 상호작용은 달바반신 다중체 안정성에 중요하다고 생각된다. 이온 강도가 증가하는 것이 다중체 질량 흔적의 강도가 감소에 관련되었다는 사실은 다중체 안정성에서의 이온 상호작용의 역할을 입증한다. 그러나, 다중체 질량 흔적은 보다 높은 이온 강도에서 존재하기 때문에, 다른 제2의 상호작용이 다중체 안정화에 포함될 수 있다.

[0284] 이론에 치우치지 않고, 소수성 상호작용이 달바반신의 다중체 중을 안정화하는데 중요하다고 생각된다. 이러한 비-공유 달바반신 다중체의 안정화가 단지 이온 상호작용 때문이라면, 이온 강도가 증가하면 다중체 질량 중의 전체 손실이 야기될 것이라고 예측할 수 있다. 즉, 용액의 이온 강도가 증가하면, 단량체가 더욱 쉽게 연합하여, 다중체를 안정화하는 이온 상호작용이 용액 중의 이온 집단의 증가에 의하여 파괴된다고 예측될 것이다. 결과적으로, 용액 이온 강도는 다중체를 단량체 성분으로 해리되도록 할 것이며, 결과 질량 스펙트럼은 임의의 다중체 질량 흔적이 없을 것이다. 그러나, 높은 용액 이온 강도 (예를 들어, 100 mM 암모늄 포르메이트)에서도, 달바반신의 존재는 질량 스펙트럼에서 검출되었다. 따라서, 달바반신의 다중체는 적어도 부분적으로 소수성 상호작용에 의하여 안정화될 것이다.

[0285] 구조적으로 유사한 화합물

[0286] 달바반신의 개선된 효능은 부분적으로 다중체를 형성할 수 있는 그의 능력에 기인한다고 믿어진다. 이 독특한 특징은 매우 구조적으로 유사한 화합물도 공유되지 않는다고 생각된다. 달바반신과 유사한 화학 구조를 갖는 화합물을 다중체를 형성하는 그의 능력에 대하여 질량 분석법 분석을 하여 조사하였다. 울트라마크 1621, 카페인 및 MRFA (L-메티오닐-아르기닐-페닐알라닐-아르기닌)을 사용하여 미리 맞추고 전자분사 모드에서 보정한 피니간 LCQ^{DeCa} 이온 트랩 기기 상의 전자분사 양성 모드에서 질량 스펙트럼을 얻었다. 모든 질량 스펙트럼을 표 15에서 나열한 조건을 사용하여 기록하였다. 조사된 샘플 파라미터를 표 16에 나열하였다. 샘플 물 용액을 하워드 주사기 펌프를 통하여 $10 \mu\text{l}/\text{분}$ 에서 주입하였고, 질량 스펙트럼을 도 9 및 10에서 나타난 바와 같이 얻었다.

표 15

[0287] 질량 스펙트럼 조건

| | |
|---|------|
| 샘플 유입 조건 | |
| 모세관 온도 ($^{\circ}\text{C}$) | 200 |
| 시트 기체 (Sheat gas) (N_2 , 임의 단위) | 40 |
| 샘플 유입 전압 설정: | |
| 극성 | 양성 |
| 공급원 전압 (kV): | 4.70 |
| 모세관 전압 (V): | 34 |
| 튜브 렌즈 오프셋 (V): | -60 |

| | |
|------------------|-----------|
| 전체 스캔 조건: | |
| 스캔 범위 (amu): | 500-2000 |
| 마이크로스캔의 수: | 3 |
| 최대 이온 시간 (ms): | 200 |
| 줌 스캔 조건: | |
| 스캔 범위 (amu): | 1218-1228 |
| 마이크로스캔의 수: | 5 |
| 최대 이온 시간 (ms): | 50 |

표 16

샘플 파라미터

| 샘플 | $\mu\text{g/ml}$ | 용매 | pH |
|--------|------------------|------------------|-------|
| 테이코플라닌 | 50 | H ₂ O | n. a. |
| | 100 | H ₂ O | n. a. |

n. a.=조절되지 않음

유사한 글리코펩티드 항생제 (테이코플라닌)는 다양한 농도에서 용액중의 다중체 복합체를 나타내지 않았다. 이는 구조적으로 유사한 화합물이 용액 중에서 다중체 종을 형성하지 않으며, 이 현상이 달바반신의 활성에서 중요한 역할을 한다는 것을 뒷받침한다.

실시예 7. 단백질-달바반신 복합체의 기질-보조 레이저 비행 시간 (말디-토프 (MALDI-TOF)) 질량 분석기

10 μL HSA (0.150 mM)을 10 μL 달바반신 용액 (0.075 mM, 0.15 mM, 0.3 mM 및 1.5 mM에서 얻음)과 혼합하고, 37 °C에서 60 분 동안 인큐베이션하였다. 건조 소적 (droplet) 방법을 사용하여 분석을 위하여 샘플을 제조하였다. 스펙트럼을 표준 소 혈청 알부민을 사용하여 미리 맞추고 보정한 코프 질량 분석기 브루커 플렉스 III (BRUKER FLEX III) 상에서 얻고, 200 레이저 샷에 의하여 형성된 스펙트럼을 얻어서 평균내었다. 기질: 아세트 니트릴/H₂O (50:50)중에 포화된 DHB-9 (2,5-디히드록시-벤조산) 9부, 아세트니트릴/H₂O (50:50)중에 포화된 시나편산 1부. 샘플 용액 0.5 μL 및 기질 용액 0.5 μL 을 혼합하고 레이저 표적 상에 위치시켰다.

달바반신은 단량체로서 단백질에 결합하였다 (1 HSA + 1 달바반신). 단백질에 대한 매우 높은 달바반신 비율 (1:2, 1:10)에서, 단백질 분자 당 2 몰의 달바반신을 함유하는 복합체의 존재를 관찰할 수 있었다.

실시예 8. 인간 혈청 알부민의 존재시에 N,N'-디아세틸-Lys-D-Ala-D-Ala로의 달바반신의 결합의 등은 적정 열량측정

달바반신의 세포-벽 표적의 펩티드 유사체인 N,N'-디아세틸-Lys-D-Ala-D-Ala으로의 달바반신의 결합을, 25 °C에서 농도의 범위 (600 μM 이하)에 걸쳐서 HSA의 존재시에 등은 적정 열량측정으로 조사하였다 (37 °C에서 일부 추가 측정). HSA는 달바반신의 용해도를 증가시키고, 트리-펩티드 리간드에 있어서 그의 결합 친화도를 감소시켰다. 결과를 반코마이신의 결과와 비교하였다. 관찰된 효과는 비교적 낮은 HSA 농도에서 안정수준에 도달하였으며, 이는 용액 중에 달바반신이 없는 용액에 또한 달바반신-HSA 복합체에 (보다 약하게) 달바반신에 리간드가 결합하도록 하는 비-경쟁적 결합 모델과 일치한다.

혈청 단백질이 없을 때, 예비 실험은 달바반신 및 반코마이신이 유사한 결합 프로파일을 나타낸다고 밝혔다: 둘 다 N,N'-디아세틸-Lys-D-Ala-D-Ala에 발열성 결합을 하며, 디펩티드 (D-Ala-D-Ala) 또는 Lys-D-Ala-D-락테이트에는 결합의 증거가 없다. 달바반신/트리-펩티드 상호작용에 대하여, 데이터는 동일한 조건 하의 반코마이신과 유사하게 온도에 따라서 $K_{\text{diss}}=1-10 \mu\text{M}$ 인 결합과 일치하였다. HSA의 존재시에, 달바반신의 용해도는 현저하게 증가하였고, 트리펩티드에 대한 결합 친화도는 항생제에 대한 HSA의 경쟁적 또는 비-경쟁적 결합과 일치하는 방식으로 감소하였다. 본 실시예에 기재된 실험은 (a) 다른 온도 (25 및 37 °C)에서 다른 HSA 농도에서 달바반신/트리-펩티드 측정을 비교하고; (b) 이러한 데이터를 관찰된 수와 비교하는 결합 모델을 구성하는데 사용하기 위하여 고안하였다.

달바반신은 바이오서치 이탈리아 (Biosearch Italia)에서 공급받았다. 다른 시약은 시그마 (Sigma)로부터 얻었

다: 반코마이신 염산염 (시그마 V-2002, fw 1485.7), N,N'-디아세틸-Lys-D-Ala-D-Ala (시그마 D-9904, fw 372.4), 인간 알부민 (HSA; 시그마 A-3782; mw 69,366).

[0298] 항생제 및 펩티드를 실험 직전에 온화하게 교반하면서, HSA를 함유하는 수성 완충액 (20 mM Na 포스페이트, 150 mM NaCl, pH 7.4)에 용해시켰다. 펩티드 농도를 중량에 따라서 측정하였다. 달바반신 농도를 중량 또는 몰 흡광계수 $\epsilon = 12430$ (달바반신, $A_{280}^{1\%} = 68.42$), $\epsilon_{280} = 6690$ (반코마이신)을 사용하는 UV 흡광도로 측정하였다. HSA 농도를 UV 흡광도 (HSA, $\epsilon_{280} = 37,700$; $A_{280}^{1\%} = 5.44$)로 측정하였다. 0.1-1 A 범위에서 흡광도를 얻기 위하여 필요한 경우 완충액으로 정량적으로 희석한 샘플로, 스펙트럼을 시마주 (Shimadzu) UV-160A 또는 UV-1601 분광기를 사용하여 실온에서 1cm 경로길이 석영 큐벳 중에서 측정하였다.

[0299] 등은 적정 열량측정을 표준 작동 과정을 사용하여 25°C 및 37°C에서 마이크로칼 VP-ITC 기기를 사용하여 수행하였다. 예를 들어, 문헌[Wiseman et al., *Anal. Biochem.* (1989) 179, 131-137]; [Cooper, et al., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A-Math. Phys. Eng. Sci.* (1993) 345, 23-35]; [Cooper, A., *Isothermal Titration Microcalorimetry* in C. Jones, B. Mulloy and A. H. Thomas (Eds.), *Microscopy, Optical Spectroscopy, and Macroscopic Techniques*. Humana Press, Totowa, NJ, (1994) p 137-150]; [Cooper, A., *Microcalorimetry of Protein-protein Interactions* in J. E. Ladbury and B. Z. Chowdhry (Eds.)]; [Biocalorimetry: The Applications of Calorimetry in the Biological Sciences. Wiley, (1998) p 103-111]; 및 [Cooper, A., *Curr. Opin. Chem. Biol.* (1999) 3, 557-563]을 참조. 열량계 셀 내의 기포 형성을 방지하기 위하여 로딩 전에 샘플에서 온화하게 기체를 제거하였다. 각 실험은 통상적으로 항생제 용액 (~20-100 μ M)을 함유하는 열량계 셀 (부피 ~1.4 ml)로의 펩티드 용액 (~1 mM) 25 x 10 μ l 주사를 포함한다. 대조 실험은 펩티드 희석열을 측정하기 위한 동일한 조건 하에서 완충액으로 리간드를 주사하는 것을 포함하고, 이러한 값을 사용하여 분석하기 전에 기초 결합 데이터를 교정하였다. 달바반신/트리-펩티드 결합 실험을 각 온도에서 수 회 반복하였다. ITC 결합 데이터를 결합 부위의 결합 수 (N), 결합 친화도 ($K_{ass} = 1/K_{diss}$) 및 결합 엔탈피 (ΔH)를 결정하기 위하여 표준 마이크로칼 오리진 (Microcal ORIGINTM) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

표 17

비-협력 결합 모델을 가정하여 ITC에 의하여 측정되는 달바반신 및 반코마이신으로의 트리-펩티드 결합의 열역학적 데이터: 온도 및 HSA의 영향.

| | T °C | N | K _{ass} M ⁻¹ | K _{diss} μM | ΔH kcal/mol | ΔS eu | [HSA] μM |
|--------|---------|------|-------------------------------------|-------------------------|----------------|----------|-------------|
| 달바반신 | 10 | 0.59 | 6.70E+05 | 1.49 | -10.26 | -9.60 | 0 |
| | 10 | 0.59 | 9.20E+05 | 1.09 | -8.95 | -4.30 | 0 |
| | 10 | 0.59 | 6.85E+05 | 1.46 | -10.30 | -9.60 | 0 |
| | 10 | 0.56 | 6.24E+05 | 1.60 | -10.30 | -9.90 | 0 |
| | 25 | 0.6 | 3.13E+05 | 3.19 | -10.10 | -8.90 | 0 |
| | 25 | x | 3.30E+05 | 3.03 | -11.30 | -12.60 | 0 |
| | 25 | x | 3.20E+05 | 3.13 | -11.70 | -14.00 | 0 |
| | 25 | x | 2.80E+05 | 3.57 | -14.30 | -23.00 | 0 |
| | 25 | 0.57 | 3.03E+05 | 3.30 | -12.60 | -17.00 | 0 |
| | 25 | 0.74 | 3.19E+05 | 3.13 | -11.20 | -12.50 | 0 |
| | 25 | 0.54 | 3.93E+05 | 2.54 | -12.90 | -17.60 | 0 |
| HSA 존재 | 25 | 0.37 | 1.18E+05 | 8.47 | -26.40 | -65.50 | 13.6 |
| HSA 존재 | 25 | 0.35 | 1.18E+05 | 8.47 | -27.80 | -70.10 | 13.6 |
| HSA 존재 | 25 | 0.68 | 3.50E+05 | 28.57 | -20.00 | -46.20 | 34.2 |

[0300]

| | | | | | | | |
|--------------|----|-------|---------|--------|--------|---------|------|
| | | | 4 | | | | |
| HSA 존재 | 25 | 0.83 | 2.76E+0 | 36.23 | -16.90 | -36.50 | 80.7 |
| | | | 4 | | | | |
| HSA 존재 | 25 | 1.38 | 3.49E+0 | 28.65 | -18.60 | -41.70 | 104 |
| | | | 4 | | | | |
| HSA 존재 | 25 | 0.9 | 3.10E+0 | 32.26 | -21.05 | -50.00 | 288 |
| | | | 4 | | | | |
| HSA 존재 | 25 | 1.242 | 2.84E+0 | 35.21 | -19.50 | -44.90 | 430 |
| | | | 4 | | | | |
| HSA 존재 | 25 | 0.86 | 2.18E+0 | 45.87 | -15.00 | -30.40 | 601 |
| | | | 4 | | | | |
| | 37 | 0.82 | 1.30E+0 | 7.69 | -12.50 | -16.80 | 0 |
| | | | 5 | | | | |
| | 37 | 0.6 | 1.10E+0 | 9.09 | -17.40 | -33.20 | 0 |
| | | | 5 | | | | |
| HSA 존재 | 37 | 0.179 | 1.25E+0 | 80.00 | -98.60 | -299.00 | 482 |
| | | | 4 | | | | |
| HSA 존재 | 37 | 0.5 | 9568 | 104.52 | -26.60 | -67.60 | 516 |
| | | | | | | | |
| <u>반코마이신</u> | 10 | 1.1 | 6.90E+0 | 1.45 | -9.49 | -6.80 | 0 |
| | | | 5 | | | | |
| | 25 | 0.91 | 3.40E+0 | 2.94 | -10.70 | -10.60 | 0 |
| | | | 5 | | | | |
| | 25 | 0.97 | 3.60E+0 | 2.78 | -12.90 | -17.80 | 0 |
| | | | 5 | | | | |
| HSA 존재 | 25 | 1.05 | 2.90E+0 | 3.45 | -10.09 | -8.80 | 513 |
| | | | 5 | | | | |

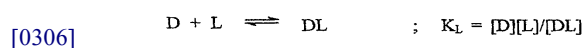
[0301]

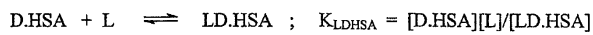
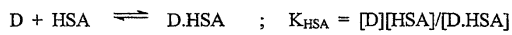
[0302] HSA 부재시의 달바반신으로의 트리-펩티드의 결합에 대한 ITC 실험으로 10, 25 및 37 °C 각각에서 1.4, 3.1 및 8.4 μM의 영역에서의 평균 K_{diss} 를 갖는 결합 친화도에 대한 일정한 데이터를 얻었다 (표 17). 결합은 발열성이었다. 여기서의 농도 계산은 이러한 조건 하에서 N이 0.5에 근접하다는 것을 나타내었다. 이는 이러한 조건 하에서 달바반신 이량체 당 하나의 트리-펩티드 분자의 결합과 일치하였다. 이러한 결합 친화도 및 결합 엔탈피는 동일한 조건 하에서의 반코마이신에서 관찰되는 것과 필적하였다 (표 17 및 문헌[D. McPhail, A. Cooper, *J. Chem. Soc. - Faraday Trans.* (1997) 93, 2283-2289]). 또한 반코마이신이 보다 높은 농도에서 리간드-유도 이량체화된다는 것을 지지한다.

[0303] 결합은 명백하게 더욱 발열성이었으나, 달바반신 혼합물에 HSA를 첨가하면 트리-펩티드와 달바반신 사이의 겔보기 결합 친화도가 감소하였다 (표 17). 25 °C에서 이에 대한 HSA 농도 의존성을 표 11에서 나타내었다. 35 μM 이하의 겔보기 K_{diss} 의 HSA초기 상승 (약화) 후에, 생리학적 수준 (600 μM)에 접근하는 보다 높은 HSA 농도에서 비교적 일정하였다. 보다 높은 농도의 HSA (K_{diss} ~35 μM)에서의 안정 수준은 HSA 부재 시보다 약 10-12 배 약한 결합 친화도에 해당한다. 37 °C에서도 유사한 감소가 나타났다.

[0304] HSA 효과는 트리-펩티드와의 상호작용에 기인하지 않는다. HSA 존재시의 트리-펩티드로의 반코마이신의 결합에 대한 대조군 ITC 실험은 HSA 부재시에 나타나는 것에 필적하는 결과를 얻었다 (표 17 참조). 이는 근접한 관련 항생제, 반코마이신과 펩티드 둘다, 용액 중의 HSA와 상호작용하지 않는다는 것을 나타내었다. 이는 달바반신/트리-펩티드 상호작용에 대한 HSA의 임의의 효과가 HSA와 달바반신 사이의 상호작용 때문일 것이다.

[0305] 이론에 치우치지 않고, 상기 데이터는 비-경쟁적 결합 모델에 일치한다. 이 모델은 트리-펩티드 리간드 (L)가 유리 상태에서 또한 (다른 친화도일 수 있는) 달바반신-HSA 복합체 중에서 달바반신 (D)에 결합할 수 있다는 것을 가정한다.





[0307]

[0308]

겔보기 (관찰된) 리간드 결합 해리 상수 (비-경쟁적):

$$K_{app,L} = [\text{전체 D}][L]/[\text{전체 DL 복합체}]$$

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

[0309]

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

[0310]

이는 유리 HSA 농도에 대한 $K_{app,L}$ 의 쌍곡선과 같은 의존성을 나타내고, 관찰된 데이터와 잘 맞는다 (도 11). 높은 [HSA]에서, 이는 점근성 (안정) 값에 도달한다.

[0311]

$K_{app,L} = K_{LDHSA}$ (많은 [HSA])

[0312]

이는 트리-펩티드에 대한 결합 친화도가, 달바반신이 없을 때 3 μ M에 비교하여, 달바반신이 HSA에 결합할 때 약 35 μ M라는 것을 암시하였다 (25 $^{\circ}$ C 도면).

[0313]

달바반신이 펩티드 또는 단백질과의 그의 상호작용에서 단량체 또는 이량체로서 작용하는지의 측면에서 추가의 작용기전을 제시할 수 있다. 반코마이신과 달바반신을 직접 비교하면 (이러한 저농도에서 명백한 1:1 결합을 나타냄), 달바반신에 대한 낮은 몰비 (낮은 N)에서 결합이 완결된다는 것을 나타낸다. 이는 2:1 달바반신:펩티드 복합체와 일치한다.

[0314]

그러나, HSA 존재시에 겔보기 N 값은 증가하고 (표 17), 1:1 복합체화와 더욱 일치할 수 있다. 이론에 치우치지 않고, 달바반신 단량체 및 이량체의 트리-펩티드 리간드 및 HSA와의 가능한 상호작용을 나타내는 도 13에 나타난 모델은 이러한 관찰과 일치하였다. 도 13A는 용액 중의 단량체-이량체 평형 (이량체가 우세)에서의 달바반신이면서 HSA의 2개의 별개의 부위로 단량체로서 결합을 표시하였다. 이는 달바반신으로의 혈청 단백질의 결합에 대한 ITC에 의하여 관찰되는 $N = 0.5$ 값과 일치하였다 (실시예 3). 도 13B는 용액 중에 달바반신 이량체로의 리간드 결합, 및 HSA에 부착된 달바반신 단량체로의 (보다 약한) 결합을 표시하였다. 다양한 겔보기 화학양론적으로, 이는 트리-펩티드 및 HSA 둘다로의 달바반신의 비-경쟁적 결합과 일치한다.

[0315]

요약하면, 이 실시예는 HSA가 비-경쟁적 작용기전과 일치하는 방식으로 트리-펩티드 리간드에 대한 달바반신의 결합 친화도를 감소시키고, 감소된 친화도이기는 하지만 HSA에 결합된 달바반신이 트리-펩티드 리간드에 결합하는 그의 능력을 유지한다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 달바반신이 펩티드 리간드에 대한 다중체의 강한 친화도를 가지고, 용액 중에 다중체가 우세한 단량체-다중체 평형인 모델과도 일관된다. 유리된 및 혈청 알부민에 결합된 달바반신 단량체 모두는 감소된 친화도로 펩티드에도 결합할 수 있다.

[0316]

실시예 9. A-40926 및 달바반신 제조

[0317]

발효에 의하여 제조된 천연 글리코펩티드인 A-40926는 달바반신 제조의 출발 물질이다. A-40926 및 그의 아세틸 유도체의 혼합물로서 노노무리아 종 (*Nonomuria sp*) ATCC 39727에 의하여 제조하였다 (미국 특허 번호 제 4,935,238호 및 문헌[B. Golstain et al. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, Dec. 1987, p. 1961-1966] 참조). 우선 아세틸 유도체를 A-40926로 탈아세틸화하였다. 탈아세틸화 후에, A-40926를 하기 폴리아미드 상에서 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다. 이하의 기재는 현재의 제조 방법의 대표적인 것이다. 여기서 기록된 양은 산업적 제조에서 보통 사용되는 양의 약 1/4이다.

[0318]

A-40926의 탈아실화

[0319]

NaOH 30 %와 pH 11.4에서 교반하면서 전체 약 1 g/L의 A-40926 및 그의 아세틸 유도체를 함유하는 발효 브로쓰 (23 $^{\circ}$ C)의 10 m³을 조절하였다. 교반은 6시간 동안 계속하였고, 그후 온도를 15 $^{\circ}$ C로 낮추고, 브로쓰를 마이크로여과하였다 (0.12 m² 세라믹 멤브레인 0.1 μ 를 갖는 코흐 프로토셉 IV 마이크로여과기 (Koch Protosep IV Microfilter)). 마이크로여과 중에, 과정 종결시에 20-25 m³의 투과액 및 4.5-5 m³의 정체액 (출발 값의 절

반)을 얻기 위하여 정제액에 물을 계속 첨가하였다.

- [0320] A-40926을 함유하는 투과액을 HPLC로 분석하였다. 탈아세틸화가 완결되면, 투과 용액의 pH를 황산 (20 ℃에서 보관)으로 7로 조절하였다. 본 실시예에서, 6.62 Kg의 A-40926 (268 mg/L)을 함유하는 여과된 브로쓰 25m³를 얻었다. 탈아세틸화 수율은 66.2 %였다. 마이크로여과 과정을 이 과정에서 사용되는 것보다 긴 시간 동안 보다 높은 추출 부피에서 수행하는 경우, 수율은 90 %까지 증가할 수 있다.
- [0321] 폴리아미드 칼럼 상에서의 A-40926의 정제
- [0322] 추출 후에, 여과된 브로쓰에 함유된 A-40926를 하기아 같이 폴리아미드 칼럼 상에서 정제하였다. 이 기재에 기록된 양은 산업적 제조에서 일반적으로 수행되는 양의 약 1/10이고, 현재 제조 방법의 대표적인 것이다.
- [0323] 500 L의 폴리아미드 수지 SC6 (마체레이 나겔 (Macherey Nagel)에서 얻음)을 탈염수 중에 현탁하고, 칼럼에 로딩하였다. 그 후 800 L의 물 중에 소듐 카르보네이트 4 Kg을 용해하고 결과 용액을 아세트산으로 pH를 조절하여 제조된 완충 용액 2 BV (충전 부피 (bed volume))이상으로 칼럼을 용리하여 수지를 pH 6-6.5으로 조절하였다.
- [0324] A-40926 여과 브로쓰 (9000 L; 분석 0.275 mg/L; A-40926 2475 g; pH 6±0.2; 온도 10±3 ℃)를 수지 1리터 당 약 5 g의 활성에서 칼럼 상으로 로딩하였다. 칼럼을 이하의 용액으로 세척하였다: 1500 L의 탈염수 중에 7.5 Kg의 소듐 카르보네이트를 용해하고 아세트산으로 pH를 조절하여 제조한 pH 6의 용액 3 BV (1500 L); 2000 L의 탈염수 중에 10 Kg의 소듐 카르보네이트를 용해하고 아세트산으로 pH를 조절하여 제조한 pH 8의 용액 4 BV (2000 L); 750 L의 탈염수 중에 4 Kg의 소듐 카르보네이트를 용해하고 아세트산으로 pH를 조절하여 제조한 pH 9의 용액 1.5 BV (750 L).
- [0325] 2000 L의 탈염수 중에 10 Kg의 소듐 카르보네이트를 용해하고 아세트산으로 pH를 조절하여 제조한 완충 용액 (pH 10)의 4 BV (2000 L)로 용리하여 칼럼으로부터 A-40926를 회수하였다. 정제 A-40926를 함유하는 분획 (0.5 g/L 초과와 A-40926 농도 및 80% 초과와 주성분 (B₀+B₁)의 HPLC 면적%)를 수집하고, 1N HCl로 중성화하고, HPLC로 분석하였다. 약 2000 L의 최종 투명한 용액을 얻었다.
- [0326] 정제에 사용되는 수지를 이소프로판올/5 % NaOH의 1:1 혼합물 1.5 BV로 재생시키고, 이어서 탈염수 1.5 BV로 세척하였다.
- [0327] A-40926 농축
- [0328] 용액 중의 무기염 대부분을 제거하기 위해서, 칼럼으로부터 얻은 용액을 몇 순환의 회석/농도 단계를 거치게 했다. 250 D의 컷-오프를 가진 멤브레인을 사용하는 나노여과에 의해 용액을 80 L로 농축하였고, 80 L의 탈염수로 회석하였으며, 나노여과에 의해 출발 부피 (80 L)로 재농축하였다. 이러한 조작을 5회 이상 반복하였다. 최종 용액 (80 L, pH 7.5)의 pH를 23 % HCl로 pH 6.3으로 조절하였다. 그 후에, 용액을 80 L의 아세톤으로 회석하였고, 그 용액의 pH를 23 % HCl로 pH 2.6으로 다시 조절하였다.
- [0329] 탈색
- [0330] 680 g의 차콜 PA 200 C (~0.3 g/g A-40926)를 위 단계에서 얻어진 용액(160 L)에 교반하면서 첨가하였다. 교반을 30분 이상 동안 실온에서 계속하고, 그 후 약 0.5-0.6 Kg의 여과 보조제 (DIF-B0)를 첨가하였다. 혼합물을 여과 카트리지를 통해 여과하였다. 아세톤을 10% 미만으로 줄이기 위해서, 얻어진 투명한 용액을 진공하에서 (45 ℃)하에서 농축하였다. 최종 부피는 약 100 L이었다. 그 후, pH를 수성 NaOH으로 6.7로 조절하였고, 일반적인 나노필터를 사용하여 A-40926 농도가 약 100 g/L이 될 때까지 농축 단계를 계속하였다. 20 L의 농축 용액 (A-40926 1884 g, 94.2 g/L)을 얻었다.
- [0331] 침전 및 건조
- [0332] 이전 용액을 20 L의 아세톤으로 교반하면서 회석하였고, 그 용액의 pH를 10 % HCl로 5.1로 조절하였다. 이 용액에 추가로 5 부피의 아세톤 (100 L)을 첨가하여 A-40926 침전을 완성하였다. 만약 이 시점에서 물 성분이 15% 미만이면, 추가적인 아세톤을 첨가하였다. 2시간 후에, 현탁액을 원심분리하였고, 고체를 3 x 10 L의 신선한 아세톤으로 세척하였다. 모액을 분석하였고, 생성물의 부재를 확인한 후에 배출하였다.
- [0333] 고체 A-40926를, 잔여 아세톤이 2 % 미만이고 물이 10% 미만인 될 때까지 감압 하에서 30-35℃에서 정적 건조기 (static drier)에서 건조시켰다. 그 후, 생성물을 50 메쉬 체로 걸러서, 2.08 Kg의 정제된 A-40926 (HPLC 분석 81.4 %; 물 6.2 %; 황산회분 4.8 %)을 얻었다. 칼럼에 로딩된 활성으로부터 출발한 수율은 68.4 %였다.

- [0334] **달바반신의 합성**
- [0335] 문헌[Malabarba and Donadio (1999), Drugs of Future, 24 (8): 839-846]에 기재된 바와 같이 3-단계 합성을 통해서 달바반신(BI-397)을 천연 글리코펩티드 A-40926로부터 제조하였다. 특히, A-40926은 에스테르화 단계로 MA를 제조하는 첫번째 물질이며, 그후 이를 아미드화하여 MA-A-1를 제조였다. 그후에, 최종 가수분해 단계는 MA-A-1를 달바반신으로 전환하였다.
- [0336] **에스테르화 단계(단계 1)**
- [0337] 하기 기재는 현재 사용되는 방법을 대표한다.
- [0338] H₂SO₄ 96 %/MeOH (용액 A)의 제조
- [0339] 기계적 교반기 및 온도계가 장착된 15 L 둥근바닥 플라스크에, 2.28 L의 H₂SO₄ 96% (A-40926 분말 1Kg당 H₂SO₄ 96% ~300 mL)을 7.9 L의 MeOH에 적가하였다. 외부 얼음 수조를 사용하여 온도를 0℃ 내지 5℃ 사이로 유지하였다.
- [0340] 반응 과정
- [0341] 출발 물질 A-40926 (7.6 kg; 배치 019, 분석 85.09 %; 활성 6.46 kg; 3.73 mol)을 MeOH (46 L) 중의 140 L 유리내벽 (glass-lined) 반응기에서 현탁하였으며, 결과 현탁액을 0℃ ± 2℃에서 냉각하였다. 이 온도에서, 현탁액을 이전에 제조된 용액A (H₂SO₄/MeOH)으로 처리하였다. 결과 용액을 22 내지 26시간 동안 0℃에서 교반하였고, 그 동안 반응 (1:1 아세트니트릴/물 혼합물로 100배 희석된 반응 분취량)을 HPLC 분석으로 매 2시간마다 모니터링하였다. 잔여 A-40926가 5% 미만인 되고 디에스테르가 HPLC 영역 %의 10 % 이하일 때 에스테르화가 완성된 것으로 생각하였다.
- [0342] 에스테르 (MA) 분리
- [0343] 반응이 완결되었을 때, 혼합물을 -5 °C (+/-2 °C)에서 냉각하였고, 온도를 5 °C 미만으로 유지하면서 동일한 부피의 냉수 (54 L)로 희석하였다. 생성물(MA)을, 10.2 L의 트리에틸아민 (TEA)를 천천히 첨가하여 용액의 pH를 5.5 (+/-0.2)로 조절함으로써 침전시켰다. 교반을 추가로 한 시간 동안 0-2℃에서 계속한 후에, 얻어진 고체를 원심분리하고, 물 (A-40926 1 Kg당 10 L)로 세척하였고, 마지막으로 이전에 10-15℃에서 냉각시킨 MeOH (출발 A-40926 1Kg 당 3 L의 MeOH)로 세척하였다. MA로부터 황산염을 제거하기 전에 물로 세척하는 것을 수행하였다.
- [0344] 만약 1-2 % 미만의 활성을 함유한다면, 모액과 세척액을 분리해서 분석하였으며 배출하였다. 남아있는 물이 10 % 미만인 될 때까지, 생성물을 35-40 °C(외부 온도)에서 진공 (50 mmHg)에서 건조하였다. 7.6 Kg의 MA (5.63 kg 활성, 3.23 mol)를 갈색 분말로 얻었다.
- [0345] 분석은 이하의 값들을 나타내었다; HPLC 영역 %: MA 89.8, A-40926 3.2, 디에스테르 유도체 5.9. HPLC 분석은 74.2 %, 활성 5.637 Kg; 3.23 mol; 수율 = 86.5 %였다. 이 물질을 임의의 추가적인 정제 없이 이하의 단계에서 사용하였다.
- [0346] **아미드화 단계 (단계 2)**
- [0347] 이하의 설명은 현재의 제조 방법을 대표한다.
- [0348] DMFO/HCl 혼합물 (용액 B)의 제조
- [0349] DMSO (1.6 L)를 기계적 교반기 및 온도계가 장착된 10 L 둥근 바닥 플라스크에 놓았고, 10 °C 미만에서 얼음 수조에서 냉각시켰다. 그 후에, 혼합물의 온도를 25℃ 미만으로 유지시키면서 HCl 37% (1 L)을 교반하면서 천천히 첨가하였다.
- [0350] 아미드화 과정 (MA-A-1의 생산)
- [0351] 출발 물질 MA 5.95 kg (분석 76.3 %, KF 8.9 %; 2.68 mol)을, 실온에서 19.2 L의 1:1 DMSO/MeOH 혼합물 (~1.6 L DMSO 및 MA 분말 1Kg 당 1.6 L의 MeOH)에서 교반하면서 천천히 용해시켰다. 1시간의 교반 후에, 709 mL의 3-(디메틸아미노)-프로필아민 (DMEPA, MW 102.1; 밀도 = 0.812 g/mL; 5.63 mol; 출발 MA 1 몰당 1.96 몰) 및 325 g의 1-히드록시벤조트리아졸 수화물 (HOBT H₂O; MW 153.1; 2.04 mol; 출발 MA 1몰당 0.71 몰)을 반응 혼합

물에 첨가하였다. 완성된 용액이 얻어질 때까지 교반을 계속하고, 그후 약 2.0 L의 용액 B (DMSO/HCl)를 천천히 첨가함으로써 혼합물을 pH 3-3.1 (물로 반응의 분취량을 10배 희석한 후에 측정하였음)로 조절하였다.

[0352] 4.1 L의 1:1 DMSO/MeOH 혼합물에 1.03 Kg의 DCC (4.99 mol; MW 206.3; MA 1 몰당 1.74몰)을 용해시킴으로써 제조된 디시클로헥실카르보디아미드(DCC) 용액을 10분 내에 교반된 반응 혼합물에 첨가하였다. 교반을 5시간 동안 계속하고, 그후 이소우레아의 수준을 4-5 % 미만으로 유지하면서 잔여 MA를 5% 이하로 낮추기 위해서 추가로 51.5 g의 고체 DCC (0.25 mol)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 이소우레아는 과량의 DCC와 달바반신의 추가적인 반응에 의해 발생된 1군의 부산물이다.

[0353] 통상적으로 추가 2 시간 (총 7시간) 후에, 반응을 완결하였다. 임의의 잔여 DCC를 제거하기 위하여, 마지막에 혼합물을 물 (60 L)로 희석하여 DMSO 농도를 15 % (v/v)로 낮추고 HCl 1 N (0.85 L)로 pH 2.3로 조절하였다.

[0354] MA-A-1의 달바반신으로의 가수분해 (단계 3)

[0355] 30분 후에, 혼합물을 15 % NaOH (8 L)로 pH 12.0-12.1로 조절하였다. 혼합물을 NaOH 15 %을 소량 첨가하여 이 pH에서 유지시키면서, 교반을 4 시간 동안 계속하였다. 이 시간 후에, 잔여 MA-A-1는 HPLC 영역 %로서 0.2 % 미만이었다.

[0356] 그후, 혼합물을 1N HCl (19 L)로 pH 3.0로 산성화하였고, 현탁액을 여과하여 생성된 디시클로헥실우레아를 제거하였다. 고체 케이크를 필터 상에서 탈염수 (2 x 20 L)로 세척하였다. HPLC로 분석된 투명 용액을 얻으면서 세척액과 여과액을 함께 모았다. 21.74 g/L의 달바반신 (총 활성 3322 g; 1.828 mol, 수율 = 68.2 %)을 함유하는 152.8 L의 용액을 얻었다.

[0357] 달바반신의 정제

[0358] 이하의 기재는 현재 제조 방법을 대표한다.

[0359] 가수분해 단계로부터 얻어졌으며 3322 g의 달바반신 활성을 함유하는 152.8 L 용액을 두 부분으로 나누었고, 각각을 400 L의 폴리아미드를 함유하는 동일한 크로마토그래피 칼럼 상에서 분리하여 정제하였다. 이 2종의 정제 과정에서 활성/수지 비율은 각각 4.3 및 4.0 g/L이었다.

[0360] 폴리아미드 칼럼 제조

[0361] 400 L의 폴리아미드 수지를 함유하는 유리 내벽 칼럼 (내경= 40 cm, h = 320 cm)을 수지 재형성 과정 (이하 참조)에 따라서 세척하였고, 4 L의 AcOH (pH = 3.2)로 산성화된 2 BV (800 L)의 탈염수로 조절하였다.

[0362] 제1부의 정제

[0363] DMSO 용량을 5% (v/v) 아래로 낮추기 위하여 76.4 L의 출발 용액의 제1부를 H₂O (56 L)로 희석하고, 1 N HCl (3.4 L)로 pH 2.78로 산성화하였다. 그 후에, 이 용액을 150 L/h의 유속으로 칼럼 상에 로딩하였다. 로딩 후에, 수지를 이하의 용액으로 세척하였다: AcOH (8 L), pH = 3.2로 산성화된 4 BV (1600 L)의 H₂O; AcONa 0.1 M (pH = 8.2)의 5 BV (2000 L); AcOH (1 L), pH = 3.2로 산성화된 1 BV (400 L)의 H₂O. 달바반신을, AcOH (6 L), pH = 3.4으로 산성화된 4 BV (2400 L)의 H₂O/MeOH (8:2)로 용리하였다.

[0364] 용리 단계 동안, 50-60 L의 22 분획들을 수집하고 HPLC로 분석하였다. 9 내지 25 (달바반신의 농도가 0.5 g/L 보다 높으며, (B₀+B₁)의 HPLC 영역 %≥80 %)의 분획들을 함께 합쳐서 1.56 Kg의 달바반신 (수율 = 93.9 %)의 969 L의 용액을 얻었다. 그 후에, 이 용액을 나노여과에 의해 농축하여 1.38 Kg의 달바반신의 125.7 L의 용액을 얻었다. 145 g의 불순한 달바반신 (8.7 %)을 함유하는 850 L의 투과액을 중성화하였고 배출하였다.

[0365] 수지 재형성

[0366] 재사용 전에 수지를 이하의 용액으로 세척했다: 2.5 BV (1000 L)의 1:1 MeOH/물 (아세트산 (2.5 mL/L)으로 산성화됨); 2.5 BV (1000 L)의 1:1 0.5% NaOH/이소프로판올; 10 BV (4000 L)의 탈염수. 그 후에, 수지를 아세트산 (2.5 mL/L)으로 산성화된 BV (800 L)의 물로 재-평형화하였다.

[0367] 제2부의 정제

[0368] 가수분해 단계로부터 얻어진 출발 용액 (76.5 L)의 제2부를 H₂O (56 L)로 희석하여, DMSO 용량을 5% (v/v) 이하

로 낮추고 1 N HCl 3.0 L로 pH 2.87로 산성화하였다. 그 후에, 상기 부분을 제1부의 정제에서 앞서 기재한 바와 같이 정제하였다. 합쳐진 분획 (부피 = 972 L, 달바반신 1.54 Kg, 수율 = 92.7 %)을 나노여과로 농축하여, 1.46 Kg의 활성을 갖는 133 L의 용액을 얻었다. 73 g의 달바반신 (4.3 %)을 함유하는 850 L의 투과액이 배출되었다.

[0369] 두 가지 정제 단계로부터 얻어진 농축 용액들을 다시 분석하고 함께 합쳐서 정제된 달바반신 2840 g을 함유하는 258 L의 용액을 얻었다. 정제 수율은 86 %였다. MA로부터 출발한 전체 수율은 58.3 %였다.

[0370] 최종 폴리아미드 재형성

[0371] 제2 정제 수행 후, 폴리아미드를, 1:1 MeOH-물 (AcOH (2.5 L)로 pH =3.4로 산성화됨) 2.5 BV; 1:1 0.5 % NaOH-이소프로판올 2.5 BV; 10 BV의 탈염수로 재형성하였다.

[0372] 달바반신의 탈색 및 침전

[0373] 달바반신 1몰 당 1.5 몰의 1 N HCl 및 달바반신 1 그램당 0.3 g의 차콜 CG1 (0.85 Kg, 노리트 (NORIT)로부터 얻음)을 앞서 얻은 258 L 용액에 첨가하였다. 혼합물은 45분 이상 동안 실온에서 교반하였다. pH는 3.1이었다. 그후, 현탁액을 세이즈-셴크 (SEITZ-SCHENK)로부터 얻어진 수프라 디스크 카트리지 모드 SDK-EK1 (SUPRA DISC cartridge mod. SDK-EK1)로 여과하였고, 케이크를 50 L의 H₂O/MeOH 8:2로 세척하였다. 여과액을 분석하고, 250 D의 컷오프 (cut off)를 가진 MPS 44 멤브레인을 사용하여 다시 나노여과로 농축하였다. 119 g/L의 달바반신 (pH 4.1 ;MeOH 1.9 %, GC)을 함유하는 21.3 L의 농축 용액을 얻었다. 1 N HCl 909 mL를 마지막으로 첨가하여, pH를 2.63으로 조절하였고, 이는 1.65 몰_{HCl}/몰_{달바반신}의 염화 비율에 해당한다.

[0374] 용액 (22.2 L)을 교반하면서 200 L의 아세톤에 부었다. 부은 후에 얻어진 고체를 원심분리하고 14 L의 신선한 아세톤으로 세척하였다. 그후, 17 시간 동안 30 °C 이하의 내부 온도를 유지시키면서, 생성물을 감압 (50 mmHg) 하에서 35 °C에서 건조시켰다. 건조 과정 동안, 0.5 L의 두 부분으로 각각 나누어진 1 L의 발열인자 (pyrogen)가 없는 물(< 250 EU/mL)을 3시간 및 5시간 후에 고체에 분사하여, 그렇게 하지 않으면 제거하기 어려운 잔여 아세톤을 제거하였다. 그후, 생성물을 걸러서 (50 메쉬), 2592 g의 달바반신 (HPLC 분석 82.4 %; 물 (KF) 14 %;Cl⁻ 3.0 %)을 얻었다.

[0375] 실시예 10. A-40926 및 달바반신의 다른 제조 방법들

[0376] 하기 방법들은 A-40926 및 달바반신의 제조 과정에 사용될 수 있는 다른 방법들이다.

[0377] XAD-7HP 상에서의 A-40926 제조

[0378] 탈아세틸화 및 마이셀리움 마이크로여과 (mycelium microfiltration)

[0379] A-40926 (pH 7)을 함유하는 150 L의 발효 브로쓰를 적절한 반응기에서 실온(24 °C)에서 교반하였고, 2.5 N NaOH 용액 (2.5L)으로 pH 11.5로 조절하였다. 4시간의 교반 후에, 브로쓰를 15 % HCl로 pH 10.6으로 조절하였고, 0.2 마이크론 멤브레인을 통하여 마이크로여과하였다. 439 L의 투명한 투과액을 수집한 후에, 250 D의 컷오프를 갖는 MPS 44 멤브레인을 사용하여 나노여과로 농축하였다. 얻어진 A-40926 농축 용액 (58.6 L; 3.89 g/L)을 pH 6.4로 조절하고, 사용 시까지 4 °C에서 저장하였다.

[0380] 칼럼 제조 및 정제

[0381] XAD-7 HP 수지 (8L)를 1:1 물/메탄올 용액으로 현탁하고, 여과하여, 튜브연동식 펌프 (peristaltic pump)를 갖는 적절한 유리-칼럼 (내경 12 cm)에 로딩하였다.

[0382] 그 후에, 수지를 물로 세척하고, 6 BV의 나트륨 카르보네이트 수용액 (물 1리터당 5 g의 나트륨 카르보네이트를 용해하고 아세트산으로 pH를 조절함으로써 제조되며 pH 6으로 완충되었음)으로 평형화하였다.

[0383] 194 g의 A-40926을 함유하는 농축 브로쓰 부분을 XAD-7 HP 칼럼에 로딩하였다. 그후 나타난 착색된 친수성 물질의 부분을 제거하기 위해서, 수지를 이하의 2종의 완충 용액으로 1/2 BV/시간의 유속으로 세척하였다: 3 BV (24 L)의 수성 0.5 % 아세트산 용액 (30 % 수산화 나트륨으로 pH 5로 조절되었음); 5 BV (40 L)의 8:2 물/아세톤 혼합물 (5 mL의 아세트산/물 L을 가짐).

[0384] 최종적으로, 8 BV (64 L)의 1:1 물/아세톤 혼합물 (5 mL의 아세트산/물 L으로 산성화됨)으로 A-40926을 용리하였다. 4 L의 16개의 분획 각각을 모았다. A-40926 농도가 0.5 g/L보다 큰 풍부한 분획들 (5 내지 15)을 함께

모아서, 163.4 g의 A-40926 (43 L, 3.8 g/L)을 함유하는 용액을 얻었다. 칼럼 수율은 81.3 %이었다. 덜 순수한 0.23 g/L (45.3g; 22.2 %)의 A-40926을 함유하는 다른 분획들 (200 L)이 배출되었다.

[0385] 용리 후에, 수지를 6 BV (55 L)의 NaOH 0.5%/이소프로판올 (1:1) 혼합물로 재생성하였고, 마지막으로 10 BV의 물로 중성으로 세척하였다.

[0386] 차콜 처리

[0387] 수집된 분획들을 HCl 37% (70 mL)로 pH 2.5로 조절한 후에, 50 g 차콜 유형 PA 200 (0.3 g/g의 A-40926)으로 탈색하였다. 얻어진 현탁액을 2시간 동안 실온에서 교반한 후에, KS 50 필터 (d=25 cm, 시간 = 2.5 시간)을 통해서 여과하여, 약간 노란색의 45.6 L의 A-40926 용액 (3.5 g/L; 수율=96.4 %)을 얻었다.

[0388] 농축

[0389] 탈색된 용액을 NaOH 30% (230 mL)로 pH 7로 조절하고, 나노여과 및 한외여과로 농축하였다. 이러한 기술들의 사용은, $R_t = 2-4$ 분에서 HPLC 크로마토그램 상에서 검출되었던 친수성 물질의 제거에 있어서 중요하다. 정제액을 출발 부피(4 L)의 1/10로 농축하였을 때에, 동일한 부피의 물을 첨가하였고, 얻어진 용액을 다시 농축하였다. 잔여 아세톤을 0.25 %까지 줄이기 위해서, 이 농축/희석 단계를 3회 반복하였다. 최종 용액 (2.2 L, 146.3 g의 A-40926, 66.5 g/L, 수율=91.5 %)을 HPLC로 분석하였다. 정제 수율은 75.4 %이다.

[0390] A-40926 결정화

[0391] 300 mL 부의 A-40926 용액 (19.9 g의 A-40926)을 실험실 규모의 한외여과기를 사용하여 100 mL로 추가로 농축한 후에, 60-65℃로 가열하였다. 이 용액의 pH를 7로 조절하였고 (30% NaOH), 이 온도에서 농축 용액 1리터당 1.2 mL의 5:1 아세톤/이소프로판올 혼합물을 적가하였다. 이 결과 혼합물을 20 ℃에서 냉각한 상태로 놓았다. 1.5 시간 후에, 얻어진 고체를 여과하고, 아세톤으로 필터 상에서 세척하고, 15 시간 동안 40 ℃에서 건조하였다. 20.6 g의 생성물 (HPLC 분석 82.0 %; A-40926 16.9 g)을 얻었다. 침전 수율은 84.9 %였다. 여과된 브로쓰로부터 출발한 전체 수율은 약 64%였다.

[0392] **CG-71 칼럼상에서의 A-40926의 제조**

[0393] 칼럼 제조

[0394] CG-71 수지(350 mL)을 유리-칼럼 (내경=4 cm)에 부었고, 물로 세척하였다. 수지는 3 BV의 나트륨 카르보네이트 용액 (5 g의 나트륨 카르보네이트를 물에 아세트산과 함께 녹여서 pH 6에서 제조되었음)으로 평형화되었다. 14.7g의 A-40926을 함유하는 250 mL 발효 브로쓰 (pH 7)를 칼럼(42 g/L 수지)에 로딩하였다. 수지를 이하의 세 가지 용액으로 세척하였다: 아세트산으로 pH 6으로 조절된 소듐 카르보네이트 (5 g/L) 수용액 1050 mL (3 BV) ; 아세트산으로 pH 8로 조절된 소듐 카르보네이트 (5 g/L) 수용액 1750 mL (5 BV); 아세트산으로 pH 9로 조절된 소듐 카르보네이트 (5 g/L) 수용액 3150 mL (9 BV).

[0395] 그 후에, 활성이 10 BV의 탈염수로 용리되었다. 각각 500 mL의 20개의 분획들을 수집하였다. 분획들 12 내지 15가 함께 합쳐져서, 11.7 g의 A-40926을 함유하는 2.2 L의 정제 용액을 얻었다 (수율 = 79.6 %). 그 후에, 이 용액을 한외여과로 농축하였고, 농축 용액을 탈염수로 추가로 희석하였으며, 다시 한외여과하였다. 얻어진 용액을 감압 하에서 추가로 50 mL까지 농축하였다.

[0396] A-40926 결정화

[0397] 농축 용액을 60℃에서 가열하였고, 5:1 아세톤/IPA 혼합물 (60 mL)과 함께 교반하면서 처리하였다. 그 후에, 혼합물을 천천히 실온에서 냉각하였다. 얻어진 고체를 여과하고, 필터 상에서 아세톤으로 세척하였고, 진공 하에서 35 ℃에서 80시간 동안 건조하였다. 8.9 g의 정제된 A-40926 (HPLC 분석 84.2 %)를 얻었다. 전체 수율은 51%였다.

[0398] **N-메틸-2-피롤리딘 (NMP)를 용매로서 사용하는 탈바반신 합성에 있어서의 다른 아미드화 단계**

[0399] MA 혼합물을 1:1 NMP/MeOH 혼합물 (64 mL)에 교반하면서 조금씩 첨가하였다. 20-25℃에서 용해가 완결될 때까지 교반을 계속하였고, 그 후에 DMEPA (2.42 mL; 1.96 mol/eq_{MA}) 및 HOBt (1.06 g; 0.71mol/eq_{MA})을 첨가하였다. 반응 혼합물 (물로 1:10으로 희석된 표본 상에서 체크됨)의 pH를 NMP중의 15 % HCl 9.37 mL (57.7 mL NMP 중에 용해된 HCl 37% 34.0 mL로부터 이전에 제조되었음)로 3.0으로 조절하였다. 그 후에, NMP/MeOH 1:1 (12.7 mL) 중의 DCC (3.17g; 1.57mol/eq_{MA}) 용액을 교반하면서 첨가하였다. 반응을 HPLC로 모니터

터링하였다. 반응은 약 6시간 후에 완결되었다.(MA-A-1 88.9%, MA 7.3%, ISO 3.7%) 이 실험은 NMP가 아미드화 반응을 위한 DMSO에 대하여 편리한 대안이 될 수 있다는 것을 암시한다. 전체 공정은 이 용매 변화로 영향을 받지 않았으며, 얻어진 최종 달바반신은 화학적으로 다른 배치들과 동등한 것이었다.

[0400] **달바반신 제조의 다른 방법 : 1-포트 과정**

[0401] 10 g의 A-40926 복합체 (HPLC 타이터 80.66%, 4.6 mmole)를, 실온에서 100 mL 유리 반응기에서 교반하면서 24 mL의 MeOH 중에서 현탁하였다. 혼합물을 0℃에서 냉각하였고, MeOH 16.4 mL 중의 HCl (g) 4 g의 용액을 첨가하여 생성물 용해를 완료하였다. 그후, 온도를 20 ℃로 올려 유지하였고, 그 동안에 교반을 추가의 24시간 동안 계속하였다.

[0402] 이 시간 후에, 40 mL의 DMSO 및 0.4 g의 HOBT를 반응 혼합물에 첨가하였다.

[0403] 그 후에, 1,1-디메틸아민 프로필아민을 첨가하여, 결과 반응 혼합물의 pH를 3-3.1 사이로 조절하였다 (샘플을 물로 9:1로 희석한 후에 측정하였음). 그 후에, 1.8 g의 고체 DCC를 첨가하였고, 교반을 추가의 15시간 동안 계속하였다. 이 시간 후에, 반응 혼합물을 1 L 유리 반응기에 전달하였고, 80 mL의 물로 희석하였다. 그 후에, 240 mL의 15% NaOH를 첨가함으로써 pH를 12로 만들었다. 교반을 추가의 60분 동안 계속하였으며, 혼합물을 260 mL의 15 % 수성 HCl으로 pH 2.8으로 산성화하였다. 6.4 g의 달바반신을 함유하는 약 800 mL의 최종 투명한 용액을 얻었다(수율=76%).

[0404] HPLC 분석은 얻어진 생성물의 프로파일은 다른 제조 과정들로 얻어진 것들과 필적하다는 것을 나타낸다.

[0405] 비록 전술한 발명이 이해를 명확하게 할 목적으로 예시와 실시예에 의하여 자세하게 설명되었다 하더라도, 어떤 변화나 수정이 본 발명의 취지 및 범위에서 벗어나지 않고 실행될 수 있다는 점은 본 기술분야에서 기술을 가진 자들에게 자명할 것이다. 따라서, 상세한 설명은 첨부된 청구항들에 의하여 기술되는 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0406] 각각의 별개 문헌, 특히 또는 특히 출원이 구체적으로 별개로 참조문헌으로 삽입되었다고 표시되는 것처럼 모든 목적을 위하여 동일한 범위에서 본원에 인용된 모든 문헌, 특히 및 특히 출원은 본원에 그 전체가 참조문헌으로 삽입되었다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 달바반신의 단일 1000 mg 정맥내 주입에 따른 시간 대 달바반신의 혈장 농도를 나타낸다.

[0028] 도 2는 인간 혈청 알부민에의 달바반신 결합에 대한 등은 적정 열량측정 데이터 (상단) 및 달바반신:단백질의 2:1 결합 모델에서 측정되는 곡선으로 맞춘 데이터의 그래프 도 (하단)을 나타낸다.

[0029] 도 3은 달바반신의 전자분사 이온화 질량 스펙트럼을 나타낸다.

[0030] 도 4는 달바반신 농도 대 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율의 그래프이고, 달바반신 농도의 증가에 따른 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율의 증가를 나타낸다.

[0031] 도 5는 pH 대 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율의 그래프이고, pH 증가에 따른 단량체에 대한 달바반신 다중체의 모비율의 증가를 나타낸다.

[0032] 도 6은 암모늄 포르메이트 5 mM pH 5 용액 중의 달바반신의 전자분사 이온화 질량 스펙트럼을 나타낸다.

[0033] 도 7은 암모늄 포르메이트 50 mM pH 5 용액 중의 달바반신의 전자분사 이온화 질량 스펙트럼을 나타낸다.

[0034] 도 8은 암모늄 포르메이트 100 mM pH 5 용액 중의 달바반신의 전자분사 이온화 질량 스펙트럼을 나타낸다.

[0035] 도 9는 물 중의 테이코플라닌 (50 µg/mL)의 전자분사 이온화 질량 스펙트럼을 나타낸다.

[0036] 도 10은 물 중의 테이코플라닌 (100 µg/mL)의 전자분사 이온화 질량 스펙트럼을 나타낸다.

[0037] 도 11은 26 ℃ (pH 7.4)에서의 달바반신/트리-펩티드 결합의 겔보기 해리 상수에 대한 HSA의 효과를 나타낸다.

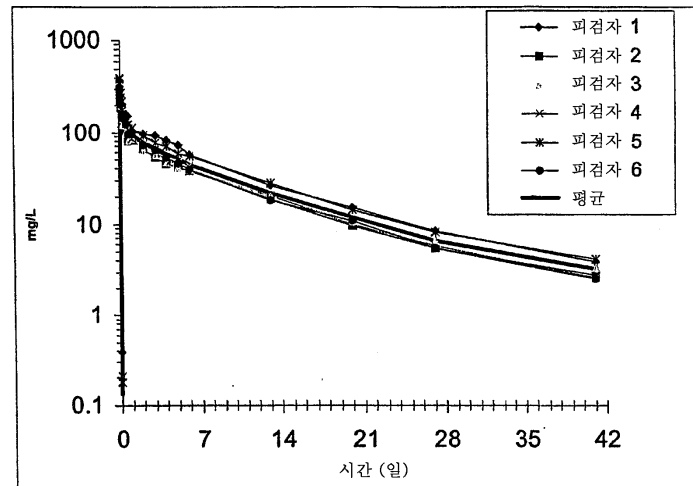
[0038] 도 12는 동일한 트리-펩티드 용액을 사용한, 동일 조건 하에서의 반코마이신 및 달바반신에 대한 트리-펩티드의 결합에 대한 등은 열량측정 (ITC) 데이터의 비교를 나타낸다.

[0039]

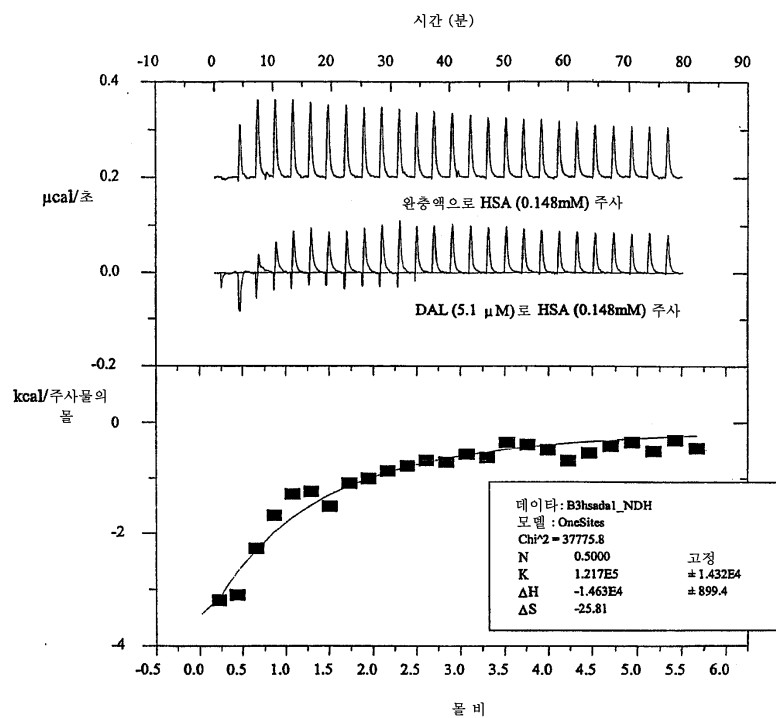
도 13A 및 13B는 달바반신 단량체 및 다중체 (이량체 포함)의 트리-펩티드 리간드 및 HSA와의 가능한 상호작용을 나타낸다. 도 13A는 HSA 상의 2개의 분리된 부위로의 단량체로서의 결합인, 용액 중의 단량체-이량체 중의 달바반신의 평형을 나타낸다. 도 13B는 용액 중의 달바반신 이량체로의 리간드 결합 및 HSA에 부착된 달바반신 단량체로의 보다 약한 리간드 결합을 나타낸다.

도면

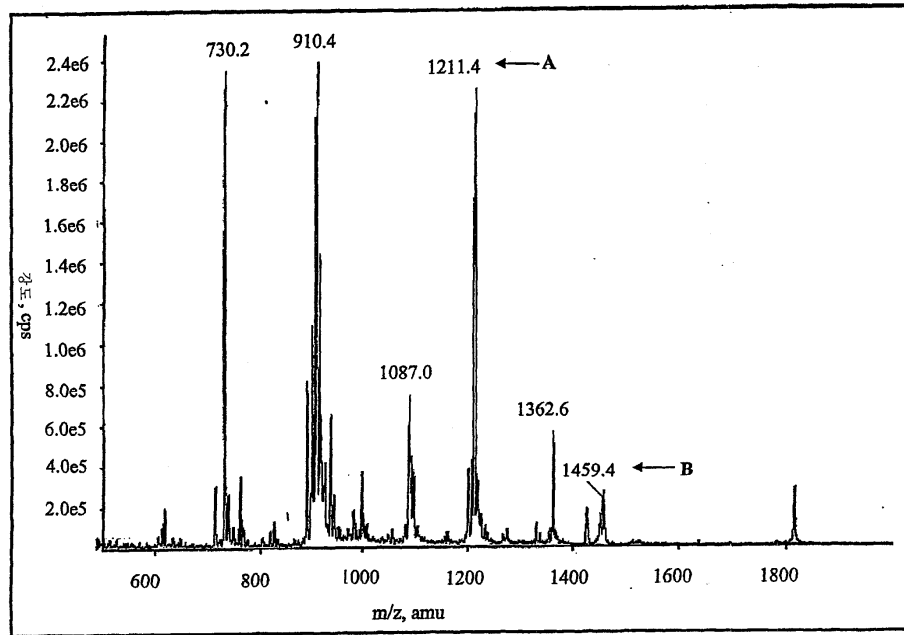
도면1



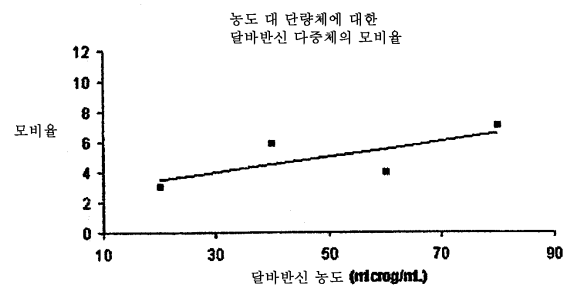
도면2



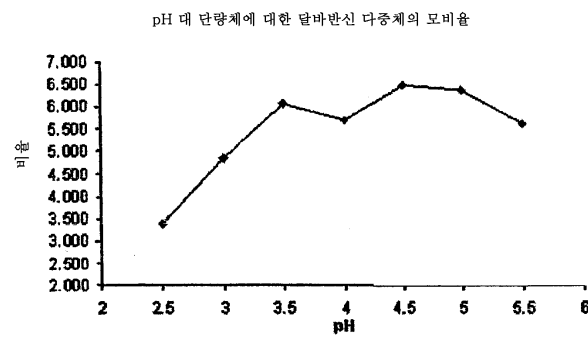
도면3



도면4

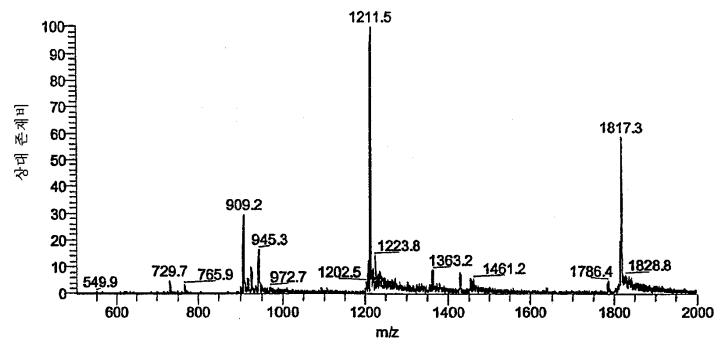


도면5



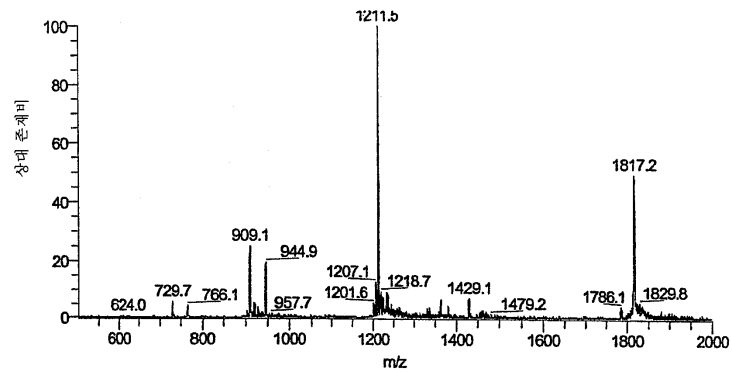
도면6

암모늄 포르메이트 5mM, pH5 중의 달바란신의 전체 스캔 ESI/MS 스펙트럼



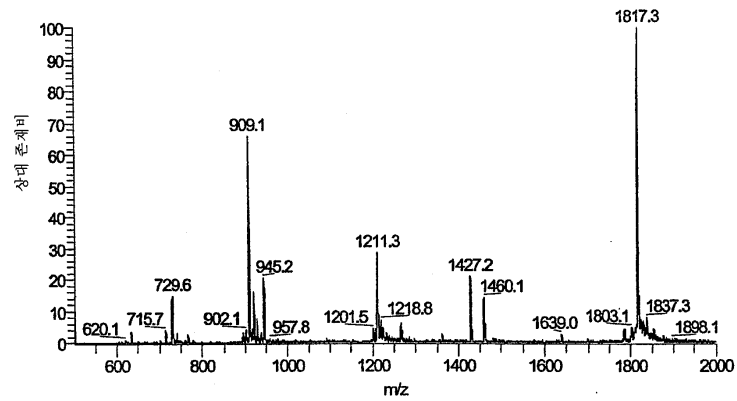
도면7

암모늄 포르메이트 50mM pH5 중의 달바란신의 전체 스캔 ESI/MS 스펙트럼



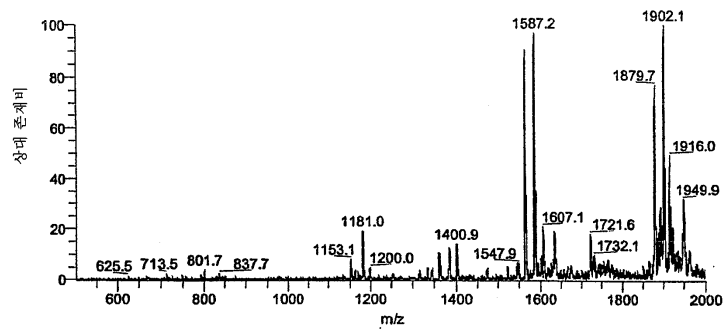
도면8

암모늄 포름레이트 100mM pH5 중의 달바반신의 전체 스캔 ESI/MS 스펙트럼



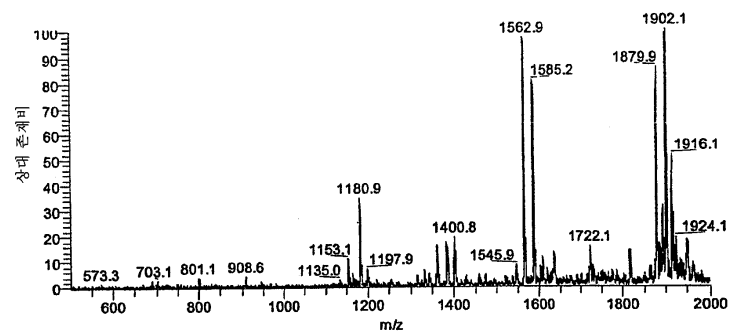
도면9

물중의 테이코플라닌 (50 $\mu\text{g/mL}$) 전체 스캔 ESI/MS 스펙트럼

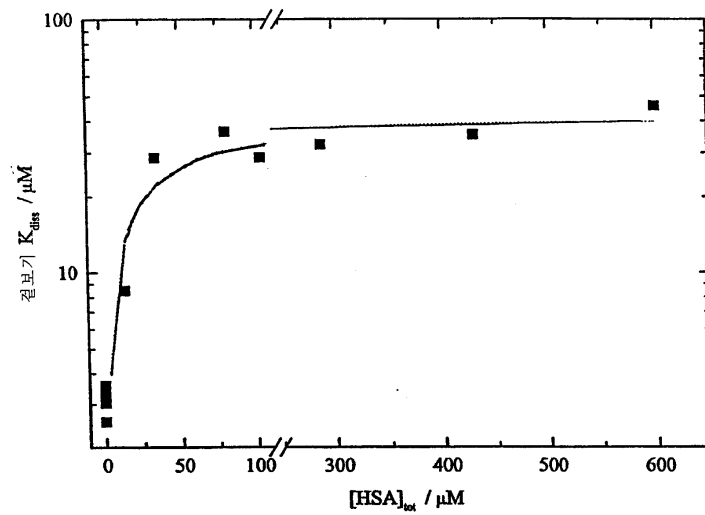


도면10

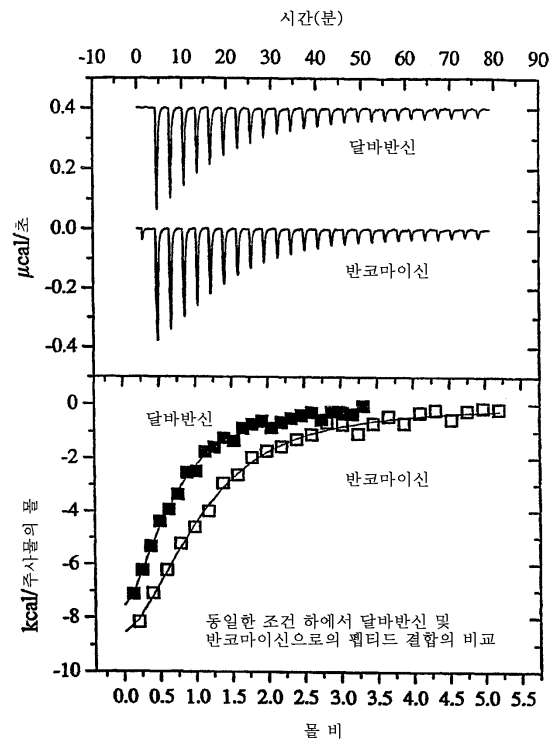
물중의 테이코플라닌 (100 $\mu\text{g/mL}$) 전체 스캔 ESI/MS 스펙트럼



도면11



도면12



도면13

