



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

**(11) PI 0107731-7 B1**



\* B R P I 0 1 0 7 7 3 1 B 1 \*

**(22) Data de Depósito:** 18/01/2001

**(45) Data da Concessão:** 11/08/2015  
**(RPI 2327)**

---

**(54) Título:** Método para purificar daptomicina

**(51) Int.Cl.:** C07K7/08; A61K38/10; A61P31/04

**(30) Prioridade Unionista:** 28/11/2000 US 09/735,191, 20/01/2000 US 60/177,170, 20/01/2000 US 60/177,170, 28/11/2000 US 09/735,191

**(73) Titular(es):** Cubist Pharmaceuticals, Inc.

**(72) Inventor(es):** Auro Tagliani, Jan-Ji Lai, Joseph P. Decourcey, Maurizio Zenoni, Paul D. Lynch, Thomas J. Kelleher

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA PURIFICAR DAPTOMICINA**".

Campo Técnico da Invenção

A presente invenção refere-se a uma forma altamente purificada de lipopeptídeos, inclusive daptomicina, um antibiótico lipopeptídico com potente atividade bactericida contra bactérias gram-positivas, incluindo cepas que são resistentes a antibióticos convencionais. A presente invenção também refere-se a um processo para preparar a forma altamente purificada do lipopeptídeo. A presente invenção refere-se ainda a micelas de lipopeptídeos. A presente invenção também refere-se a composições farmacêuticas das micelas de lipopeptídeos e métodos de uso destas composições. A presente invenção também refere-se a métodos para produzir micelas de lipopeptídeos a partir de monômeros não associados dos lipopeptídeos, e para converter micelas de lipopeptídeos em monômeros não associados. A presente invenção também refere-se a um processo para preparar lipopeptídeos usando micelas que é facilmente adaptado para produção comercial.

Fundamentos da Invenção

O rápido aumento na incidência de infecções gram-positivas - inclusive aquelas causadas por bactérias resistentes a antibióticos - acendeu um renovado interesse no desenvolvimento de novas classes de antibióticos. Uma destas classes é a dos antibióticos lipopeptídicos, que inclui daptomicina. Daptomicina possui potente atividade bactericida in vitro contra bactérias gram-positivas clinicamente importantes que causam sérias doenças com ameaça de vida. Estas bactérias incluem patógenos resistentes, tais como enterococos resistentes à vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* suscetíveis a intermediários de glicopeptídios (GISA), estafilococos coagulase-negativos (CNS) e *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina (PRSP), para os quais existem poucas alternativas terapêuticas. Veja, por

exemplo, Tally et al., 1999, Exp. Opin. Invest. Drugs 8 1223-1238, doravante "Tally". O efeito inibidor da daptomicina é um efeito bactericida concentração-dependente rápido in vitro e in vivo, e um efeito pós-antibiótico concentração-dependente relativamente prolongado in vivo.

5                   A daptomicina foi descrita por Baltz em Biotechnology of Antibiotics, 2ª Ed., ed. W. R. Strohl (New York: Marcel Dekker, Inc.), 1997, pp. 415-435, doravante "Baltz". Daptomicina, também conhecida como LY 146032, é um antibiótico lipopeptídico cíclico que pode ser derivado da fermentação de *Streptomyces roseosporus*. A daptomicina é um membro dos  
10 antibióticos com fator A-21978C<sub>0</sub> de *S. roseosporus* e é constituída de uma cadeia lateral decanoíla ligada ao triptofânio N-terminal de um peptídeo cíclico de 13 aminoácidos (figura 1). A daptomicina tem um excelente perfil de atividade porque é altamente eficaz contra a maioria das bactérias gram-positivas, é altamente bactericida e de ação prolongada, tem baixa taxa de  
15 resistência e é eficaz contra organismos resistentes a antibióticos. O composto está sendo atualmente desenvolvido em uma variedade de formulações para tratar infecções graves causadas por bactérias, incluindo, porém sem limitação, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e enterococos resistentes à vancomicina (VRE).

20                   Inúmeras patentes americanas descrevem antibióticos contendo A-21978C e derivados dos mesmos inclusive a daptomicina (LY 146032) bem como métodos de produção e isolamento dos antibióticos contendo A-21978C e derivados dos mesmos.

25                   As Patentes US Re. 32.333, Re. 32.455 e 4.800.157 descrevem um método de síntese da daptomicina por cultura de *Streptomyces roseosporus* NRL15998 em condições de fermentação aeróbica submersa. A Patente US 4.885.243 descreve um método aperfeiçoado para sintetizar a daptomicina por alimentação de uma cultura de fermentação com um ácido graxo decanóico ou um éster ou sal do mesmo.

30                   As Patentes US Re. 32.310, Re. 32.311, 4.537.717, 4.482.487 e 4.524.135 descrevem métodos de desacilação do antibiótico do tipo A-21978C e reacilação do núcleo peptídico e derivados antibióticos feitos por

este processo. Todas essas patentes descrevem um núcleo do antibiótico do tipo A-21978C desacilado purificado ou um derivado do mesmo que foi isolado do caldo de fermentação por filtração e em seguida purificado por cromatografia de Diaion HP-20 e cromatografia sobre sílica gel/C18.

5                   As Patentes US Re. 32.333 e Re. 32.455 descrevem um método de purificação no qual um filtrado de caldo de fermentação total foi purificado por inúmeras etapas de precipitação e extração para obter um complexo de A-21978C bruto. O complexo bruto foi ainda purificado por cromatografia de troca iônica sobre IRA-68 e duas rodadas de cromatografia sobre sílica gel. Os fatores individuais de A-21978C foram separados por cromatografia sobre sílica gel de fase reversa ou sobre sílica gel/C18. As Patentes US Re. 32.333 e Re. 32.455 também descrevem que A-21978C pode ser purificado por cromatografia em bateladas usando a resina Diaion HP-20 seguida de cromatografia de coluna sobre sílica gel.

15                   A Patente US 4.874.843 descreve um método de purificação de daptomicina no qual o caldo de fermentação foi filtrado e passado através de uma coluna contendo a resina HP-20. Depois da eluição, a daptomicina semipurificada foi passada através de uma coluna contendo HP-20ss, e em seguida novamente separada sobre a resina HP-20. A patente '843 determina que a resolução final e a separação de daptomicina de compostos estruturalmente similares por este método são impedidas pela presença de impurezas que não são identificáveis por análise ultravioleta do caldo de fermentação.

25                   A patente '843 determina ainda que a tentativa para remover essas impurezas por cromatografia de fase reversa sob sílica gel, cromatografia de fase normal sob sílica gel ou cromatografia por troca iônica também falhou para melhorar significativamente a pureza de daptomicina. A patente '843 também revela um "método reverso" para purificação compreendendo as etapas de contatar uma solução aquosa do produto de fermentação com uma resina não funcional em fase aquosa, remover fisicamente a água de resina carregada, reumidecer a resina carregada com um solvente orgânico polar, lavar a resina com o solvente orgânico, eluir o produto de

30

fermentação da resina através do aumento da polaridade do solvente e recuperar o produto de fermentação. A patente '843 ensina que esse método melhora a pureza de cerca de 80% a cerca de 93% e aumenta a produção de cerca de 5% a cerca de 35%, entretanto, a patente '843 não revela o tipo de impurezas presentes na preparação da daptomicina.

A Patente US 5.912.226 descreve a identificação e o isolamento de duas impurezas produzidas durante a produção de daptomicina. A daptomicina, um peptídeo  $\alpha$ -aspartil, torna-se transpeptidado para formar um intermediário estável no qual o grupo aspartil torna-se um grupo succinimido anidro (figura 3). A patente '226 ensina que a presença deste intermediário, designado daptomicina anidra, é mais acentuada a um pH 4 - 6. Reidratação da forma succinimido anidro produz um segundo produto de degradação que contém um grupo  $\beta$ -aspartil e é designado a forma isômero  $\beta$  de daptomicina (figura 2).

A patente '226 relata que o derivado t-BOC de daptomicina anidra pode ser isolado por cromatografia sobre sílica gel/coluna C-18 de fase reversa, precipitado e repurificado por cromatografia sobre sílica gel/coluna C-18 de fase reversa. A patente '226 também ensina que a forma isômero  $\beta$  de daptomicina pode ser purificado por cromatografia sobre uma resina Diaion HP-20ss, dessalinizada por cromatografia sobre uma resina Diaion HP-20, e então purificada usando uma coluna C-18 de fase reversa seguida de uma coluna de resina HP-20 no modo invertido.

Kirsch et al. (Pharmaceutical Research, 6:387-393, 1989, doravante "Kirsch") relata que a daptomicina anidra e o isômero  $\beta$  foram produzidos na purificação de daptomicina. Kirsch descreve métodos para minimizar os níveis de daptomicina anidra e do isômero  $\beta$  por manipulação das condições de pH e condições de temperatura. No entanto, Kirsch foi incapaz de estabilizar a daptomicina e impedir a conversão de daptomicina em daptomicina anidra e sua subsequente isomerização para isômero  $\beta$ . Kirsch também foi incapaz de impedir a degradação de daptomicina em outros produtos de degradação não relacionados com a daptomicina anidra e o isômero  $\beta$ .

A patente '226 relata que a daptomicina pode ser preparada

usando estes procedimentos de modo que a daptomicina não contenha mais de 2,5% em peso de um total combinado de daptomicina anidra e isômero  $\beta$ , mas não dá qualquer indicação dos níveis das outras impurezas. No método ensinado na Patente US 4.874.843 e em preparações em grande escala de daptomicina para experiências clínicas, os níveis de pureza mais altos de daptomicina observados foram de cerca de 90% - 93%. Há necessidade de um método comercialmente viável para produzir daptomicina mais altamente purificada e, se possível, aumentar seu rendimento depois da purificação. Além do mais, seria desejável obter daptomicina purificada que contivesse pouco ou nada de daptomicina anidra e da forma isômero  $\beta$  de daptomicina. Também seria desejável reduzir os níveis de inúmeras outras impurezas na daptomicina. No entanto, não há nenhum método disponível na literatura que se mostre capaz de reduzir ainda mais os níveis de daptomicina anidra, da forma isômero  $\beta$  e de outras impurezas no produto daptomicina.

#### 15 Sumário da Invenção

A presente invenção resolve esses problemas oferecendo métodos comercialmente viáveis para produzir níveis elevados de lipopeptídeos purificados. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo é daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina. Em uma modalidade da presente invenção, estão descritos métodos comercialmente viáveis que resultam em daptomicina com um nível de pureza de 95 - 97%. Em uma outra modalidade da presente invenção, encontra-se descrito um método comercialmente viável que elimina quase completamente as principais impurezas daptomicina anidra e isômero  $\beta$  assim como outras impurezas em preparações de daptomicina. Em uma outra modalidade da invenção, encontram-se descritos métodos comercialmente viáveis para purificar lipopeptídeos, inclusive daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina, que compreende separar micelas de lipopeptídeos de contaminantes de baixo peso molecular e separar lipopeptídeos não associados de contaminantes de alto peso molecular. A invenção também fornece métodos de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para analisar a pureza da daptomicina e detectar e caracterizar outras impurezas na daptomicina, algumas

das quais eram desconhecidas.

A invenção também fornece daptomicina purificada que possui uma pureza de pelo menos 98% ou que é substancialmente ou essencialmente isenta de daptomicina anidra ou isômero  $\beta$ . A invenção fornece daptomicina purificada que é isenta ou essencialmente isenta de daptomicina anidra e contém muito um nível do isômero  $\beta$  e outros contaminantes muito mais baixo do que era anteriormente possível obter na técnica anterior. A invenção também provê micelas de lipopeptídeos. Em uma modalidade preferida, a micela compreende daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina. A invenção também fornece composições farmacêuticas compreendendo daptomicina altamente purificadas ou micelas de lipopeptídeos relacionados com daptomicina e métodos de uso dessas composições.

#### Breve Descrição dos Desenhos

- A figura 1 mostra a estrutura da daptomicina.
- 15 A figura 2 mostra a estrutura da impureza 8, CB-131010 (anteriormente identificada como o isômero  $\beta$ , LY213846).
- A figura 3 mostra a estrutura da impureza 13, CB-130952 (anteriormente identificada como daptomicina anidra, LY178480).
- 20 A figura 4 mostra a estrutura proposta da impureza 1, CB-131012 (anteriormente identificada como LY212218).
- A figura 5 mostra a estrutura proposta da impureza 2, CB-131011.
- A figura 6 mostra a estrutura proposta da impureza 3, CB-131008 (anteriormente identificada como LY213928).
- 25 A figura 7 mostra a estrutura proposta da impureza 4, CB-131006.
- A figura 8 mostra a estrutura proposta da impureza 6, CB-130989 (anteriormente identificada como LY213827).
- 30 A figura 9 mostra a estrutura proposta da impureza 7, CB-131005.
- A figura 10 mostra a estrutura proposta da impureza 12, CB-131009.

A figura 11 mostra a estrutura proposta da impureza 14, CB-131078 (anteriormente identificada como LY109208).

A figura 12 mostra um cromatograma de HPLC para uma preparação em massa de daptomicina, incluindo as impurezas 1 a 14.

5 A figura 13 mostra um cromatograma de HPLC para uma preparação de daptomicina após purificação sobre uma resina Poros P150.

As figuras 14A-14C mostram estruturas micelares. A figura 14A mostra uma micela esférica, na qual as caudas hidrofóbicas de moléculas anfipáticas são orientadas em direção ao centro da esfera ao passo que as cabeças hidrofílicas das moléculas anfipáticas são orientadas para fora da esfera, em contato com o ambiente aquoso. A figura 14A mostra um exemplo no qual as cabeças hidrofílicas estão negativamente carregadas. A figura 14B mostra uma estrutura de duas camadas de um lipídio no qual duas camadas de moléculas anfipáticas se juntam de modo que as caudas hidrofóbicas de cada camada ficam orientadas em direção opostas ao passo que as cabeças hidrofílicas de qualquer dos lados da bicamada ficam em contato com o ambiente aquoso. As bicamadas lipídicas podem ser esféricas ou planas. A figura 14C mostra um lipossoma, no qual uma bicamada lipídica, tal como aquela mostrada na figura 14B, forma uma estrutura esférica encerrando um interior aquoso. As cabeças hidrofílicas do lipossoma estão voltadas para o interior aquoso e o ambiente aquoso externo.

A figura 15 mostra o resultado de uma experiência para determinar a concentração micelar crítica (cmc) de daptomicina a um pH 4,0.

25 A figura 16 mostra a distribuição de tamanho de micelas de daptomicina por espalhamento de luz. As micelas de daptomicina têm um tamanho médio de 5,4 nm (54 Å).

#### Descrição Detalhada da Invenção

##### Objetivos da Invenção

30 Constitui um objetivo da invenção fornecer um método para purificar lipopeptídeos que é facilmente adaptado para produção comercial, o qual compreende uma combinação única de cromatografia por troca aniônica e cromatografia por interação hidrofóbica. Em uma modalidade preferida,

o método é usado para produzir daptomicina purificada que é mais de 95% pura e apresenta níveis reduzidos de impurezas em comparação com a daptomicina preparada por métodos da técnica anterior. Em uma outra modalidade preferida, o método é usado para produzir daptomicina usando níveis reduzidos de solventes em comparação com aqueles usados nos métodos da técnica anterior. Em uma outra modalidade preferida, o método é usado para produzir lipopeptídeos relacionados com daptomicina purificados que são mais de 95% puros.

Constitui um outro objetivo da presente invenção fornecer um método para aumentar os níveis de um lipopeptídeo produzido por um microorganismo alimentando a cultura de fermentação com um nível reduzido de um ácido graxo. O uso de níveis de ácido decanóico mais baixos que aqueles propostos para fermentação de daptomicina na Patente US 4.885.243 resulta em uma economia melhor além de produzir uma forma altamente pura de daptomicina ou de um lipopeptídeo relacionado com daptomicina. Em uma modalidade preferida, o método é usado para aumentar a concentração e a quantidade de daptomicina produzida por *Streptomyces roseosporus* ao mesmo tempo em que minimiza a produção de contaminantes relacionados. Níveis mais baixos de contaminantes no caldo de fermentação resulta em uma recuperação e purificação mais eficientes de daptomicina, o que proporciona um processo de produção com um rendimento maior.

Constitui um outro objetivo da presente invenção fornecer um método para purificar daptomicina ou lipopeptídeos relacionados com daptomicina que compreende o uso de uma cromatografia por troca aniônica melhorada com tampão modificado. Em uma modalidade preferida, o método é usado para produzir daptomicina que é pelo menos 98% pura ou que é substancialmente ou essencialmente isenta de daptomicina anidra ou isômero  $\beta$ . Em uma outra modalidade preferida, o método é usado para purificar lipopeptídeos relacionados com daptomicina até uma pureza de pelo menos 98%.

Constitui um outro objetivo da presente invenção fornecer um

método cromatográfico processual para purificar um lipopeptídeo, que compreende uma nova combinação de cromatografia por troca aniônica, cromatografia por interação hidrofóbica e cromatografia por troca aniônica melhorada com tampão modificado. Em uma modalidade preferida, o método

5 cromatográfico processual é usado para purificar daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina. O tampão modificado permite, de forma inesperada, uma separação de daptomicina anidra da daptomicina não anteriormente possível nos métodos cromatográficos da técnica anterior.

Constitui um outro objetivo da invenção fornecer um método

10 para purificar lipopeptídeos que é facilmente adaptado para produção comercial usando micelas de lipopeptídeos. Em uma modalidade, o método compreende converter uma solução de lipopeptídeos de um estado não-micelar monomérico em um estado micelar e de volta ao primeiro estado durante procedimentos de purificação. Em uma modalidade preferida, o

15 método compreende submeter os lipopeptídeos a condições nas quais micelas se formam, separar as micelas de lipopeptídeos dos contaminantes de baixo peso molecular por, por exemplo, uma técnica de separação de tamanhos. Em uma modalidade preferida, o método compreende submeter os lipopeptídeos a condições nas quais os lipopeptídeos estejam na forma mo-

20 nomérica e separar as moléculas de lipopeptídeos monoméricos das moléculas ou agregados de alto peso molecular por, por exemplo, uma técnica de separação de tamanhos. Em uma modalidade mais preferida, o método compreende ambas as etapas: submeter os lipopeptídeos a condições nas quais micelas se formam e separar as micelas de lipopeptídeos dos conta-

25 minantes de baixo peso molecular, e em seguida submeter as micelas de lipopeptídeos a condições nas quais os lipopeptídeos estejam na forma monomérica e separar as moléculas de lipopeptídeos monoméricos das moléculas ou agregados de alto peso molecular. Estas duas etapas podem ser realizadas em qualquer ordem. Em uma modalidade ainda mais preferida, a

30 técnica de separação de tamanhos é ultrafiltração ou cromatografia por exclusão de tamanho.

Constitui ainda um outro objetivo da presente invenção fornecer

métodos aperfeiçoados para medir a pureza de lipopeptídeos, inclusive daptomicina, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

Constitui um outro objetivo da presente invenção fornecer lipopeptídeos purificados, tal como daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina, e sais ou formulações farmacologicamente aceitáveis dos mesmos. Em uma modalidade preferida, a presente invenção fornece daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina purificado por um dos métodos descritos no relatório descritivo. A presente invenção também fornece composições farmacêuticas de um lipopeptídeo purificado ou seus sais e métodos de administração dessas composições. Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica compreende daptomicina purificada.

Constitui um outro objetivo da invenção fornecer micelas de lipopeptídeos e formulações farmacologicamente aceitáveis das mesmas. Em uma modalidade preferida, a presente invenção fornece micelas de daptomicina ou uma micela de lipopeptídeo relacionado com daptomicina e formulações farmacologicamente aceitáveis das mesmas. Em uma modalidade preferida, a invenção também fornece métodos de administração das micelas de lipopeptídeos ou formulações farmacêuticas das mesmas a pacientes com necessidade das mesmas. Em uma modalidade preferida, as micelas de lipopeptídeos são administradas por via intravenosa, parenteral, intramuscular ou tópica.

### Definições

A menos que de outra forma especificado, todos os termos técnicos e científicos usados neste relatório têm o significado comumente usado pelos versados na técnica à qual esta invenção pertence. A prática da presente invenção emprega, a menos que de outra forma indicado, técnicas convencionais da química, bioquímica e microbiologia e a terminologia básica usada nestas técnicas.

O termo "isolado" refere-se a um composto ou produto referente a um composto que representa pelo menos 10%, de preferência pelo menos 20% ou 30%, mais preferivelmente pelo menos 50%, 60% ou 70%, e ainda mais preferivelmente pelo menos 80% ou 90% do composto presente na

mistura.

O termo "lipopeptídeo" refere-se a uma molécula que compreende uma porção semelhante a lipídio covalentemente ligada a uma porção peptídica, bem como sais, ésteres, amidas e éteres do mesmo. O

5 termo "lipopeptídeo" também abrange formas protegidas de lipopeptídeos nos quais um ou mais grupos amino, carboxilato ou hidroxila estão protegidos. Veja, por exemplo, "Protective Groups in Organic Synthesis" de Theodora W. Greene, John Wiley & Sons, New York, 1981, para

10 exemplos de grupos protetores. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo é um antibiótico. Em uma outra modalidade preferida, o lipopeptídeo é LY 303366, equinocandinas, pneumocandinas, aculeacinas, surfactina, plipastatina B1, anfomicina ou o derivado lipopeptídico descrito na Patente US 5.629.288. Estes lipopeptídeos são conhecidos na

15 literatura. Veja, por exemplo, a Patente US 5.202.309 e o Pedido Internacional PCT WO 00/08197. Em uma outra modalidade preferida, o lipopeptídeo é uma molécula relacionada com daptomicina, incluindo, entre

20 outras, daptomicina, A54145, um lipopeptídeo relacionado com daptomicina descrito na Patente US 4.537.717, 4.482.487, Re. 32.311, Re. 32.310, 5.912.226, atualmente na fase de reemissão como Série US N°

09/547.357, Pedidos Internacionais PCT WO 01/442, WO 01/44274 e WO 01/44271, todos especificamente aqui incorporados a título de referência, ou um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo

25 ácido graxo n-decanoílico da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico. Os lipopeptídeos relacionados com daptomicina descritos nos pedidos WO 01/44272, WO

01/44274 e WO 01/44271 referem-se a lipopeptídeos sintéticos ou semi-sintéticos nos quais os resíduos ornitina ou quinurina ou cadeia lateral do tipo ácido graxo da daptomicina são modificados. Em uma modalidade

30 mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina. O termo lipopeptídeo relacionado com daptomicina refere-se aos compostos descritos acima, e sais dos mesmos.

O termo "daptomicina" refere-se ao derivado n-decanoílico com fator A-21978C<sub>0</sub>, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. "Daptomicina" é sinônimo de LY146032. Veja figura 1.

5 O termo "daptomicina anidra" refere-se ao derivado de daptomicina no qual o grupo  $\alpha$ -aspartil da daptomicina é transpeptidado para um grupo succinimido anidro. Veja figura 3.

O termo "isômero  $\beta$ " ou "isômero  $\beta$  de daptomicina" refere-se ao derivado de daptomicina que contém um grupo  $\beta$ -aspartil ao invés de um grupo  $\alpha$ -aspartil. Veja figura 2.

10 A daptomicina ou o lipopeptídeo relacionado com daptomicina é "substancialmente puro" quando pelo menos 95% de uma amostra é daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina. De preferência, a daptomicina ou o lipopeptídeo relacionado com daptomicina é "substancialmente puro" quando pelo menos 97% de uma amostra é daptomicina ou li-  
15 poeptídeo relacionado com daptomicina.

A daptomicina ou o lipopeptídeo relacionado com daptomicina é "essencialmente puro" quando pelo menos 98% de uma amostra é daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina. De preferência, a daptomicina ou o lipopeptídeo relacionado com daptomicina é "essencialmente  
20 puro" quando pelo menos 99% de uma amostra é daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina.

A daptomicina ou o lipopeptídeo relacionado com daptomicina é "substancialmente isento" de um outro composto quando o outro composto está presente em uma quantidade não superior a 1% da quantidade da pre-  
25 paração de daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina.

A daptomicina ou o lipopeptídeo relacionado com daptomicina é "essencialmente isento" de um outro composto quando o outro composto está presente em uma quantidade não superior a 0,5% da quantidade da preparação de daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina.

30 A daptomicina ou o lipopeptídeo relacionado com daptomicina é "isento" de um outro composto quando o outro composto está presente em uma quantidade não superior a 0,1% da quantidade da preparação de dap-

tomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina Alternativamente, a daptomicina ou o lipopeptídeo relacionado com daptomicina é "isento" de um outro composto quando o outro composto não pode ser detectado por HPLC em condições de sensibilidade máxima em que um limite de detecção  
5 é aproximadamente 0,05% ou menos da quantidade da preparação de daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina. Métodos de HPLC exemplificativos estão descritos neste relatório (Tabelas 1 e 2).

Daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina "purificado" refere-se à daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina substancialmente puros, daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina essencialmente puros, ou um sal dos mesmos, ou daptomicina, lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou um sal dos mesmos que seja substancialmente isento, essencialmente isento ou isento de um outro composto.  
10

Daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina "parcialmente purificado" refere-se à daptomicina, lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou um sal dos mesmos que é menos de 90% puro.  
15

A pureza da daptomicina, do lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou de um outro lipopeptídeo refere-se ao lipopeptídeo antes de sua formulação em uma composição farmacêutica. A pureza pode ser medida por qualquer meio que inclui ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia gasosa/espectroscopia de massa (GC/MS), cromatografia líquida/espectroscopia de massa (LC/MS) ou ensaios microbiológicos. Um meio preferido para medir a pureza da daptomicina é por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) analítica.  
20  
25

O termo "micela" refere-se a agregados de moléculas anfipáticas. Em um meio aquoso, os domínios lipofílicos das moléculas do agregado são orientados para o interior da micela e os domínios hidrofílicos estão em contato com o meio. As estruturas das micelas incluem, porém sem limitação, cristal esférico, laminar, cilíndrico, elipsoidal, vesicular (lipossomal), lamelar e líquido. Veja figura 14.  
30

O termo "micela mista" refere-se um tipo particular de micela

onde a micela contém mais de um tipo simples de molécula anfipática . No contexto desta invenção, as micelas mistas contêm um lipopeptídeo e pelo menos uma outra molécula anfipática que pode ser um outro lipopeptídeo. As micelas mistas contêm pelo menos 10% em peso do lipopeptídeo. Em  
5 outras modalidades, uma micela mista contém pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% do lipopeptídeo.

O termo "solução micelar" refere-se a uma solução na qual mais de 50% das moléculas lipopeptídicas na solução estão presentes em micelas, medido em peso. De preferência, pelo menos 60%, 70%, 80%, 90% ou  
10 95% das moléculas estão presentes em micelas. Uma solução micelar fica retida em uma membrana de ultrafiltração que tenha um corte de peso molecular nominal (NMW) de 10.000 daltons.

O termo "concentração micelar crítica" (cmc) refere-se à concentração particular de moléculas que é dependente da temperatura, da  
15 concentração de sal e da natureza e tipo da molécula anfipática. Acima da cmc, os monômeros e micelas não associados existem em equilíbrio.

O termo "monômero" refere-se a uma molécula anfipática que não faz parte de um agregado mas que existe como uma molécula simples. No contexto desta invenção, o termo monômero refere-se a um lipopeptídeo  
20 não associado.

O termo "solução monomérica" refere-se a uma solução na qual mais de 50% das moléculas lipopeptídicas estão presentes como monômeros, medido em peso. De preferência, pelo menos 60%, 70%, 80%, 90% ou  
25 95% estão presentes como monômeros. Uma solução monomérica não fica retida em uma membrana de ultrafiltração que tenha um corte de NMW de 10.000 daltons, ao contrário, ela atravessa a membrana.

O termo "tampão de baixa resistência iônica" refere-se a uma solução que tem uma concentração de sal inferior a 50 mM; o termo "tampão de resistência iônica média" refere-se a uma solução que tem uma con-  
30 centração de sal entre 50 - 250 mM; o termo "tampão de alta resistência iônica" refere-se a uma solução que tem uma concentração de sal maior que 250 mM.

### Métodos para produzir lipopeptídeos purificados

Uma modalidade da presente invenção refere-se a um método cromatográfico processual que produz um lipopeptídeo purificado de maneira comercialmente viável. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo é daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina. O método cromatográfico processual compreende o uso seqüencial de cromatografia por troca aniônica, cromatografia por interação hidrofóbica (HIC) e cromatografia por troca aniônica para purificar uma preparação contendo um lipopeptídeo, tal como daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina.

Em uma outra modalidade da presente invenção, o método de purificação compreende ainda alterar as condições de fermentação nas quais o produto bruto contendo A21978C é produzido por *Streptomyces roseosporus* para aumentar a produção de daptomicina e diminuir as impurezas e contaminantes relacionados produzidos pela cultura de fermentação *S. roseosporus*.

Abaixo está descrita uma modalidade preferida do método cromatográfico processual:

*Streptomyces roseosporus* é fermentado com uma alimentação de ácido n-decanóico, da maneira descrita na Patente US 4.885.243, com a modificação de que a alimentação de ácido decanóico é mantida nos níveis mais baixos possíveis sem diminuir o rendimento total da fermentação. Em uma modalidade preferida, o ácido decanóico residual é mantido a menos de 50 partes por milhão (ppm) durante fermentação aeróbica. Em uma modalidade mais preferida, o ácido decanóico residual é mantido entre uma e 20 ppm durante fermentação aeróbica. Em uma modalidade ainda mais preferida, o ácido decanóico residual é mantido a aproximadamente 10 ppm durante fermentação aeróbica. Em uma modalidade preferida, a concentração de ácido decanóico é medida durante toda a fermentação e o nível de alimentação de ácido decanóico é ajustado para manter continuamente os níveis de ácido decanóico residual dentro dos parâmetros preferidos. A técnica anterior não descreve as concentrações específicas e baixas de ácido

decanóico residual constante in situ requeridas para obter expressão máxima de daptomicina contendo níveis mais baixos de impurezas.

Depois da fermentação, a solução extracelular é clarificada por remoção do micélio do caldo de fermentação. A remoção do micélio do caldo de fermentação é feita por qualquer técnica de separação tradicional, tal como centrifugação ou microfiltração. Em uma modalidade preferida, o caldo de fermentação é clarificado por microfiltração, tal como pelo uso de sistema de membranas Pall Sep™. Em uma modalidade mais preferida, o caldo de fermentação é clarificado usando-se uma centrífuga industrial, tal como uma centrífuga Westfalia™, seguida por um filtro de profundidade de acabamento (finishing depth filter). Outros dispositivos, tais como filtros-prensas, filtros de tambor giratório ou filtros de profundidade descartáveis, podem ser usados para remover o micélio do caldo de fermentação para produzir um caldo clarificado adequado para cromatografia de coluna de grande escala.

Em uma outra modalidade, a daptomicina pode ser diretamente extraída da fermentação micelial usando-se um solvente orgânico tal como butanol antes da clarificação em uma centrífuga ou filtro separador de solvente. Qualquer álcool com quatro carbonos ou mais pode ser usado na extração de acordo com esta modalidade. Um solvente preferido é o n-butanol. O uso de um solvente orgânico resulta em uma purificação adicional inicial de daptomicina em comparação com a separação puramente aquosa de daptomicina. Por exemplo, a daptomicina se divide em n-butanol quando o n-butanol é usado em uma concentração superior a 10% e quando o processo é conduzido em condições nas quais o n-butanol forma uma fase separada, por exemplo a um valor de pH de 4 - 5, que está perto do ponto isoelétrico da daptomicina (veja exemplo 4).

Em uma outra modalidade, a daptomicina é produzida em um reator imobilizado que utiliza micélios pré-ativados para a produção de daptomicina sem fermentação usando uma fonte energética, de preferência um açúcar, componentes elementais, tais como aminoácidos e amônia, e ácido decanóico. A produção de daptomicina em um reator imobilizado de enzimas é então processada por métodos descritos neste relatório.

Depois da clarificação do caldo de fermentação os níveis de daptomicina são enriquecidos (isto é, concentrados) na solução clarificada por cromatografia de troca aniônica. A solução clarificada é primeiro contatada com uma resina trocadora de ânions em condições nas quais a maior parte da daptomicina ou toda ela se liga à resina trocadora de ânions. Depois da ligação, a resina é lavada com um tampão aquoso iônico apropriado para remover o material não ligado e algumas das impurezas de daptomicina. Por fim, a daptomicina purificada ligada à resina é eluída em condições nas quais a daptomicina vai se dissociar da resina.

As etapas de ligação, lavagem e eluição podem ser realizadas de acordo com esta invenção usando-se tampões e métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a eluição pode ser feita usando-se um tampão contendo uma concentração elevada de sal comparado com o tampão de lavagem, um tampão que tenha um pH mais baixo comparado com o tampão de lavagem ou um tampão que tenha tanto uma concentração de sal mais alta como um pH mais baixo que o tampão de lavagem. Em uma modalidade preferida, a daptomicina é ligada à resina trocadora de ânions que fora equilibrada em um tampão não contendo sal adicionado ou contendo uma baixa concentração de sal a um pH neutro a básico. A resina introduzida é lavada com três volumes de leito da coluna de água e em seguida três a seis volumes de leito de um tampão de sal intermediário contendo 30 a 60 mM de NaCl. A daptomicina é eluída da coluna com um a três volumes de coluna de um tampão de alto teor de sal e/ou pH mais baixo contendo 300 a 500 mM de NaCl. Concentrações mais altas de cloreto de sódio e sais alternativos tal como cloreto de potássio também vão eluir a daptomicina da resina. Em uma modalidade preferida, usa-se uma resina de troca aniônico de alta velocidade de fluxo. Em uma modalidade mais preferida, usa-se a resina FP-DA 13 (Mitsubishi).

A cromatografia por troca aniônica pode ser realizada por cromatografia de coluna ou pode ser realizada de forma intermitente. Para produção comercial, pode ser preferível usar o modo intermitente. A resina de troca aniônica pode ser lavada e eluída com gradientes escalonados de sal

ou com um gradiente contínuo de sal. Um gradiente escalonado ou contínuo de sal adequado é aquele que permite a separação da daptomicina dos contaminantes. Em uma modalidade preferida, um gradiente contínuo de sal é aquele que varia de 0 a 1000 mM de NaCl. Em uma modalidade mais preferida, um gradiente contínuo de sal é aquele que varia de 100 a 500 mM de NaCl ou de 0 a 400 de NaCl. Cromatografia de fluxo radial também pode ser usada, como descrito nas Patentes US 5.756.680, 4.865.729, 4.840.730 ou 4.708.782.

Depois da cromatografia por troca aniônica, a preparação de daptomicina é ainda purificada por cromatografia por interação hidrofóbica (HIC). Uma modalidade desta etapa está descrita na Patente US 4.874.843, aqui incorporada a título de referência. A preparação de daptomicina aquosa eluída é contatada com uma resina de HIC em condições nas quais a maior parte da daptomicina ou toda ela vai se ligar à resina. O teor de água da resina carregada de daptomicina é reduzido pelo contato da resina com uma concentração aumentada de um solvente não-polar. A resina é lavada com um solvente orgânico polar apropriado em condições nas quais as impurezas se dissociam da resina ao passo que a daptomicina permanece ligada. Por fim, a preparação de daptomicina é eluída em condições nas quais a daptomicina se dissocia da resina. Em geral, a de preferência é eluída usando-se um tampão contendo solvente com uma polaridade mais baixa (nível mais alto de solvente polar) e/ou um pH mais alto que o tampão de lavagem.

Em uma modalidade preferida, a resina não-funcional para HIC é a partícula pequena HP-20ss (Mitsubishi). A daptomicina ligada é especificamente removida da resina HP-20ss com um solvente de fase orgânica, tal como um solvente contendo álcool isopropílico, acetonitrila, butanol ou outro solvente adequado. Em uma modalidade mais preferida, a daptomicina é ligada à resina HP-20ss que foram equilibrada em um tampão acetato contendo 10% de acetonitrila ou solvente polar equivalente, tal como álcool isopropílico. A resina carregada de daptomicina é lavada com pelo menos três volumes de leito de coluna de tampão de equilíbrio. A resina carregada

de daptomicina é ainda liberada de impurezas adicionais lavando-se a mesma com três a seis volumes de leito de um tampão de lavagem acetato contendo uma concentração não-eluyente do solvente polar. Em uma modalidade preferida, a resina carregada de daptomicina é lavada com 30% de acetonitrila ou 45% de álcool isopropílico. A resina carregada de daptomicina é eluída com um a três volumes de leito de tampão acetato contendo 35% ou mais de acetonitrila ou mais de 50% de álcool isopropílico. Em uma modalidade preferida, a daptomicina é eluída com 35% de acetonitrila a um pH 4,0 - 5,0 ou 55 - 60% de álcool isopropílico. Em uma outra modalidade, a resina carregada de daptomicina é eluída com um a três volumes de leito de tampão a um pH aumentado. Nesta modalidade, o pH do tampão é gradativamente aumentado para eluir diferentes compostos da coluna a velocidades diferentes devido a diferenças de carga. A um pH elevado, por exemplo pH 6,0 - 7,0, a concentração de eluição de acetonitrila é reduzida para 10 - 20%. De maneira similar, a um pH elevado, por exemplo pH 6,0 - 7,0, a concentração de eluição de álcool isopropílico é reduzida para 20 - 25%. O controle da temperatura à qual a cromatografia é realizada também influencia a concentração de solvente. Eluição a temperaturas mais baixas, isto é, em condições refrigeradas, requer níveis aumentados de solvente em todas as condições de pH.

Depois de HIC, o solvente orgânico na preparação de daptomicina é reduzido por cromatografia por troca aniônica. Em uma modalidade preferida, FP-DA 13 é usada da maneira discutida acima.

Depois da segunda cromatografia por troca aniônica, a daptomicina purificada é despirogenada, filtrada e concentrada em condições refrigeradas. A filtração da daptomicina pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica. Em uma modalidade, a filtração e a despirogenação podem ser realizadas da seguinte maneira:

i) fornecer uma solução de daptomicina em condições nas quais a daptomicina está em um estado monomérico e não-micelar;

ii) filtrar a solução de daptomicina em condições nas quais a daptomicina vai passar pelo filtro mas os pirogênios não vão passar pelo

filtro, por exemplo, a solução de daptomicina tendo um pH de 6,0 - 8,0 e a solução sendo filtrada com um ultrafiltro classificado entre 3.000 NMW e 30.000 NMW;

5           iii) alterar a solução de daptomicina que atravessou o filtro para que a daptomicina se agregue, por exemplo alterando o pH da solução de daptomicina para 2,5 - 4,5 para que a daptomicina forme micelas;

          iv) filtrar a solução de daptomicina em condições nas quais a daptomicina vai ficar retida no filtro, por exemplo, concentrando a daptomicina em um ultrafiltro de 30.000 NMW ou menos , tal como uma membrana  
10 de osmose invertida; e

          v) recolher a daptomicina despirogenada.

          Em uma modalidade preferida, a daptomicina da etapa (ii) é filtrada sob pressão em um filtro de corte de peso molecular (MWCO) de 10.000 daltons a um pH de aproximadamente 7 - 8. Em uma modalidade  
15 mais preferida, a daptomicina está a uma concentração inicial inferior a 40 mg/ml, mais preferivelmente a uma concentração de aproximadamente 31,25 mg/ml. Nestas condições, a de preferência passa pelo filtro mas pirogênios tal como lipopolissacarídeos (LPS) não. Depois da ultrafiltração inicial, o pH do filtrado é baixado para pH 2,5 - 4,5 e o filtrado é concentrado  
20 em um ultrafiltro de MWCO de 10.000 até aproximadamente 120 mg/ml. Nestas condições, a daptomicina fica retida no filtro. Em uma modalidade preferida, o pH do filtrado é pH 3,5. Subseqüente à concentração, a concentração de daptomicina é ajustada para 105 mg/ml, verificada quanto aos níveis de endotoxina, e usada para encher frascos em condições assépticas.  
25 cas.

          Em uma outra modalidade, nanofiltração por osmose invertida é realizada a um pH de 1,5 - 3,0. O pH baixo e as condições refrigeradas são usados para retardar a degradação da daptomicina purificada. A daptomicina pode ser ainda filtrada por um filtro de 0,2 µm para reduzir a biocarga e  
30 em seguida liofilizada a granel ou em frascos.

          Como alternativa para as etapas de ultrafiltração e concentração acima, as frações eluídas contendo daptomicina são misturadas com buta-

nol (seja n-, iso- ou t-butanol) a um pH de aproximadamente 4,5, a uma razão maior que uma parte de butanol para nove partes de solução de daptomicina. Em uma modalidade preferida, uma parte de butanol é misturada com quatro partes de solução de daptomicina para dar uma solução de butanol a 20%. A solução de butanol-daptomicina é deixada separar nas fases orgânica e aquosa. A daptomicina se divide na fase orgânica, que é recolhida. A desidratação da daptomicina no solvente orgânico pode estabilizar a daptomicina e impedir a degradação da daptomicina purificada em daptomicina anidra e subsequente formação do isômero  $\beta$ . Finalmente, a daptomicina pode voltar à fase aquosa por adição de tampão a um pH 6,5 - 7,5 à fase orgânica. Depois da concentração ou colheita da daptomicina, a daptomicina é liofilizada.

Em uma outra modalidade da presente invenção, o método cromatográfico processual é usado para purificar lipopeptídeos diferentes de daptomicina, tais como A54145, LY303366, equinocandinas, pneumocandinas, aculeacina, surfactina, plipastatina B1, anfomicina ou o derivado lipopeptídico apresentado na Patente US 5.629.288. Em uma outra modalidade, o método cromatográfico processual é usado para purificar lipopeptídeos relacionados com daptomicina, inclusive o A54145, ou um lipopeptídeo apresentado nas Patentes US 4.537.717, 4.482.487, Re. 32.311, Re. 32.310, 5.912.226, atualmente em fase de reemissão como Série US N° 09/547.357, Pedidos Internacionais PCT WO 01/44272, WO 01/44274 e WO 01/44271, ou um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico.

Em uma outra modalidade da presente invenção, um "método da névoa de sal" [Genetic Engineering News, vol. 19. N° 20, páginas 1, 34 e 43, (15 de novembro de 1999)] é usado na purificação de daptomicina ou outros lipopeptídeos. O método da névoa de sal é um sistema à base de

membranas que separa separações seletivas com rendimento elevado. O método da névoa de sal pode ser usado com as etapas processuais descritas neste relatório ou separadamente para purificar daptomicina ou outros lipopeptídeos.

5                    Uma outra modalidade da presente invenção refere-se a um método cromatográfico que produz um lipopeptídeo altamente purificado não obténível pelos métodos cromatográficos da técnica anterior. O método cromatográfico compreende o uso de cromatografia por troca aniônica me-

10 lipopeptídeo. Em uma modalidade preferida, o método é usado para produzir daptomicina altamente purificada ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina. Este método, quando usado com daptomicina parcialmente purificada, produz daptomicina que é pelo menos 98% pura. O método também produz daptomicina que é isenta ou essencialmente isenta de daptomi-

15 cina anidro. O método compreende as etapas a seguir.

Daptomicina parcialmente purificada é preparada por qualquer método conhecido na técnica ou descrito neste relatório. A preparação de daptomicina é então purificada por cromatografia por troca aniônica melho-

20 ânions na presença de um tampão iônico modificado apropriado em condições nas quais a daptomicina se liga ao íon da resina em um estado monomérico e não-micelar. O tampão modificado compreende um agente de tamponamento tal como, sem limitação, acetato, fosfato, citrato e Tris-HCl, ou qualquer outro agente de tamponamento que tampona a um pH neutro. O

25 tampão modificado compreende ainda um ou mais agentes caotrópicos que incluem, sem limitação, guanidina, amônia, uréia, um agente redutor forte, benzoato, ascorbato ou outro intensificador iônico capaz de modificar o tampão para que a daptomicina seja facilmente separada das impurezas. A resina carregada de daptomicina é lavada com um tampão iônico modificado

30 apropriado para eluir impurezas, inclusive daptomicina anidra. A daptomicina é então eluída em condições que permitam a separação de daptomicina das impurezas que ficam ligadas à resina, inclusive o isômero  $\beta$ .

Em uma modalidade preferida, o tampão modificado está a um pH neutro (um pH de 6 a 8) e contém uréia 2 a 6 M. Em uma primeira modalidade, a resina trocadora de ânions é a resina Porous P150 ou Porous D50 (PE Biosystems). Em uma modalidade mais preferida, a resina trocadora de ânions é a Porous P150. Em uma modalidade preferida, a daptomicina é ligada à resina em um tampão de baixa resistência iônica, lavada com um tampão de resistência iônica média e eluída com um tampão de alta resistência iônica. Em uma modalidade preferida, a daptomicina é ligada à resina Porous P150 em um tampão Tris pH 7,0 contendo uréia 6 M. A resina Porous P150 carregada de daptomicina é lavada com três volumes de leite de tampão Tris ou outro tampão adequado contendo um nível de sal que remove os contaminantes e daptomicina anidra sem eluir a daptomicina. A daptomicina é eluída da resina Porous P150 com tampão Tris ou outro tampão adequado em condições de alta concentração de sal que vai deixar impurezas adicionais, inclusive uma porção significativa de isômero  $\beta$ , ligadas à coluna. Em uma outra modalidade preferida, a Porous P150 é usada e a daptomicina é ligada à resina em um tampão acetato pH 6,0 contendo uréia 2 M. A resina Porous P150 carregada de daptomicina é lavada e eluída de maneira similar ao método acima, com a diferença de que se usa um tampão de acetato pH 6,0 contendo uréia 2 M. O fracionamento do produto pode ser medido por HPLC ou por monitoramento com UV.

A cromatografia por troca aniônica melhorada com tampão modificado pode ser realizada por cromatografia de coluna ou pode ser realizada de modo intermitente. Também se pode usar cromatografia de fluxo radial, como descrito nas Patentes US 5.756.680, 4.865.729, 4.840.730 ou 4.708.782. A resina trocadora de ânions melhorada com tampão modificado pode ser lavada e eluída com gradientes escalonados de sal ou com um gradiente contínuo de sal. Um gradiente escalonado ou contínuo de sal adequado é aquele que permite a separação da daptomicina das impurezas que incluem, porém sem limitação, daptomicina anidra e isômero  $\beta$ . Em uma modalidade preferida, um gradiente contínuo de sal é aquele que varia de NaCl 0 a 1000 mM. Em uma modalidade mais preferida, um gradiente de sal

varia de 100 a 500 mM de NaCl ou de 0 a 400 de NaCl.

Em uma outra modalidade da presente invenção, a cromatografia por troca aniônica melhorada com tampão modificado é usada para purificar compostos lipopeptídicos diferentes da daptomicina.

5 Estes compostos lipopeptídicos incluem, sem limitação, A54145, LY303366, equinocandinas, pneumocandinas, aculeacina, surfactina e pliplastatina B1 (Tsuge et al., 1996, Arch. Microbiol. 165:243-51) e derivados de lipopeptídeos como os mostrados na Patente US 5.629.288. Em uma outra modalidade, a cromatografia por troca  
10 aniônica melhorada com tampão modificado é usada para purificar um lipopeptídeo relacionado com daptomicina tal como A54145, ou um lipopeptídeo descrito nas Patentes US 4.537.717, 4.482.487, Re. 32.311, Re. 32.310, 5.912.226, atualmente em fase de reemissão como Série US N° 09/547.357, Pedidos Internacionais PCT WO  
15 01/44272, WO 01/44274 e WO 01/44271, ou um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico.

20 Em uma outra modalidade da presente invenção, uma nova combinação das etapas da cromatografia processual é usada para purificar daptomicina ou lipopeptídeo relacionado com daptomicina. O método compreende cromatografia por troca aniônica, cromatografia de fase invertida de partículas pequenas e cromatografia por troca aniônica melhorada com  
25 tampão modificado. O método de purificação pode compreender ainda alterar as condições de fermentação nas quais o produto bruto contendo A21978C é produzido por *Streptomyces roseosporus*. Estes métodos produzem daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina que é pelo menos 98% puro. Em uma modalidade preferida, os métodos produzem  
30 daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina que é mais de 99% puro.

Uma modalidade preferida do método cromatográfico processual

está descrita abaixo.

*Streptomyces roseosporus* é fermentado com uma alimentação de ácido n-decanóico, da maneira descrita na Patente US 4.885.243, com a modificação de que a alimentação de ácido decanóico é mantida nos níveis mais baixos possíveis sem diminuir o rendimento total da fermentação, como descrito supra. Em uma modalidade alternativa, pode-se usar um estoque de alimentação diferente desde que ela forneça basicamente um grupo n-decanoíla para ser adicionado ao núcleo da daptomicina. Exemplos destes estoques de alimentação são, sem limitação, amida decanóica, ésteres decanóicos incluindo ésteres butílicos, fontes brutas de óleo de coco e palma, ácido decanóico de fonte animal, vários sais de ácido decanóico e fontes petroquímicas de ácido decanóico. Depois da fermentação, a solução extracelular é clarificada da maneira descrita acima. Em uma modalidade alternativa, a daptomicina pode ser extraída do micélio usando-se um solvente orgânico tal como n-butanol antes da clarificação em uma centrífuga ou filtro separador de solvente. Depois da clarificação do caldo de fermentação, o nível de daptomicina é enriquecido na solução clarificada primeiro por cromatografia por troca aniônica e em seguida por HIC como descrito acima.

Depois de completada a HIC, o solvente orgânico na preparação de daptomicina é reduzido por cromatografia por qualquer método conhecido na literatura. Em uma modalidade preferida, o solvente orgânico é reduzido por cromatografia por troca aniônica, como descrito acima. A daptomicina deve ser eluída da coluna em um tampão compatível com o tampão requerido para a cromatografia melhorada com tampão modificado. Alternativamente, o tampão de eluição pode ser trocado pelo tampão modificado por osmose invertida ou filtração em um filtro de MWCO de 10.000. Em uma modalidade preferida, o solvente orgânico é reduzido por evaporação ou diluição em tampão. Em uma terceira modalidade, o solvente de cromatografia de fase reversa e o sal residual são removidos usando osmose invertida a um pH de 1,5 - 4,0 ou ultrafiltração a um pH de 2,5 - 4,5. O produto resultante pode ser congelado para armazenamento em massa ou secado

por liofilização e em seguida reidratado em água ou no tampão usado para a cromatografia por troca aniônica melhorada com tampão modificado.

A daptomicina é ainda purificada por cromatografia por troca aniônica melhorada com tampão modificado como descrito supra.

5                   Depois da cromatografia por troca aniônica melhorada com tampão modificado, a daptomicina purificada é filtrada e concentrada em condições refrigeradas. A filtração da daptomicina pode ser feita por qualquer método conhecido na literatura. Em uma modalidade preferida, a daptomicina é despirogenada e concentrada da maneira descrita acima. Alternativa-  
10                   mente, a daptomicina pode ser concentrada por osmose invertida em condições refrigeradas a um pH de 1,5 a 4. O pH baixo e as condições refrigeradas são usados para retardar a degradação da daptomicina purificada.

                    Como alternativa para as etapas de filtração e concentração acima ou além das mesmas, as frações eluídas contendo daptomicina provenientes da cromatografia por troca aniônica melhorada com tampão modificado podem ser misturadas com butanol (seja n-, iso- ou t-butanol) a um  
15                   pH de aproximadamente 4,5, a uma razão maior que uma parte de butanol para nove partes de solução de daptomicina. Em uma modalidade preferida, uma parte de butanol é misturada com quatro partes de solução de daptomicina para dar uma solução de butanol a 20%. A solução de butanol-daptomicina é deixada separar nas fases orgânica e aquosa. A daptomicina se divide na fase orgânica, que é recolhida. A desidratação da daptomicina no solvente orgânico pode estabilizar a daptomicina e impedir a degradação da daptomicina purificada em daptomicina anidra e subsequente formação  
20                   do isômero  $\beta$ .

                    Depois da concentração ou colheita da daptomicina, a daptomicina é liofilizada.

                    Em uma outra modalidade da presente invenção, a cromatografia processual é usada para purificar lipopeptídeos diferentes de daptomicina, tais como aqueles descritos acima.  
30

### Formação de micelas de lipopeptídeos e métodos de uso das mesmas

Uma outra modalidade da invenção fornece micelas de lipopeptídeos, métodos para formar micelas de lipopeptídeos e métodos de uso das micelas de lipopeptídeos para purificação de lipopeptídeos e composições farmacêuticas. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo é uma molécula relacionada com daptomicina, incluindo, entre outras, daptomicina, A54145, um lipopeptídeo relacionado com daptomicina descrito na Patente US 4.537.717, 4.482.487, Re. 32.311, Re. 32.310, 5.912.226, atualmente na fase de reemissão como Série US N° 09/547.357, Pedidos Internacionais PCT WO 01/44272, WO 01/44274 e WO 01/44271, ou um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral n-decanoílica da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral n-octanoílica, n-nonanoílica, n-undecanoílica, n-dodecanoílica, n-tridecanoílica ou n-tetradecanoílica. Em uma modalidade mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina.

Micelas são agregados de moléculas anfipáticas. Em meios aquosos, as partes lipofílicas das moléculas são orientadas para o interior da micela e as partes hidrofílicas estão em contato com o meio aquoso. Micelas se formam espontaneamente em uma solução contendo moléculas anfipáticas se a concentração das moléculas for suficientemente alta.

A formação de micelas causa alterações em várias propriedades físicas de massa de uma solução, incluindo alterações na pressão osmótica, turvação, condutância elétrica, tensão superficial, atividades co-iônicas e contra-iônicas (no caso de moléculas anfipáticas iônicas), índice de refração, espectros UV e de RMN, volume molar parcial, viscosidade, coeficiente de difusão e solubilização em corante. A cmc pode ser determinada medindo-se uma ou mais das propriedades físicas micela-dependentes em função da concentração da molécula anfipática. O tamanho e o formato das micelas podem ser determinados por experiências de espalhamento dinâmico de laser, ultracentrifugação, viscosidade e/ou espalhamento de raios-X de baixo ângulo. Micelas também podem existir em fases de cristal líquido.

Lipopeptídeos podem ser agregados em micelas fornecendo-se uma concentração de lipopeptídeo maior que a cmc do lipopeptídeo. A cmc depende da natureza do lipopeptídeo e da temperatura, da concentração de sal e do pH da solução aquosa que compreende o lipopeptídeo. Quanto à natureza do lipopeptídeo, a cmc de um lipopeptídeo é reduzida pela adição de grupos  $\text{CH}_2$  às cadeias de carbonos lipofílicos. Assim, dada a cmc para daptomicina a uma concentração de sal, temperatura e pH particulares, então um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico ou n-nonanoílico terá uma cmc mais elevada, ao passo que um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico terá uma cmc mais baixa em relação à daptomicina.

Em uma modalidade da invenção, a cmc de um lipopeptídeo pode ser manipulada por adição ou subtração de um grupo  $\text{CH}_2$  ao lipopeptídeo. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo é A-21978, no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico. Em uma outra modalidade, pode-se calcular a cmc aproximada de um lipopeptídeo segundo os ensinamentos do relatório descritivo. Dada a cmc de um lipopeptídeo tal como daptomicina, pode-se calcular a cmc aproximada de um lipopeptídeo relacionado no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico. O cálculo acima pode ser feito por métodos conhecidos pelo versado na técnica.

Em uma outra modalidade preferida, dada a cmc para um lipopeptídeo, pode-se calcular a cmc aproximada para um lipopeptídeo que contenha uma porção peptídica relacionada. Em uma modalidade preferida, dada a cmc para daptomicina e dados os ensinamentos da técnica anterior,

pode-se calcular facilmente a cmc para um lipopeptídeo relacionado tal como A54145, um lipopeptídeo relacionado com daptomicina descrito na Patente US 4.537.717, 4.482.487, Re. 32.311, Re. 32.310, 5.912.226, atualmente na fase de reemissão como Série US N° 09/547.357, Pedidos Internacionais PCT WO 01/44272, WO 01/44274 e WO 01/44271.

Em uma outra modalidade da invenção, a cmc de um lipopeptídeo é manipulada alterando-se a temperatura da solução que compreende o lipopeptídeo. A cmc para um lipopeptídeo geralmente aumenta com o aumento da temperatura da solução. Assim, a formação de micelas é estimulada diminuindo-se a temperatura e é bloqueada aumentando-se a temperatura. Por exemplo, uma solução compreendendo um lipopeptídeo pode formar micelas a 4°C porque à esta temperatura a cmc é diminuída e a concentração de lipopeptídeo está acima da cmc; no entanto, a mesma solução de lipopeptídeo pode ser monomérica a 20°C porque a cmc aumentou com a temperatura e a concentração de lipopeptídeo agora é menor que a cmc. Assim, em uma modalidade preferida, a concentração de um lipopeptídeo é maior que a cmc a uma temperatura e é menor que a cmc a uma outra temperatura mais alta. Em uma modalidade mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina ou uma molécula relacionada com daptomicina, tal como aquelas descritas acima. Em uma modalidade ainda mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina.

Em uma outra modalidade preferida, a capacidade de manipular a formação de micelas de um lipopeptídeo usando-se temperaturas diferentes para afetar a cmc é usada na purificação do lipopeptídeo. Em uma modalidade mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina ou uma molécula relacionada, tal como aquelas descritas acima. Em uma modalidade ainda mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina. Em uma outra modalidade preferida, a capacidade de manipular a formação de micelas de lipopeptídeos alterando-se a temperatura é usada para fazer composições farmacêuticas que são micelares em certas condições de temperatura e monoméricas em outras condições de temperatura. Em uma modalidade preferida, as composições farmacêuticas compreendem dpto-

micina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina, como descrito acima. Em uma outra modalidade preferida, as composições farmacêuticas compreendem daptomicina.

Em uma outra modalidade da invenção, a adição de um eletrólito é usada para diminuir a cmc de um lipopeptídeo iônico. Em uma modalidade preferida, um sal, tal como NaCl, é adicionado a uma solução compreendendo lipopeptídeo para reduzir a repulsão entre os grupos carregados em uma micela de lipopeptídeos. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo é daptomicina ou uma molécula relacionada com daptomicina, tal como aquela descrita acima. Por exemplo, a porção peptídica da daptomicina contém três resíduos ácido aspártico e um resíduo ácido L-treo-3-metilglutâmico (3-MG), todos carregados a um pH neutro. Assim, a adição de um eletrólito, tal como NaCl ou um sal equivalente, vai diminuir a cmc da daptomicina. Em uma modalidade preferida, a concentração de sal é de pelo menos 100 mM. Em uma modalidade mais preferida, a concentração de sal é de 150 mM a 300 mM. Em uma modalidade ainda mais preferida, o sal é NaCl.

Uma redução na cmc também é observada com a adição de um eletrólito para outros lipopeptídeos, tais como moléculas relacionadas com daptomicina que contenham resíduos ácido aspártico, resíduos 3-MG ou outros resíduos carregados. Portanto, em uma modalidade preferida, um sal é adicionado a uma solução para reduzir a cmc de um lipopeptídeo relacionado com daptomicina, tal como A54145, um lipopeptídeo relacionado com daptomicina descrito na Patente US 4.537.717, 4.482.487, Re. 32.311, Re. 32.310, 5.912.226, atualmente na fase de reemissão como Série US N° 09/547.357, Pedidos Internacionais PCT WO 01/44272, WO 01/44274 e WO 01/44271, ou um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico. Em uma outra modalidade, a concentração de sal é diminuída para aumentar a cmc de um lipopeptídeo

iônico. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo iônico é daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina, como descrito acima.

Em uma outra modalidade preferida, a capacidade de manipular a formação de micelas de um lipopeptídeo alterando-se a concentração de eletrólito para afetar a cmc é usada na purificação do lipopeptídeo. Em uma modalidade mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina ou uma molécula relacionada com daptomicina, tal como aquelas descritas acima. Em uma modalidade ainda mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina. Em uma outra modalidade preferida, a capacidade de manipular a formação de micelas de lipopeptídeos pela concentração de eletrólito é usada para fazer composições farmacêuticas que são micelares em certas concentrações de eletrólito e monoméricas em outras concentrações de eletrólito. Em uma modalidade preferida, as composições farmacêuticas compreendem daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina, como descrito acima. Em uma outra modalidade preferida, as composições farmacêuticas compreendem daptomicina.

Em uma outra modalidade da invenção, o pH de uma solução compreendendo um lipopeptídeo é manipulado para influenciar a cmc do lipopeptídeo. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo é daptomicina ou uma molécula relacionada com daptomicina, tal como aquelas descritas acima. Em uma modalidade ainda mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina. Em uma modalidade, o pH é manipulado para que a concentração de um lipopeptídeo seja maior que a cmc a um pH e menor que a cmc a um outro pH. Por exemplo, para daptomicina, a cmc a um pH 4,0 em água a uma temperatura de 20 - 25°C foi muito menor que a um pH 6,0 ou 7,5. A um pH 4,0, a cmc é de aproximadamente 400 µg/ml nestas condições. Veja figura 15. Além disso, a daptomicina é monomérica mesmo a 150 mg/ml de daptomicina a um pH 6,5 (onde a concentração de sal varia de 150 mM a 300 mM de NaCl e a temperatura é de 4°C). Assim, para daptomicina, a cmc a um pH 4,0 é menor que em soluções de pH mais alto ou pH mais baixo. A alteração na cmc a diferentes níveis de pH também pode ser usada para outros lipopeptídeos carrega-

dos, inclusive lipopeptídeos que estão relacionados com a daptomicina, como descrito supra.

Em uma outra modalidade, a capacidade de manipular a formação de micelas de um lipopeptídeo alterando-se o pH para afetar a cmc é usada na purificação do lipopeptídeo. Em uma modalidade mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina ou uma molécula relacionada com daptomicina, tal como aquelas descritas acima. Em uma modalidade ainda mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina. Em uma outra modalidade preferida, a capacidade de manipular a formação de micelas de lipopeptídeos pelo pH é usada para fazer composições farmacêuticas que são micelares a um pH particular e monoméricas em um outro pH. Em uma modalidade preferida, as composições farmacêuticas compreendem daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina, como descrito acima. Em uma outra modalidade preferida, as composições farmacêuticas compreendem daptomicina.

Em um aspecto da invenção, o lipopeptídeo pode fazer parte de uma micela mista. Uma micela mista é aquela na qual o lipopeptídeo forma uma micela com ou mais outros tipos de moléculas anfipáticas. Exemplos de tais moléculas anfipáticas incluem, sem limitação, ácidos graxos de cadeia média e longa, fosfoglicerídeos (fosfolipídios), esfingomielina, glicolipídios e colesterol. Em uma modalidade, álcoois de comprimento de cadeia médio podem ser incorporados na micela, onde eles reduzem a repulsão eletrostática e o bloqueio estérico, dessa forma reduzindo a cmc do lipopeptídeo. Em uma outra modalidade, a adição de um ou mais tipos de moléculas anfipáticas pode ser usada para alterar a estrutura da micela de uma micela esférica (veja figura 14, parte a) para uma estrutura de bicamada lipídica plana (veja figura 14, parte b) ou para uma estrutura lipossômica (veja figura 14, parte c). Em geral, micelas mistas compreendendo fosfolipídios e/ou glicolipídios vão fazer com que uma micela esférica seja convertida em uma estrutura de bicamada lipídica, que serve como barreiras de permeabilidade para íons e moléculas mais polares.

Em uma outra modalidade, a micela mista pode ser formada de dois ou mais lipopeptídeos diferentes. Por exemplo, a micela mista pode ser formada de daptomicina e um outro lipopeptídeo, tal como A54145 ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina, como discutido supra. Em uma  
5 outra modalidade, a micela mista pode compreender um lipopeptídeo junto com uma ou mais moléculas anfipáticas terapeuticamente úteis, tal como um antibiótico, um antiinflamatório ou um agente antifúngico, que são conhecidos pelos versados na técnica. Em uma outra modalidade, o lipopeptídeo é daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina tal como  
10 A54145, os lipopeptídeos relacionados com daptomicina descritos acima ou um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico. Em uma modalidade mais preferida, o  
15 lipopeptídeo é daptomicina.

Em uma outra modalidade da invenção, a micela, seja mista ou compreendendo um único tipo de molécula lipopeptídica, compreende um lipopeptídeo que é terapeuticamente útil. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo é um antibiótico. Em uma modalidade ainda mais preferida, o  
20 lipopeptídeo é daptomicina. A daptomicina forma micelas de aproximadamente 5,4 nm (54 Å) a uma concentração de 1 mg/ml a um pH de aproximadamente 4,0 em água. Veja figura 16.

Em uma outra modalidade preferida, as micelas compreendem um ou mais tipos diferentes de substâncias terapêuticas. Em uma modalidade, uma substância terapêutica pode ser misturada com o lipopeptídeo em  
25 solução para que seja formada uma micela do lipopeptídeo e a substância terapêutica fique aprisionada no interior hidrofóbico. Em uma outra modalidade, uma substância terapêutica é misturada com um lipopeptídeo e uma ou mais outras moléculas anfipáticas de modo que seja formada uma micela  
30 do lipopeptídeo e outras moléculas anfipáticas e substância terapêutica se encontre no interior hidrofóbico. Em uma modalidade preferida, a substância terapêutica é um antibiótico, um antiinflamatório ou um agente antifúngico.

Em uma modalidade mais preferida, a substância terapêutica é um antibiótico ou um agente antifúngico descrito abaixo. Em uma outra modalidade preferida, a substância terapêutica é solúvel em um ambiente hidrofóbico mas não é solúvel em uma solução aquosa.

5                    Em uma outra modalidade da invenção, os lipopeptídeos podem ser transformados em lipossomas, que são vesículas nas quais uma bicamada lipídica esférica circunda o interior aquoso. Veja figura 14, parte c. Os lipossomas são vantajosos para usos terapêuticos porque se fundem facilmente com uma membrana plasmática e também podem ser usados para  
10                    aprisionar substâncias em seu compartimento aquoso interno. A substância pode ser uma substância que seja solúvel somente em soluções aquosas. Em uma modalidade, uma solução compreendendo um lipopeptídeo e uma outra molécula anfipática pode ser sonicada para produzir lipossomas. Em uma outra modalidade, o lipopeptídeo sozinho pode ser sonicado para produzir lipossomas. Em uma modalidade preferida, o lipossoma compreende  
15                    daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina tal como A54145, um lipopeptídeo descrito na Patente US 4.537.717, 4.482.487, Re. 32.311, Re. 32.310, 5.912.226, atualmente na fase de reemissão como Série US N° 09/547.357, Pedidos Internacionais PCT WO 01/44272, WO  
20                    01/44274 e WO 01/44271, ou um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico. Em uma modalidade mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina.

25                    Em uma outra modalidade preferida, os lipossomas compreendem uma ou mais substâncias terapêuticas em seus compartimentos aquosos internos. Em uma modalidade preferida, a substância terapêutica é um antibiótico, um antiinflamatório ou um agente antifúngico. Em uma modalidade mais preferida, a substância terapêutica é um antibiótico ou um agente antifúngico descrito abaixo. Em uma outra modalidade  
30                    preferida, uma composição farmacêutica compreende o lipossoma.

Em uma modalidade preferida, uma composição farmacêutica

compreende disposições do tipo micelar de lipopeptídeos contendo uma substância terapêutica. As disposições do tipo micelar de lipopeptídeos podem ser micelas esféricas, micelas mistas ou lipossomas. Composições farmacêuticas compreendendo micelas de lipopeptídeos podem minimizar a irritação local por administração por injeção ou por via intravenosa. Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende um sal, um tampão para manter um pH particular e micelas. Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica compreende um ou mais agentes para estabilizar as micelas e/ou para estabilizar o lipopeptídeo ou outra substância terapêutica. Em uma modalidade, a composição farmacêutica também compreende uma ou mais substâncias terapêuticas. Em uma modalidade preferida, a substância terapêutica é um antibiótico, um antiinflamatório ou um agente antifúngico. Em uma modalidade mais preferida, a substância terapêutica é um antibiótico ou um agente antifúngico descrito abaixo. A substância terapêutica pode ser suplementar à substância terapêutica que está incorporada na micela, ou pode ser o agente terapêutico que está incorporado na micela.

A composição farmacêutica pode ser secada ou liofilizada, em cujo caso as micelas se formam quando uma solução aquosa, tal como água, ou um tampão é adicionado à composição farmacêutica. Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica é liofilizada e contém uma concentração fisiológica de sal quando reconstituída e um tampão que mantém um pH ao qual micelas se formam espontaneamente à temperatura ambiente quando se adiciona água estéril ou outro tampão. Em uma modalidade ainda mais preferida, uma composição farmacêutica compreende daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado, tal como A54145, um lipopeptídeo relacionado com daptomicina descrito supra, ou um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico. Em uma modalidade ainda mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina. Em uma outra modalidade, a composição

farmacêutica é aquosa. Isto é preferível quando lipossomas são usados. Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica compreende um agente estabilizante para lipossomas.

Em um outro aspecto da invenção, a solução micelar é isolada e/ou purificada. Em uma modalidade, micelas são isoladas de substituintes menores por ultrafiltração. A escolha da membrana de ultrafiltração será baseada no tamanho da micela. Em geral, uma membrana de NMW 10.000 ou NMW 30.000 será suficiente para reter micelas enquanto permite que substituintes menores, tal como contaminantes, a atravessem. Em uma outra modalidade, micelas podem ser isoladas e/ou purificadas por diálise, centrifugação por gradiente de densidade ou cromatografia por exclusão de tamanho. Estes métodos são bastante conhecidos na literatura. Em uma modalidade, as micelas são mais de 30% puras, onde a pureza é medida como o peso das micelas comparado com o peso das formas monoméricas do lipopeptídeo ou de outras moléculas. Em uma modalidade preferida, as micelas são mais de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% puras.

Em um outro aspecto da invenção, a capacidade de formar micelas de lipopeptídeos e em seguida dissociá-las alterando-se a temperatura, o pH, a concentração de eletrólito e/ou a concentração de lipopeptídeo oferece um método para purificar lipopeptídeos. Em uma modalidade, o método compreende purificar lipopeptídeos de contaminantes de baixo peso molecular pelo fato de se submeter os lipopeptídeos a condições nas quais os lipopeptídeos formem micelas e em seguida separar as micelas dos contaminantes por uma técnica de seleção de tamanho, tal como ultrafiltração ou cromatografia por exclusão de tamanho. Em uma outra modalidade da invenção, o método compreende concentrar lipopeptídeos submetendo-se os lipopeptídeos a condições nas quais os lipopeptídeos formem micelas e em seguida concentrando-se os mesmos por uma técnica de seleção de tamanho. Em uma modalidade mais preferida, o método compreende a purificação e a concentração como etapa única.

Em uma outra modalidade da invenção, o método compreende purificar um lipopeptídeo de contaminantes de alto peso molecular, inclusive

pirogênios (por exemplo lipopolissacarídeo), submetendo-se o lipopeptídeo a condições nas quais o lipopeptídeo seja monomérico e em seguida separando-se a solução de lipopeptídeo monomérico dos contaminantes de alto peso molecular por uma técnica de separação de tamanhos. Em uma modalidade preferida, a técnica de separação de tamanhos é ultrafiltração, como discutido acima. Em uma outra modalidade preferida, o lipopeptídeo é daptomicina ou lipopeptídeo relacionado, tal como A54145, o lipopeptídeo relacionado com daptomicina descrito supra, ou um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico. Em uma modalidade ainda mais preferida, o lipopeptídeo é daptomicina.

Uma modalidade preferida do método cromatográfico processual usando micelas para purificada daptomicina está descrita abaixo.

*Streptomyces roseosporus* é fermentado com uma alimentação de ácido n-decanoílico da maneira descrita acima. Depois da fermentação, a solução extracelular é clarificada da maneira descrita supra.

A preparação clarificada é então aplicada a uma resina trocadora de ânions, tal como FP-DA 13, como descrito acima. A daptomicina é eluída da coluna com um a três volumes de coluna de um tampão de alto teor de sal contendo NaCl 300 a 500 mM.

A preparação de daptomicina eluída é ajustada para um pH de 2,5 a 5,0 usando um ácido. Em uma modalidade preferida, o ácido é ácido fosfórico diluído. A um pH de 2,5 a 4,7, NaCl 300 a 500 mM e uma temperatura de 2 - 15°C, a daptomicina forma uma micela.

A preparação de daptomicina é filtrada em uma membrana de ultrafiltração de NMW 10.000 a 30.000. Durante a ultrafiltração, a preparação de daptomicina é lavada com um tampão contendo acetato de sódio 30 mM pH 3,5 e a temperaturas de até 15°C. A concentração inicial de sal é NaCl 300 mM devido às condições de eluição, mas a concentração de sal diminui à medida em que a lavagem continua. Como a daptomicina está na

forma micelar, ela fica retida no filtro ao passo que as impurezas menores que 10.000 a 30.000 (dependendo do filtro usado) passam pelo filtro. A preparação de daptomicina obtida é aproximadamente 85 - 90% pura.

5 Como uma etapa opcional, a preparação de daptomicina pode ser diluída e seu pH aumentado para 6,5 para converter a daptomicina para um estado monomérico. A preparação de daptomicina é então passada pela membrana de ultrafiltração de NMW 10.000. Esta etapa opcional diminui significativamente o teor de pirogênios.

#### Métodos para analisar a pureza da daptomicina

10 Uma outra modalidade da invenção fornece métodos analíticos para medir a pureza da daptomicina.

Na técnica anterior, muitos dos contaminantes que eram co-purificados com a daptomicina eram não-resolvidos ou não-identificados porque a capacidade de visualizar e medir impurezas era limitada pelos métodos analíticos e equipamentos disponíveis. Veja, por exemplo, Patente 15 US 4.874.843 e Kirsch et al. O desenvolvimento de sistemas e técnicas de HPLC analíticos mais sensíveis permite a resolução de inúmeros contaminantes que existem nas bateladas de daptomicina preparadas pelos métodos da técnica anterior. Os métodos de HPLC de maior resolução demonstram que a daptomicina purificada pelos métodos da técnica anterior está 20 contaminada com as impurezas anteriormente identificadas, tal como daptomicina anidra e isômero  $\beta$ , e outros contaminantes anteriormente desconhecidos que co-purificam com daptomicina (e co-eluem nas condições de detecção por HPLC anteriormente estabelecidas) durante a prática dos métodos da técnica anterior. A identificação desses contaminantes agora 25 permite o desenvolvimento de métodos destinados a eliminar esses contaminantes.

Como discutido acima, daptomicina anidra e o isômero  $\beta$  foram anteriormente descritos como impurezas que ocorriam de forma persistente e consistente durante a preparação de daptomicina. Usando as análises por 30 HPLC descritas neste relatório, aproximadamente mais dozes impurezas produzidas durante a produção de daptomicina foram distinguidas, algumas

das quais ainda não haviam sido identificadas. Essas impurezas não eram removidas depois da purificação pelo método descrito na Patente US 4.874.843. Pelo menos dez desses compostos foram identificados (veja, por exemplo, figuras 2-11). Além disso, pelo menos seis desses compostos não são resultado direto da reação que produz daptomicina anidra e a forma do isômero  $\beta$  de daptomicina, ao contrário são compostos produzidos por outros processos não-relacionados que ocorrem durante a fermentação ou purificação de daptomicina. O método da presente invenção, descrito abaixo, também reduz significativamente os níveis de inúmeras dessas impurezas (veja exemplos).

Qualquer método conhecido na literatura pode ser usado para medir a quantidade de outros compostos em uma preparação de daptomicina. Métodos para identificar contaminantes de daptomicina incluem, sem limitação, espectroscopia de massa, espectroscopia do infravermelho, eletroforese capilar e espectroscopia por ressonância magnética nuclear. Um método preferido para medir a quantidade de outros compostos em uma preparação de daptomicina é a HPLC.

Foram usados dois métodos para medir impurezas de daptomicina na presente invenção. O primeiro método é um método de resolução ligeiramente mais baixa que o segundo método. Em ambos os métodos, usa-se um sistema de HPLC Shimadzu ou HP com o software Turbochrom versão 4.1 da PE Nelson. O "primeiro" método de resolução está resumido na Tabela 1 o "segundo" método de resolução está resumido na Tabela 2.

Tabela 1

1. Sistema de distribuição de solvente:
  - Modo: bombeamento isocrático
  - Velocidade de fluxo: 1,5 ml/min
- 5                   Tempo de operação: 30 minutos
2. Solvente A: 34% acetonitrila em 0,5%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  a pH 4,5  
 Solvente B: 20% acetonitrila em 0,5%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  a pH 4,5  
 A condição alvo é reter daptomicina a  $15,0 \pm 0,5$  minutos. O solvente B pode ser usado junto com o solvente A para ajustar as condições da fase móvel da HPLC para obter o tempo de retenção desejado.
- 10
3. Refrigerador do classificador automático: 5 (4 a 6) °C
4. Volume de injeção: 5  $\mu\text{l}$  a 75  $\mu\text{l}$  (20  $\mu\text{l}$  normal)
5. Coluna: IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5  $\mu$ , 4,6 mm x 250 mm (ou equivalente)
- 15 6. Pré-coluna: IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5  $\mu$ , 4,6 mm x 30 mm (ou equivalente)
7. Comprimento de onda de detecção: 214 nm
8. Temperatura da coluna: ambiente
9. Integração: Um sistema de computador ou integrador capaz de mediar a área de pico.
- 20

Tabela 2

1. Sistema de distribuição de solvente:
  - Modo: bombeamento isocrático
  - Velocidade de fluxo: 1,5 ml/min
  - 5 Tempo de operação: 75 minutos
2. Solvente A: 20% acetonitrila em 0,45%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  a pH 3,25  
 Solvente B: 50% acetonitrila em 0,45%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  a pH 3,25  
 A condição alvo é aproximadamente 35% acetonitrila em 0,45%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  a pH 3,25 (50% do solvente B) para reter daptomicina a  
 10  $36,0 \pm 1,5$  minutos; a razão dos solventes será usada para ajustar a composição da fase móvel da HPLC para obter o tempo de retenção desejado.
3. Refrigerador do classificador automático: 5 (4 a 6) °C
4. Volume de injeção: 5  $\mu\text{l}$  a 75  $\mu\text{l}$  (20  $\mu\text{l}$  normal)
- 15 5. Coluna: IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5  $\mu$ , 4,6 mm x 250 mm (ou equivalente)
6. Pré-coluna: IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5  $\mu$ , 4,6 mm x 30 mm (ou equivalente)
7. Comprimento de onda de detecção: 214 nm
- 20 8. Temperatura da coluna: 25 (22 a 28) °C
9. Integração: Um sistema de computador ou integrador capaz de mediar a área de pico.

Lipopeptídeos purificados, composições farmacêuticas e métodos de uso dos mesmos

Constitui um outro objetivo da presente invenção fornecer lipopeptídeos purificados, bem como sais, ésteres, amidas, éteres e formas protegidas dos mesmos, assim como formulações farmacêuticas compreendendo lipopeptídeos purificados ou seus sais. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo é daptomicina ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina, como descrito acima. Constitui outro objetivo da presente invenção fornecer composições farmacêuticas compreendendo disposições do tipo micelar de lipopeptídeos. Em uma modalidade preferida, as micelas de lipopeptídeos são micelas compreendendo daptomicina ou um ou mais lipopeptídeos relacionados com daptomicina. Todas as referências feitas a micelas de lipopeptídeos neste relatório referem-se não somente a todas as disposições do tipo micelar de lipopeptídeos, mas contemplam especificamente a daptomicina, ou um lipopeptídeo relacionado, tal como A45145, os lipopeptídeos relacionados com daptomicina descritos supra, ou um antibiótico do tipo A-21978 no qual a cadeia lateral do tipo ácido graxo n-decanoílico da daptomicina é substituída por uma cadeia lateral do tipo ácido graxo n-octanoílico, n-nonanoílico, n-undecanoílico, n-dodecanoílico, n-tridecanoílico ou n-tetradecanoílico. Ainda, todas as referências a disposições do tipo micelar de lipopeptídeos feitas neste relatório contemplam especificamente micelas esféricas ou mistas e lipossomas, como descrito supra.

Lipopeptídeos purificados, sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos ou micelas de lipopeptídeos podem ser formulados para administração oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, aerossol, tópica ou parenteral para o tratamento terapêutico ou profilático de doenças, particularmente infecções bacterianas. Em uma modalidade preferida, o lipopeptídeo purificado é daptomicina purificada ou um lipopeptídeo relacionado com daptomicina. A referência feita neste relatório a "daptomicina purificada", "lipopeptídeo relacionado com daptomicina purificado" ou "lipopeptídeo purificado" inclui sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos. Micelas de daptomicina, de lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou de outros li-

popeptídeos podem ser formuladas usando-se qualquer veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável que seja compatível com a daptomicina ou com o lipopeptídeo de interesse. Veja, por exemplo, 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 e I. Ash, 1996; The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, ed. S. Budavari, anual; Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA: Martindale: The Complete Drug Reference, ed. K. Parfitt, 1999; e Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Pergamon Press, NY, ed. L. S. Goodman et al.; cujos conteúdos estão aqui incorporados a título de referência, para uma descrição geral dos métodos para administrar vários agentes antimicrobianos para terapia humana. As micelas de daptomicina purificada, de lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou de outros lipopeptídeos desta invenção podem ser misturadas com veículos e excipientes farmacêuticos convencionais e usadas na forma de comprimidos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, wafers, cremes e outros. As micelas de daptomicina, de lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou de outros lipopeptídeos podem ser misturadas com outros agentes terapêuticos e antibióticos, conforme discutido neste relatório. As composições compreendendo um composto desta invenção vão conter de cerca de 0,1 a cerca de 90% em peso do composto ativo, e mais genericamente de cerca de 10 a cerca de 30%.

As composições da invenção podem ser distribuídas usando-se sistemas de distribuição controlada (por exemplo, cápsulas) ou sistemática (por exemplo matrizes biocorrosíveis). Os sistemas de distribuição retardada exemplificativos para distribuição de drogas que são adequados para administração das composições da invenção estão descritos nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 4.452.775 (concedida a Kent), 5.239.660 (concedida a Leonard), 3.854.480 (concedida a Zaffaroni).

As composições podem conter veículos e excipientes comuns, tais como amido de milho ou gelatina, lactose, sacarose, celulose microcristalina, caulim, manitol, fosfato dicálcico, cloreto de sódio e ácido algíni-

co. As composições podem conter croscarmelose sódica, celulose microcristalina, amido de milho, glicolato de amido sódico e ácido algínico.

5 Aglutinantes de comprimidos que podem ser incluídos são acácia, metilcelulose, carboximetilcelulose sódica, polivinilpirrolidona (povidona), hidroxipropil metilcelulose, sacarose, amido e etilcelulose.

Lubrificantes que podem ser usados incluem estearato de magnésio ou outros estearatos metálicos, ácido esteárico, silicone fluido, talco, ceras, óleos e sílica coloidal.

10 Agentes aromatizantes tais como hortelã, óleo de gualtéria, aroma cereja ou outros também podem ser usados. Também pode ser desejável adicionar um agente colorante para dar à forma de apresentação um aspecto mais estético ou para ajudar a identificar o produto.

Para uso oral, formulações sólidas tais como comprimidos e cápsulas são particularmente úteis. Também podem ser feitas preparações  
15 de liberação sistemática ou entericamente revestidas. Para aplicações pediátricas e geriátricas, são especialmente adequados suspensões, xaropes e comprimidos mastigáveis. Para administração oral, as composições farmacêuticas estão, por exemplo, na forma de um comprimido, cápsula, suspensão ou líquido. A composição farmacêutica é feita de preferência na forma  
20 de uma unidade de apresentação contendo uma quantidade terapêuticamente eficaz do ingrediente ativo. Exemplos de tais unidades de apresentação são comprimidos e cápsulas. Para fins terapêuticos, os comprimidos e as cápsulas podem conter, além do ingrediente ativo, veículos convencionais tais como agentes aglutinantes, por exemplo, goma acácia, gelatina,  
25 polivinilpirrolidona, sorbitol ou tragacanto; cargas, por exemplo, fosfato de cálcio, glicina, lactose, amido de milho, sorbitol ou sacarose; lubrificantes, por exemplo, estearato de magnésio, polietileno glicol, sílica ou talco; desintegrantes, por exemplo, amido de batata, agentes aromatizantes ou colorantes, ou agentes umectantes aceitáveis. As preparações líquidas orais em  
30 geral estão na forma de soluções aquosas ou oleosas, suspensões, emulsões, xaropes ou elixires e podem conter aditivos convencionais tais como agentes de suspensão, agentes emulsificantes, agentes não aquosos, con-

servantes, agentes colorantes e agentes aromalizantes. As preparações líquidas orais podem compreender micelas de lipopeptídeos ou formas monoméricas do lipopeptídeo. Exemplos de aditivos para preparações líquidas incluem acácia, óleo de amêndoa, álcool etílico, óleo de coco fracionado, gelatina, xarope de glicose, glicerina, gorduras comestíveis hidrogenadas, lecitina, metil celulose, metil ou propil para-hidroxibenzoato, propileno glicol, sorbitol ou ácido sórbico.

Para uso intravenoso (IV), uma forma de daptomicina, lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou outro lipopeptídeo solúvel em água pode ser dissolvida em qualquer dos fluidos intravenosos comumente usados e administrada por infusão. Para micelas de lipopeptídeo, o lipopeptídeo é dissolvido em uma formulação intravenosa em condições nas quais o lipopeptídeo está presente a uma concentração acima de sua cmc. O versado na técnica pode variar o pH, a temperatura ou a concentração de sal de acordo com os ensinamentos desta invenção para obter uma solução intravenosa compreendendo micelas de lipopeptídeo. Ademais, a solução de lipopeptídeo pode ser sonicada para obter lipossomas do lipopeptídeo. Formulações intravenosas podem incluir veículos, excipientes ou estabilizantes que incluem, sem limitação, cálcio, albumina de soro humano, citrato, acetato, cloreto de cálcio, carbonato e outros sais. Fluidos intravenosos incluem, sem limitação, solução salina fisiológica ou solução de Ringer. A daptomicina ou o lipopeptídeo relacionado com daptomicina também pode ser colocado em injetores, cânulas, cateteres e linhas.

As formulações para administração parenteral podem estar na forma de soluções ou suspensões estéreis isotônicas aquosas ou não aquosas para injeção. Estas soluções ou suspensões podem ser preparadas a partir de pós ou grânulos estéreis tendo um ou mais dos veículos mencionados para uso nas formulações para administração oral. Micelas de lipopeptídeo podem ser particularmente desejáveis para administração parenteral. Os compostos podem ser dissolvidos em polietileno glicol, propileno glicol, etanol, óleo de milho, álcool benzílico, cloreto de sódio e/ou vários tampões. Para preparações intramusculares, uma formulação estéril de um

composto lipopeptídico ou de uma forma de sal solúvel adequada do composto, por exemplo o sal cloridrato, pode ser dissolvido e administrado em um diluente farmacêutico tal como água para injeção (WFI), solução salina fisiológica ou glicose a 5%.

5                    Micelas de lipopeptídeos podem ser particularmente desejáveis para administração parenteral porque provavelmente não vão causar irritação local no local de injeção. Sem querer se ater a qualquer teoria, é provável que as micelas de lipopeptídeos causem menos irritação local do que os lipopeptídeos monoméricos porque as caudas dos lipídios, que podem causar irritação depois da injeção, estarão seqüestradas no interior da micela, ao passo que o núcleo do peptídio, que tem menos probabilidade de causar irritação local do que a cauda do lipídio, ficará exposta ao tecido. Micelas de lipopeptídeos podem ser preparadas para preparações intramusculares e parenterais de acordo com os ensinamentos desta invenção para obter uma  
10                    preparação compreendendo micelas de lipopeptídeos. Além disso, a solução de lipopeptídeos pode ser sonicada para obter lipossomas de lipopeptídeos. Uma forma insolúvel adequada do composto também pode ser preparada e administrada como uma suspensão em uma base aquosa ou uma base oleosa farmacêuticamente aceitável, por exemplo um éster de um ácido graxo de cadeia longa tal como oleato de etila.  
15                    20

                      Pode-se fazer formas de depósito injetáveis formando-se matrizes microencapsuladas do composto em polímeros biodegradáveis tal como polilactídeo-poliglicolídeo. Dependendo da razão da droga para o polímero e da natureza do polímero particular empregado, a taxa de liberação da  
25                    droga pode ser controlada. Exemplos de outros polímeros biodegradáveis incluem poli(ortoésteres) e poli(anidridos). Formulações de depósito injetáveis também são preparadas por aprisionamento da droga em microemulsões que são compatíveis com os tecidos do corpo.

                      Para uso tópico, os compostos e as micelas da presente invenção também podem ser preparados em formas adequadas para serem aplicados à pele ou às membranas mucosas do nariz e da garganta, e podem adquirir a forma de cremes, pomadas, sprays líquidos ou inalantes, pastilhas  
30

ou tinturas para garganta. Tais formulações tópicas podem incluir ainda compostos químicos tal como dimetil sulfóxido (DMSO) para facilitar a penetração superficial do ingrediente ativo. Para preparações tópicas, uma formulação estéril de daptomicina, de lipopeptídeo relacionado com daptomicina, de formas de sal adequadas dos mesmos ou de uma micela de lipopeptídeo pode ser administrada na forma de creme, pomada, spray ou outro curativo tópico. As preparações tópicas também podem estar na forma de bandagens que foram impregnadas com uma composição de daptomicina purificada, de lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou de micelas do lipopeptídeo.

Para aplicações aos olhos ou ouvidos, os compostos da presente invenção podem ser apresentados na forma líquida ou semilíquida formulada em bases hidrofóbicas ou hidrofílicas como pomadas, cremes, loções, tinturas ou pós.

Para administração retal, os compostos da presente invenção podem ser administrados na forma de supositórios misturados com veículos convencionais tais como manteiga de cacau, cera ou outro glicerídeo.

Para preparações aerossóis, uma formulação estéril de daptomicina purificada ou de um lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou de uma forma de sal do composto pode ser usada em inaladores, tais como inaladores de dose controlada, e nebulizadores. Uma formulação estéril de uma micela de lipopeptídeo também pode ser usada para preparação aerossol. As formas aerossolizadas podem ser especialmente úteis para o tratamento de infecções respiratórias, tais como pneumonia e sinusites.

Alternativamente, os compostos da presente invenção podem estar na forma de pó para reconstituição no veículo farmacologicamente aceitável apropriado no momento da aplicação. Se a forma em pó deve ser reconstituída como micelas de lipopeptídeo, o pó pode compreender um tampão e/ou um sal para que a reconstituição com uma quantidade particular de água estéril ou solução salina faça com que o lipopeptídeo forme micelas. Alternativamente, a forma em pó pode conter instruções quanto à quantidade e ao tipo de veículo farmacologicamente aceitável a ser usado

para reconstituir o lipopeptídeo de forma a obter micelas. Em uma outra modalidade, a forma de apresentação unitária do composto pode ser uma solução do composto, um sal do mesmo ou uma micela de lipopeptídeo em um diluente adequado em ampolas estéreis hermeticamente vedadas. A concentração do composto na forma de apresentação unitária pode variar, por exemplo, de cerca de 1 por cento a cerca de 50 por cento, dependendo do composto usado e de sua solubilidade e da dose desejada pelo médico. Se as composições contêm unidades de dosagem, cada unidade de dosagem conterá de preferência de 50 - 500 mg do material ativo. Para tratamento de um homem adulto, a dosagem empregada de preferência varia de 100 mg a 3 g, ao dia, dependendo da via e da frequência de administração.

Em um outro aspecto, esta invenção fornece um método para tratar uma infecção, especialmente aquelas causadas por bactérias gram-positivas, em seres humanos e outros animais. O termo "tratar" é usado para designar tanto a prevenção de uma infecção como o controle de uma infecção estabelecida depois de o animal hospedeiro ter sido infectado. Uma infecção estabelecida pode ser aguda ou crônica. O método compreende administrar ao ser humano ou outro animal uma dose eficaz de um composto desta invenção. Uma dose eficaz geralmente varia entre cerca de 0,1 e cerca de 25 mg/kg de daptomicina purificada, de lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou de sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos. A daptomicina ou o lipopeptídeo relacionado com daptomicina pode ser monomérico ou fazer parte de uma micela de lipopeptídeos. Uma dose preferida varia de cerca de 1 a cerca de 25 mg/kg de daptomicina purificada ou de lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou de sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos. Uma dose mais preferida varia de cerca de 1 a cerca de 12 mg/kg de daptomicina purificada ou de um sal farmacologicamente aceitável da mesma.

Em uma modalidade, a invenção fornece um método para tratar uma infecção, especialmente aquelas causadas por bactérias gram-positivas, em um indivíduo com uma quantidade terapêuticamente

eficaz de daptomicina ou de outro lipopeptídeo antibacteriano. A daptomicina ou o lipopeptídeo antibacteriano podem ser monoméricos ou estar na forma de uma micela de lipopeptídeo. Procedimentos exemplificativos para distribuir um agente antibacteriano estão descritos na Patente U.S. N° 5.041.567 concedida a Rogers e no pedido de patente PCT número EP94/02552 (publicação n° WO 95/05384), cujos conteúdos estão aqui incorporados em sua integridade a título de referência. Conforme aqui usado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade de daptomicina ou de lipopeptídeo antibacteriano de acordo com a presente invenção que previne o aparecimento, alivia os sintomas ou interrompe a evolução de uma infecção bacteriana. O termo "tratar" é definido como administrar, a um indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da invenção, tanto para prevenir a ocorrência de uma infecção como para controlar ou eliminar uma infecção. O termo "indivíduo", conforme aqui descrito, é definido como um mamífero, uma planta ou uma cultura de células. Em uma modalidade preferida, um indivíduo é um ser humano ou outro paciente animal com necessidade de tratamento com um composto lipopeptídico.

O composto antibiótico lipopeptídico pode ser administrado como uma dose diária única ou em múltiplas doses ao dia. O regime de tratamento pode requerer administração por períodos de tempo prolongados, por exemplo por vários dias ou por duas a quatro semanas. A quantidade por dose administrada ou a quantidade total administrada vai depender de fatores tais como a natureza e a severidade da infecção, a idade e o estado de saúde do paciente, a tolerância do paciente ao antibiótico e o microorganismo ou microorganismos envolvidos na infecção. Um método de administração está descrito no pedido Internacional PCT WO 00/18419.

Os métodos da presente invenção compreendem administrar daptomicina purificada ou outro antibiótico lipopeptídico, ou composições farmacêuticas dos mesmos, a um paciente com necessidade do mesmo, em uma quantidade que seja eficaz para reduzir ou eliminar a infecção bacteri-

ana gram-positiva. A daptomicina ou o antibiótico lipopeptídico pode estar na forma monomérica ou pode estar presente em uma micela de lipopeptídeos. O antibiótico pode ser administrado por via oral, parenteral, por inalação, por via tópica, retal, nasal, bucal, vaginal ou por um reservatório implantado, bomba externa ou cateter. O antibiótico pode ser preparado para usos oftálmicos ou aerosolizados. A daptomicina purificada, o antibiótico lipopeptídico ou composições farmacêuticas dos mesmos também podem ser injetados diretamente ou administrados em um abscesso, ventrículo ou junta. Administração parenteral inclui injeção ou infusão subcutânea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, cisternal, intratecal, intra-hepática, intralesional e intracraniana. Em uma modalidade preferida, a daptomicina ou outro lipopeptídeo é administrado por via intravenosa, subcutânea ou oral.

O método da presente invenção pode ser usado para tratar um paciente com uma infecção bacteriana no qual a infecção é causada ou exacerbada por qualquer tipo de bactéria gram-positiva. Em uma modalidade preferida, daptomicina purificada, lipopeptídeo relacionado com daptomicina, outro lipopeptídeo ou composições farmacêuticas dos mesmos são administrados a um paciente de acordo com os métodos desta invenção. Em uma outra modalidade preferida, a infecção bacteriana pode ser causada ou exacerbada por bactérias que incluem, porém sem limitação, estafilococos suscetíveis à meticilina e resistentes à meticilina (inclusive *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, estafilococos coagulase-negativos), *Staphylococcus aureus* suscetível a intermediários de glicopeptídios (GISA), estreptococos suscetíveis à penicilina e resistentes à penicilina (inclusive *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococci* do grupo C, *Streptococci* do grupo G e estreptococos viridans), enterococos (inclusive as cepas suscetíveis à vancomicina e resistentes à vancomicina tais como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*), *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 asaccarolyticus, Peptostreptococcus magnus, Peptostreptococcus micros, Peptostreptococcus prevotii, Peptostreptococcus productus, Propionibacterium acnes e Actinomyces spp.*

A atividade antibacteriana da daptomicina contra cepas classicamente "resistentes" é comparável àquela contra cepas classicamente "suscetíveis" em experiências *in vitro*. Além disso, o valor da concentração inibidora mínima (MIC) para daptomicina contra cepas suscetíveis é tipicamente 4 vezes menor que aquele da vancomicina. Assim, em uma modalidade preferida, daptomicina purificada, antibiótico lipopeptídico relacionado com daptomicina ou composições farmacêuticas dos mesmos são administrados de acordo com os métodos desta invenção a um paciente que apresenta uma infecção bacteriana resistente a outros antibióticos, inclusive vancomicina. Além disso, ao contrário dos antibióticos glicopeptídicos, a daptomicina apresenta uma atividade bactericida dependente de concentração rápida contra organismos gram-positivos. Assim, em uma modalidade preferida, daptomicina purificada, antibiótico lipopeptídico ou composições farmacêuticas dos mesmos são administrados de acordo com os métodos desta invenção a um paciente com necessidade de uma terapia com antibiótico de ação rápida.

O método da presente invenção pode ser usado para uma infecção bacteriana gram-positiva de qualquer órgão ou tecido do corpo. Estes órgãos ou tecido incluem, sem limitação, músculo esquelético, pele, corrente sanguínea, rins, coração, pulmão e ossos. O método da invenção pode ser usado para tratar, sem limitação, infecções de pele e de tecido mole, bacteremia e infecções do trato urinário. O método da invenção pode ser usado para tratar infecções respiratórias adquiridas na comunidade que incluem, sem limitação, otite média, sinusite, bronquite crônica e pneumonia, inclusi-

ve pneumonia causada por *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae* resistentes a drogas. O método da invenção também pode ser usado para tratar infecções mistas que compreendem diferentes tipos de bactérias gram-positivas, ou que compreendem bactérias tanto gram-positivas como gram-negativas, inclusive bactérias aeróbicas, caprofílicas ou anaeróbicas. Estes tipos de infecção incluem infecções intra-abdominais e infecções obstétricas/ginecológicas. Os métodos da invenção podem ser usados em terapia de redução para infecções hospitalares, que incluem, sem limitação, pneumonia, sepse intra-abdominal, infecções de pele e de tecido mole e infecções ósseas e articulares. O método da invenção também pode ser usado para tratar uma infecção que inclui, sem limitação, endocardite, nefrite, artrite séptica e osteomielite. Em uma modalidade preferida, qualquer das doenças descritas acima pode ser tratada usando daptomicina purificada, antibiótico lipopeptídico ou composições farmacêuticas dos mesmos. Além disso, as doenças podem ser tratadas usando daptomicina ou antibiótico lipopeptídico seja na forma monomérica ou micelar.

Daptomicina, lipopeptídeo relacionado com daptomicina ou outro lipopeptídeo também pode ser administrado na dieta ou refeição de um paciente ou animal. Se administrada como parte da ingestão total de um regime dietético, a quantidade de daptomicina ou outro lipopeptídeo pode ser inferior a 1% em peso da dieta e de preferência não superior a 0,5% em peso. O regime alimentar para animais pode ser de rações normais às quais daptomicina ou lipopeptídeo pode ser adicionado ou pode ser adicionado a uma pré-mistura.

O método da presente invenção também pode ser praticado com a administração simultânea de um ou mais agentes antifúngicos e/ou um ou mais antibióticos diferentes de daptomicina ou de outro antibiótico lipopeptídico. A coadministração de um agente antifúngico e de um antibiótico diferente de daptomicina ou de um outro antibiótico lipopeptídico pode ser útil para infecções mistas tais como aquelas causadas por diferentes tipos de bactérias gram-positivas, aquelas causadas tanto por bactérias gram-positivas como gram-negativas ou aquelas causadas por tanto por bactéria

como por fungo. Além do mais, a daptomicina ou outro antibiótico lipopeptídico pode melhorar o perfil de toxidez de um ou mais antibióticos coadministrados. Foi demonstrado que a administração de daptomicina e um aminoglicosídeo pode melhorar a toxidez renal causada pelo aminoglicosídeo.

- 5 Em uma modalidade preferida, um antibiótico e/ou um agente antifúngico podem ser administrados simultaneamente com daptomicina purificada, outro antibiótico lipopeptídico ou em composições farmacêuticas compreendendo daptomicina purificada ou um outro antibiótico lipopeptídico.

A coadministração de um outro agente terapêutico com daptomicina ou um outro antibiótico lipopeptídico pode ser feita usando-se daptomicina ou antibiótico lipopeptídico em uma forma monomérica ou micelar. Como discutido acima, micelas esféricas de lipopeptídeos podem ser usadas para ajudar a solubilizar agentes que apresentam pouca solubilidade em água. Além disso, lipossomas de lipopeptídeo podem ser usados para  
10 aprisionar agentes que são solúveis em meios aquosos no interior da vesícula dos lipossomas. Seguindo os ensinamentos do relatório descritivo, o versado na técnica está apto a fazer micelas de lipopeptídeo compreendendo  
15 agentes terapêuticos, tais como agentes antiinflamatórios, agentes antifúngicos e outros antibióticos.

20 Agentes antibacterianos e classes dos mesmos que podem ser coadministrados com daptomicina ou outros antibióticos lipopeptídicos incluem, sem limitação, penicilinas e drogas relacionadas, carbapenems, cefalosporinas e drogas relacionadas, aminoglicosídeos, bacitracina, gramícidina, mupirocina, cloranfenicol, tianfenicol, fusidato sódico, lincomicina,  
25 clindamicina, macrolídeos, novobiocina, polimixinas, rifamicinas, espectinomicina, tetraciclina, vancomicina, teicoplanina, estreptograminas, agentes antifolato que incluem sulfonamidas, trimethoprima e suas combinações e pirimetamina, antibacterianos sintéticos que incluem nitrofuranos, metenamina mandelato, e metenamina hipurato, nitroimidazóis, quinolonas, fluorquinolonas, isoniazid, ethambutol, pirazinamida, ácido para-aminossalicílico  
30 (PAS), ciclosserina, capreomicina, etionamida, protionamida, tiacetazona, viomicina, eveminomicina, glicopeptídeo, gliciliciclina, cetolídeos, oxazolidi-

nona; imipenen, amicacina, netilmicina, fosfomicina, gentamicina, ceftriaxona, Ziracin, LY 333328, CL 331002, HMR 3647, Linezolid, Synercid, Aztreonam e Metronidazol, Epiroprim, OCA-983, GV-143253, Sanfetrinem sódico, CS-834, Biapenem, A-99058.1, A-165600, A-179796, KA 159, Dynemicin A, 5 DX8739, DU 6681; Cefluprenam, ER 35786, Cefoselis, Sanfetrinem celexetil, HGP-31, Cefpirome, HMR-3647, RU-59863, Mersacidin, KP 736, Rifalazil; Kosan, AM 1732, MEN 10700, Lenapenem, BO 2502A, NE-1530, PR 39, K130, OPC 20000, OPC 2045, Venepim, PD 138312, PD 140248, CP 111905, Sulopenem, ritipenam acoxyl, RO-65-5788, ciclotialidina, Sch- 10 40832, SEP-132613, micacocidin A, SB-275833, SR-15402, SUN A0026, TOC 39, carumonam, Cefozopran, Cefetamet pivoxil e T 3811.

Em uma modalidade preferida, os agentes antibacterianos que podem ser coadministrados com daptomicina de acordo com esta invenção incluem, sem limitação, imipenen, amicacina, netilmicina, fosfomicina, gentamicina, ceftriaxona, teicoplanina, Ziracin, LY 333328, CL 331002, HMR 15 3647, Linezolid, Synercid, Aztreonam e Metronidazol.

Agentes antifúngicos que podem ser coadministrados com daptomicina ou outro antibiótico lipopeptídico incluem, sem limitação, Caspofungen, Voriconazol, Sertaconazol, IB-367, FK-463, LY-303366, Sch-56592, 20 Sitafloracin, polienos DB-289 tais como Anfotericina, Nistatina, Primaricina; azóis tais como Fluconazol, Itraconazol e Cetoconazol; alilaminas tais como Naftifina e Terbinafina; e antimetabólitos tais como Flucitosina. Outros agentes antifúngicos incluem, sem limitação, aqueles descritos por Foster et al. em Drug Discovery Today 5:25-32 (2000), aqui incorporado a título de 25 referência. Foster et al. apresentam compostos antifúngicos que incluem Corinecandina, Mer-WF3010, Fusacandinas, Artriquitina/LL 15G256γ, Sor-darinas, Cispentacina, Azoxibacilina, Aureobasidina e Kafrefungina.

Daptomicina ou outro antibiótico lipopeptídico, inclusive lipopeptídeos relacionados com daptomicina, pode ser administrado de acordo com este método até que a infecção bacteriana seja erradicada ou reduzida. 30 Em uma modalidade, daptomicina ou outro lipopeptídeo é administrado por um período de 3 dias a 6 meses. Em uma modalidade preferida, daptomici-

na ou outro lipopeptídeo é administrado por 7 a 56 dias. Em uma modalidade mais preferida, daptomicina ou outro lipopeptídeo é administrado por 7 a 28 dias. Em uma modalidade ainda mais preferida, daptomicina ou outro lipopeptídeo é administrado por 7 a 14 dias. Daptomicina ou outro lipopeptídeo pode ser administrado por um período de tempo mais longo ou mais curto, se desejado.

Para que esta invenção possa ser completamente entendida, são dados os exemplos a seguir. Estes exemplos são ilustrativos apenas e não devem ser interpretados como limitativos do escopo da invenção de forma alguma.

#### Exemplo 1

Uma cultura de fermentação da cepa 15998 de *S. roseosporus* NRRL foi realizada em uma fermentação de alimentação controlada de ácido decanóico a níveis que otimizam a produção do antibiótico ao mesmo tempo em que minimizam a produção de contaminantes. A alimentação de ácido decanóico residual foi medida por cromatografia gasosa e o nível residual alvo foi de 10 ppm de ácido decanóico do início da indução (aproximadamente na hora 30) até a colheita. Centrifugação da cultura e subsequente análise do caldo clarificado foram usados para medir a produção de daptomicina por HPLC. O título da colheita variou tipicamente entre 2,1 e 2,6 gramas por litro de caldo de fermentação.

A fermentação foi colhida seja por microfiltração usando o sistema Pall-Sep ou por centrifugação em escala comercial e filtro de profundidade. O caldo clarificado foi aplicado a uma resina trocadora de ânions, Mitsubishi FP-DA 13, lavado com 30 mM de NaCl a um pH 6,5 e eluído com 300 mM de NaCl a um pH 6,0 - 6,5. Alternativamente, a coluna de FP-DA 13 foi lavada com 60 mM de NaCl a um pH 6,5 e eluída com 500 mM de NaCl a um pH 6,0 - 6,5. O material eluído foi aplicado a uma resina de HIC, HP-20ss, lavado com 30% de acetonitrila, e eluído com 35% de acetonitrila a um pH 4,0 - 5,0. Alternativamente, a resina de HIC foi lavada com 45% de álcool isopropílico e eluída com 55 - 60% de álcool isopropílico. O material eluído foi aplicado à resina FP-DA 13 e lavado e eluído como acima. A eta-

pa de troca aniônica final reduziu o solvente de um terço ou mais. Diafiltração por osmose invertida e concentração a um pH 1,5 - 5,2 foram realizadas usando-se um filtro de 0,2 µm e a preparação de daptomicina foi congelada. Uma diafiltração por osmose invertida final foi feita com água para injeção (WFI) para lavar a daptomicina e ajustar sua concentração antes do enchimento estéril. Frascos ou quantidades em massa de daptomicina foram então liofilizados.

### Exemplo 2

Daptomicina foi produzida em uma cultura de fermentação de *S. roseosporus* e Daptomicina parcialmente purificada (9,9 kg) foi purificada por microfiltração de 5500 litros de caldo de fermentação pelo método descrito na Patente U.S. 4.885.243. A daptomicina parcialmente purificada foi ainda purificada pelo método descrito na Patente U.S. N° 4.874.843, e resultou em uma preparação de daptomicina em massa com uma pureza de 91%. A preparação de daptomicina continha quatorze impurezas por análise por HPLC (veja exemplo 10). A preparação de daptomicina foi aplicada a uma resina trocadora de ânions Poros P150 (PE Biosystems) em tampão Tris pH 7,0 contendo 6 M de uréia e deixada ligar-se à resina. A resina foi lavada com três volumes de coluna de tampão antes do início de um gradiente de NaCl no mesmo tampão. Alternativamente, os contaminantes podem ser eficazmente removidos da coluna com um nível fixo de sal de 30 mM de NaCl. A eluição de daptomicina purificada da resina ocorreu a aproximadamente 300 mM de NaCl durante um gradiente de 0 a 1000 mM de NaCl. A daptomicina eluída da coluna era mais que 99% pura, medida pelo "primeiro" método de HPLC. A daptomicina purificada continha somente um contaminante detectável de daptomicina. Daptomicina anidra e isômero β não foram detectáveis (menos de 0,01% de contaminação). O nível do contaminante não identificado foi maior que 0,1% e menor que 0,5%.

### Exemplo 3

Uma preparação de daptomicina em massa com uma pureza de 91% foi preparada da maneira descrita no exemplo 2. O produto foi aplicado a uma resina trocadora de ânions Poros D50 (PE Biosystems) em tampão

acetato pH 7,0 contendo 6 M de uréia. A resina Poros D50 foi lavada e eluída da mesma maneira que aquela descrita no exemplo 2. A daptomicina eluída da coluna era 96,92% pura, medida pelo "segundo" método de HPLC. O produto desta invenção continha somente duas das quatorze impurezas  
5 iniciais (menos de 0,5% de contaminação). Daptomicina anidro não pôde ser detectada na preparação de daptomicina purificada (menos de 0,01% de contaminação e com quantificação precisa a menos de 0,05%).

#### Exemplo 4

Um caldo de fermentação contendo daptomicina foi produzido  
10 da maneira descrita no exemplo 2. O caldo de fermentação foi clarificado por microfiltração. O produto clarificado foi extraído com 20% de n-butanol ou iso-butanol a um pH 4,5 (uma parte de butanol para quatro partes de solução clarificada). Foi feita a reextração da solução clarificada para obter um rendimento de daptomicina parcialmente purificada superior a 90% da daptomicina total na solução clarificada. A daptomicina foi recuperada da fase  
15 butanol pela adição de um tampão aquoso de pH 6,5 em um volume que é metade ou mais do volume de butanol para extrair daptomicina da fase butanólica para a fase aquosa. A etapa de extração de butanol resultou em uma preparação de daptomicina parcialmente purificada que era 5 vezes  
20 mais purificada e 10 vezes mais concentrada em relação à solução clarificada.

A preparação de daptomicina aquosa foi então purificada pelo método descrito na Patente U.S. Nº 4.874.843, resultando em daptomicina 91% pura. A daptomicina continha quatorze impurezas. O produto foi apli-  
25 cado a uma resina Poros D50 em um tampão Tris a um pH 7,0 contendo 6 M de uréia. A resina foi lavada com três volumes de leito de tampão Tris a um pH 7,0 contendo 6 M de uréia antes do início de um gradiente de NaCl de 0 a 1000 mM no mesmo tampão. Eluição da daptomicina purificada da resina ocorreu a aproximadamente 300 mM de NaCl. A daptomicina era 98% pura,  
30 medida pelo "segundo" método de HPLC.

#### Exemplo 5

Daptomicina é fermentada da maneira descrita no exemplo 2.

Os 5500 litros de caldo de fermentação contêm 13 kg de daptomicina. O caldo de fermentação é extraído diretamente com 20% de n-butanol pH 4,5, que divide a daptomicina no butanol. Foram feitas reextrações do caldo de fermentação com butanol para obter um rendimento superior a 90% da daptomicina total no caldo de fermentação. A fase butanólica é extraída com um tampão acetato aquoso pH 6,5, resultando em daptomicina que é 5 vezes (35%) mais purificada e 10 vezes mais concentrada em relação ao caldo de fermentação. A daptomicina aquosa é microfiltrada pelo método descrito na Patente US 4.885.243, em seguida purificada pelo método da Patente U.S. N° 4.874.843. Este método resulta em daptomicina com uma pureza de aproximadamente 91%. A daptomicina contém 14 impurezas pelo método de HPLC utilizado na técnica anterior. O produto é aplicado a uma coluna de resina Poros D50 em um tampão acetato de pH 7,0 contendo 6 M de uréia. Lavagem e eluição da resina foram realizadas da maneira indicada no exemplo 2. O produto da etapa cromatográfica é aproximadamente 98% a 99% puro, medido pelo segundo método de HPLC.

#### Exemplo 6

Daptomicina foi produzida em uma cultura de fermentação de *S. roseosporus* com a diferença de que foi usada uma alimentação reduzida de ácido decanóico residual para melhorar a qualidade da fermentação para cerca de 10% de pureza quando clarificado por microfiltração ou centrifugação. O nível de ácido decanóico foi monitorado e periodicamente ajustado para manter os níveis de ácido decanóico residual em menos de 50 ppm e de preferência entre 1 e 10 ppm durante a fermentação. O caldo de fermentação foi microfiltrado pelo método descrito na Patente U.S. 4.885.243 para produzir 12,1 kg de daptomicina parcialmente purificada a partir de 5500 litros de caldo de fermentação. O caldo de fermentação clarificado foi ligado à resina trocadora de ânions, FP-DA 13 (Mitsubishi) em tampão acetato a um pH neutro, lavado em tampão acetato contendo 30 mM de NaCl, e subseqüentemente eluído com tampão acetato a 300 mM de NaCl. Esta etapa de troca aniônica produziu daptomicina com uma pureza superior a 70%. Esta daptomicina parcialmente purificada foi ainda purificada pelo

método descrito na Patente US 4.874.843 com a modificação de que foi usada a resina HP-20ss. Especificamente, a daptomicina parcialmente purificada foi introduzida em HP-20ss em tampão acetato contendo 10% de acetonitrila, lavada com tampão acetato contendo 30% de acetonitrila e eluída com 40% de acetonitrila em tampão acetato, resultando em daptomicina com uma pureza de cerca de 94 a 96%, medida pelo "segundo" método de HPLC. O produto foi submetido à cromatografia por troca aniônica melhorada com tampão modificado usando a resina Poros D50 da maneira descrita no exemplo 5. A daptomicina era mais de 99% pura e continha somente duas das quatorze impurezas produzidas pelos métodos descritos na técnica anterior.

#### Exemplo 7

Uma preparação de daptomicina com uma pureza de 93% foi preparada da maneira descrita no exemplo 2. O produto foi aplicado a uma resina Poros P150 (PE Biosystems) em tampão acetato de pH 6,0 contendo 2 M de uréia. A resina Poros P150 foi lavada com três volumes de coluna do tampão. A daptomicina foi eluída da resina usando-se um gradiente de 0 a 400 mM de NaCl no tampão acetato de pH 6,0 contendo 2 M de uréia. A daptomicina eluiu entre 150 e 300 mM de NaCl. A daptomicina eluída da coluna era 99,0 a 99,5% pura, medida pelo "primeiro" método de HPLC. A daptomicina continha quantidades de traço de quatro impurezas que eram inferiores a 1% do total de daptomicina. Daptomicina anidra não pôde ser detectada na preparação de daptomicina purificada (menos de 0,02% de contaminação).

#### Exemplo 8

Uma preparação de daptomicina com uma pureza de 93% foi preparada da maneira descrita no exemplo 2. O produto foi aplicado a uma resina Poros P150 (PE Biosystems) em tampão acetato de pH 6,0 contendo 2 M de uréia. A coluna foi lavada com seis volumes de coluna de NaCl 60 mM em tampão acetato pH 6,0 contendo 2 M de uréia (o "tampão de lavagem"). O tampão de lavagem pode variar de 50 - 75 mM de NaCl. A lavagem remove virtualmente toda a daptomicina anidra. A daptomicina foi eluí-

da com dezesseis volumes de coluna de NaCl 250 mM de NaCl em tampão acetato de pH 6,0 contendo 2 M de uréia. A daptomicina era 98,5 a 99,5% pura, medida pelo "primeiro" método de HPLC.

#### Exemplo 9

5                    Uma preparação de daptomicina descrita no exemplo 2 foi preparada usando-se um método que reduziu significativamente a concentração de solvente necessária para realizar a cromatografia em HP-20ss. Inesperadamente, o solvente para eluição de daptomicina, 40% de acetonitrila ou 55 - 60% de álcool isopropílico, foi reduzido para 12% e 25%, respectivamente, quando a cromatografia em HP-20ss foi conduzida a um pH neutro  
10                    ao invés do pH ácido descrito na Patente U.S. 4.874.843. Em uma modalidade preferida, mudanças de pH podem ser usadas para reciclar a resina HP-20ss sem remoção do solvente.

                      Depois de eluição de uma coluna de FP-DA13 a um pH 6,5 -  
15                    7,0, a daptomicina foi introduzida em uma coluna de HP-20ss equilibrada, tal como aquela que fora equilibrada em acetato 60 mM, pH 6,6. A coluna foi lavada com cinco a oito volumes de leito de coluna (CBV) de tampão de lavagem. Um tampão de lavagem exemplificativo é 5% álcool isopropílico/60 mM acetato, pH 6,6. A daptomicina foi eluída da coluna com tampão de eluição.  
20                    Um tampão de eluição exemplificativo é dois a três CBV de 25% álcool isopropílico/60 mM acetato, pH 6,6. A coluna é extraída com tampão de extração. Em uma modalidade, a coluna é extraída com um CBV de 40% álcool isopropílico/60 mM acetato, pH 6,6 - 7,0. A solução de daptomicina é ajustada para um pH de 3,5 - 4,0 e é recolocada na coluna de HP-20ss para  
25                    aumentar ainda mais a pureza. Em uma modalidade, a daptomicina eluída da coluna de HP-20ss a um pH 6,5 é ajustada para pH 3,5 usando-se ácido fosfórico 0,25 M. A solução de daptomicina é recolocada na coluna de HP-20ss previamente extraída que foram equilibrada em acetato 60 mM, pH 3,5. A coluna é lavada com um tampão de ajuste de pH para que o pH chegue a  
30                    6,5. Um tampão de ajuste de pH exemplificativo é cinco a oito CBV de 5% álcool isopropílico/60 mM acetato, pH 6,6. A daptomicina é eluída com tampão de eluição e pode ser ainda purificada por troca aniônica ou outros

métodos de purificação, se desejado. A coluna de HP-20ss é extraída com tampão de extração e limpa antes da reutilização. Um processo de limpeza exemplificativo inclui lavagem com três CBV de NaOH 0,5 M, lavagem com um CBV de água e em seguida lavagem com ácido fosfórico 0,25 M antes do equilíbrio. A coluna pode ser guardada em NaOH 0,5 M.

#### Exemplo 10

Daptomicina em massa preparada da maneira descrita no exemplo 2 foi caracterizada por HPLC semipreparatória e caracterizada por cromatografia líquida/espectroscopia de massa (LC/MS) usando ambos os modos de íons positivos e negativos. Um perfil de impureza da daptomicina em massa antes da cromatografia sobre a resina trocadora de ânions Poros P150 está mostrado na Tabela 3 e um cromatograma da preparação de daptomicina em massa está mostrado na figura 12.

Tabela 3

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

A impureza 1 (CB-131012), que elui a aproximadamente 7,96 minutos, (PM 1638) é proposta como um produto da hidrólise de daptomicina com lactona (figura 4). Os resultados parecem coincidir com LY212218 anteriormente identificada por Lilly como um derivado aberto do anel decílico da daptomicina.

A impureza 2 (CB-131011), que elui a aproximadamente 9,11 minutos, (PM 1638) também é proposta como um produto da hidrólise do isômero  $\beta$  com lactona (figura 5).

A impureza 3 (CB-131008), que elui a aproximadamente 11,54 minutos, (PM 745) é proposta como um lipopeptídeo linear que consiste em uma cadeia de cinco aminoácidos contendo triptofânio, asparagina, aspartato, treonina e glicina com uma cadeia de ácido decanóico (figura 6). Este resultado parece coincidir com LY213928 anteriormente identificada por Lilly.

A impureza 4 (CB-131006), que elui a aproximadamente 12,28 minutos, (PM 1624) é proposta como um análogo oxidativo de daptomicina onde o aminoácido triptofânio fora oxidado para ácido cinúrico (figura 7).

A impureza 5, que elui a aproximadamente 13,10 minutos, (PM 1618) ainda não foi atribuída a nenhuma estrutura.

A impureza 6 (CB-130989) e a impureza 7 (CB-131005) co-eluem a aproximadamente 14,43 minutos. CB-130989 (PM 587) parece coincidir com LY213827, um lipopeptídeo linear que consiste em uma cadeia de três aminoácidos contendo triptofânio, asparagina e aspartato com uma cadeia de ácido decanóico (figura 8), anteriormente identificada por Lilly. CB-131005 (PM 1606) corresponde a um análogo de daptomicina onde falta um grupo metila no ácido decanóico (figura 9).

A impureza 8 (CB-131010), elui a aproximadamente 15,10 minutos, (PM 1620) coincide com LY213846 (isômero  $\beta$ ) anteriormente identificado por Lilly (figura 2). Os níveis de isômero  $\beta$  são superiores a 1%.

A impureza 9, que elui a aproximadamente 17,92 minutos, (PM 874) ainda não foi atribuída nenhuma estrutura.

As impurezas 10 e 11, que co-eluem a aproximadamente 19,57

minutos, ainda não foram atribuídas nenhuma estrutura.

A impureza 12 (CB-131009), que elui a aproximadamente 20,93 minutos, (PM 859) é proposta como um lipopeptídeo linear que consiste em uma cadeia de seis aminoácidos contendo triptofânio, asparagina, aspártico, treonina, glicina e ornitina com uma cadeia de ácido decanóico (figura 10).

A impureza 13 (CB-130952), que elui a aproximadamente 23,11 minutos, (PM 1602) é proposta como daptomicina anidra (figura 3) e parece ser a mesma que LY178480. Os níveis de daptomicina anidra são superiores a 1%.

A impureza 14 (CB-131078), que elui a aproximadamente 24,53 minutos, (PM 1634) parece ser a mesma que LY109208, anteriormente proposta por Lilly como um análogo de daptomicina contendo um grupo metila extra na cadeia de ácido decanóico (figura 11).

A daptomicina em massa pode ser purificada sobre a resina Poros P150 da maneira descrita acima nos exemplos 2 ou 7-8 ou pode ser purificada sobre a resina Poros D50 da maneira descrita acima nos exemplos 3-5. Depois da purificação sobre a resina Poros P150 da maneira descrita no exemplo 2, um cromatograma (figura 13) mostrou que a pureza de daptomicina era superior a 99,0%, com isômero  $\beta$  e daptomicina anidra abaixo do nível de detecção (menos de 0,05% do total). Há uma impureza não identificada que está presente em uma quantidade superior a 0,1% porém inferior a 0,5%.

#### Exemplo 11

Uma cultura de fermentação da cepa 15998 de *S. roseosporus* NRRL foi realizada em uma fermentação de alimentação controlada de ácido decanóico a níveis que otimizam a produção do antibiótico ao mesmo tempo em que minimizam a produção de contaminantes. A alimentação de ácido decanóico residual foi medida por cromatografia gasosa e o nível residual alvo foi de 10 ppm de ácido decanóico do início da indução (aproximadamente na hora 30) até a colheita. Centrifugação da cultura e subsequente análise do caldo clarificado foram usados para medir a produção de

daptomicina por HPLC. O título da colheita variou tipicamente entre 1,0 e 3,0 gramas por litro de caldo de fermentação.

A fermentação foi colhida seja por microfiltração usando o sistema Pall Sep ou por centrifugação em escala comercial e filtro de profundidade. O caldo clarificado foi aplicado a uma resina trocadora de ânions, Mitsubishi FP-DA 13, lavado com 30 mM de NaCl a um pH 6,5 e eluído com 300 mM de NaCl a um pH 6,0 - 6,5. Alternativamente, a coluna de FP-DA 13 foi lavada com 60 mM de NaCl a um pH 6,5 e eluída com 500 mM de NaCl a um pH 6,0 - 6,5. O pH foi ajustado para 3,0 a 4,8 e a temperatura foi ajustada para 2 - 15°C. Nestas condições, a daptomicina formou uma micela. A solução de daptomicina micelar foi purificada por lavagem da preparação micelar enquanto ela ficava retida em um ultrafiltro usando um filtro de NMW 10.000 (fibra oca UF da AG Technology Corp. ou equivalente) em qualquer configuração. As micelas de daptomicina ficaram retidas pelo filtro, mas um grande número de impurezas foram eliminadas porque passaram pelo filtro de NMW 10.000. Ultrafiltração das micelas de daptomicina aumentou a pureza da daptomicina de aproximadamente 40% para 80% ou mais.

O material eluído foi aplicado a uma resina de HIC, HP-20ss, lavado com 30% de acetonitrila, e eluído com 35% de acetonitrila a um pH 4,0 - 5,0. Alternativamente, a resina de HIC foi lavada com 20 - 30% de álcool isopropílico e eluída com 30 - 40% de álcool isopropílico a um pH 3,5 - 6,5. Nestas condições de solvente aumentado e pH mais alto igual a 6,0 - 7,5, a daptomicina reverteu para um estado não-micelar simples. O material eluído foi aplicado à coluna de resina FP-DA 13 e lavado e eluído como acima. A etapa de troca aniônica final reduziu o solvente de um terço ou mais. Diafiltração por osmose invertida e concentração a um pH 1,5 - 2,5 foram realizadas usando-se um filtro de 0,2 µm e a preparação de daptomicina foi congelada. Uma diafiltração por osmose invertida final foi feita com água para injeção (WFI) para lavar a daptomicina e ajustar sua concentração antes do enchimento estéril. Frascos ou quantidades em massa de daptomicina foram então liofilizadas.

### Exemplo 12

Daptomicina liofilizada purificada da maneira descrita em qualquer dos exemplos descritos acima, tal como descrito no exemplo 11, foi reconstituída em solução salina fisiológica (aproximadamente 140 mM de NaCl) a um pH de 4,0 - 5,0. Nestas condições, a daptomicina está presente como uma micela e pode ser usada para administração por injeção ou por via intravenosa, parenteral, oral ou tópica.

### Exemplo 13

Daptomicina foi produzida por fermentação e clarificada do caldo por microfiltração, como descrito no exemplo 11. O caldo clarificado foi aplicado a uma resina trocadora de ânions, Mitsubishi FP-DA 13, lavada com 30 mM de NaCl a um pH 6,5 e eluída com 300 mM de NaCl a um pH 6,0 - 6,5 para dar uma preparação de daptomicina aproximadamente 40% pura. O material eluído foi ajustado para pH 3,5 com ácido fosfórico diluído de modo que virtualmente toda a daptomicina formou micelas. A preparação de micelas foi carregada em uma membrana de ultrafiltração de NMW 10.000. A preparação de daptomicina foi lavada com acetato de sódio 30 mM pH 3,5 e a temperaturas de até 15°C. A redução de volume e a lavagem diminuíram o nível de contaminação, o que resultou em uma preparação de daptomicina 85% pura. A preparação de daptomicina pôde ser ainda purificada usando-se qualquer dos métodos descritos neste relatório.

### Exemplo 14

Daptomicina foi produzida por fermentação, clarificada do caldo por microfiltração e fracionada sobre a resina FP-DA 13 como descrito no exemplo 11. O material eluído foi ajustado para pH 3,5 com ácido fosfórico diluído de modo que virtualmente toda a daptomicina formou micelas. A preparação de micelas foi carregada em uma membrana de ultrafiltração de NMW 10.000. A preparação de daptomicina foi lavada com acetato de sódio 30 mM pH 3,5 e a temperaturas de até 15°C. A redução de volume e a lavagem diminuíram o nível de contaminação, o que resultou em uma preparação de daptomicina 80 - 90% pura. A preparação de daptomicina pôde ser ainda purificada usando-se qualquer dos métodos descritos neste relatório.

### Exemplo 15

Daptomicina foi produzida por fermentação e clarificada do caldo usando-se microfiltração, como descrito no exemplo 11. A preparação foi purificada usando-se cromatografia de interação hidrofóbica, como descrito na Patente US 4.874.843, aqui incorporada a título de referência. Nesse método foi usada cromatografia de coluna repetida sobre a resina HP-20 ou HP-20ss. A pureza da daptomicina foi de 93% com impurezas visíveis em cromatogramas de HPLC e pirogênio mensurável. O produto foi diluído em água e seu pH foi ajustado para 6,5 com NaOH ou equivalente. A preparação de daptomicina foi filtrada por uma membrana de ultrafiltração de NMW 10.000. Nestas condições, a daptomicina era monomérica e passou pela membrana de ultrafiltração. O produto resultante continuou 93% puro, mas várias impurezas que estavam presentes a 0,1 - 0,2% foram removidas pela membrana de ultrafiltração. Além disso, o teor de pirogênio foi reduzido para níveis não detectáveis.

### Exemplo 16

Uma preparação de daptomicina com aproximadamente 93% de pureza foi preparada da maneira descrita no exemplo 15. A preparação de daptomicina foi convertida para um estado micelar diminuindo-se o pH para 4,7 com HCl ou equivalente e resfriando-se rapidamente a preparação de daptomicina para 2 - 5°C. O produto foi concentrado de 400 litros para três litros e até uma concentração final de aproximadamente 100 mg/ml por filtração em uma membrana de ultrafiltração de NMW 10.000. Nestas condições, a daptomicina foi retida pela membrana. Isto resultou em um grande aumento da concentração de daptomicina. A pureza foi de aproximadamente 93%.

### Exemplo 17

Uma preparação de daptomicina foi preparada da maneira descrita no exemplo 16. Frascos foram enchidos com aproximadamente 250 mg de daptomicina e liofilizados. A daptomicina foi reconstituída em 50 ml de solução salina 150 mM estéril a um pH de 4,0 - 5,0 para ser administrada a um paciente ser humano ou animal. A dose de daptomicina a ser adminis-

trada vai depender da natureza da infecção, da idade e do peso do paciente, e da espécie de animal. A um pH de 4,0 - 5,0 em solução salina 150 mM, a daptomicina vai estar presente em um estado micelar, que é solúvel e adequado para injeção intravenosa, intramuscular ou parenteral. A formulação vai minimizar qualquer irritação local devido à natureza lipopeptídica da daptomicina.

#### Exemplo 18

Micelas de daptomicina foram produzidas usando-se daptomicina a uma concentração de 1,0 mg/ml em água a um pH 4,0 a 25°C. O tamanho de uma micela de daptomicina foi medido usando-se um Zetasizer® (Malvern Instruments, modelo 3000 HS). A taxa de contagem foi de 36,3, o tipo de célula foi uma célula capilar, o ângulo de detecção (graus) foi de 90°, e o comprimento de onda (nm) foi de 633. Os resultados indicaram que o diâmetro da micela era de 54 Å, o que é cerca de duas vezes maior que o diâmetro de uma molécula de daptomicina monomérica simples. Veja figura 18.

Todas as publicações e pedidos de patente citados neste relatório descritivo estão aqui incorporados a título de referência como se cada publicação ou pedido de pedido individual estivesse específica e individualmente indicado como incorporado a título de referência. Embora a invenção precedente tenha sido descrita com alguns detalhes a título ilustrativo e exemplificativo para fins de clareza, ficará facilmente evidente para os versados na técnica que à luz dos ensinamentos desta invenção certas mudanças e modificações podem ser feitas sem que se saia do espírito ou escopo das reivindicações anexas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

### Código de Controle

#### Campo 1



8ADE55E23EB85A30

#### Campo 2



0693B941B6D68384

#### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: p116955 21339046\_1.txt
- Data de Geração do Código: 27-05-2014
- Hora de Geração do Código: 08:42:01
- Código de Controle:
  - Campo 1: 8ADE55E23EB85A30
  - Campo 2: 0693B941B6D68384

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para purificar daptomicina, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 a) fermentar *Streptomyces roseosporus* com uma alimentação de ácido n-decanóico para produzir daptomicina em um caldo de fermentação;

b) clarificar o caldo de fermentação para obter uma solução clarificada;

10 c) submeter a solução clarificada à cromatografia por troca aniônica para obter uma preparação de daptomicina;

d) ajustar a preparação de daptomicina a um pH de 2,5 a 5,0 usando um ácido para formar micelas;

15 e) contatar a preparação de daptomicina com uma resina HP-20ss para obter uma preparação de daptomicina semipurificada, em que, durante a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa e), as micelas de daptomicina dissociam-se a um pH de 6,0-7,5 em monômeros de daptomicina, pela eluição com álcool isopropílico 30-40%, a um pH de 3,5-6,5; e

f) submeter a preparação de daptomicina semipurificada à cromatografia por troca aniônica para obter daptomicina purificada.

20 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a alimentação de ácido n-decanóico na etapa a) é regulada para obter uma concentração residual de ácido n-decanóico não superior a 50 partes por milhão (ppm) durante a fermentação.

25 3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida clarificação na etapa b) compreende filtração ou centrifugação e filtração de profundidade.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cromatografia por troca aniônica na etapa c) é realizada sobre a resina FP-DA 13.

30 5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cromatografia por troca aniônica na etapa f) é realizada sobre a resina FP-DA 13.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cromatografia por troca aniônica na etapa f) é usada para reduzir o nível de solvente da etapa b).

5 7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o método é realizado por cromatografia de fluxo contínuo.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de filtração ou concentração da daptomicina.

10 9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de despirogenação da daptomicina usando ultrafiltração.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a despirogenação compreende as etapas de:

15 i) fornecer uma solução de daptomicina em condições nas quais a daptomicina está em um estado monomérico e não-micelar;

ii) filtrar a solução de daptomicina em condições nas quais a daptomicina vai passar pelo filtro mas os pirogênios não vão passar pelo filtro;

20 iii) colocar a solução de daptomicina em condições que formem um agregado de daptomicina;

iv) filtrar o agregado de daptomicina em condições nas quais o agregado de daptomicina vai ficar retido no filtro; e

v) recolher o agregado de daptomicina.

25 11. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de liofilização da daptomicina.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida etapa b) de clarificação compreende microfiltração ou centrifugação.

30 13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de filtração e concentração da daptomicina.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que compreende ainda a etapa de separação da daptomicina obtida na etapa d) do material de baixo peso molecular, por meio de ultrafiltração.

15. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de despirogenação da daptomici-

5 na.



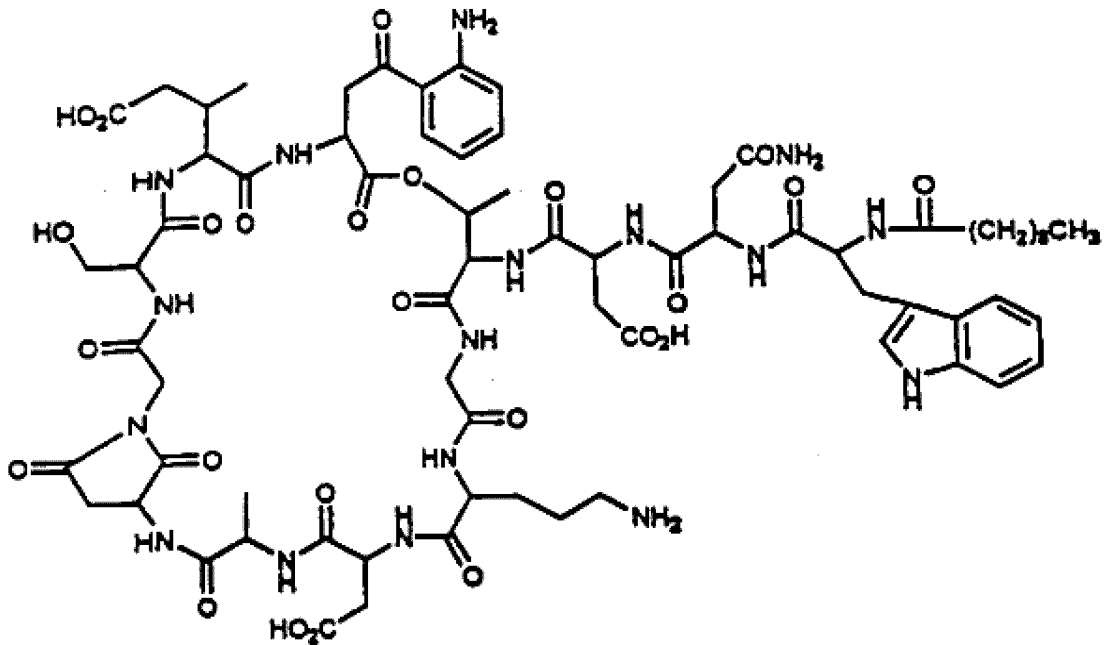


FIG. 3

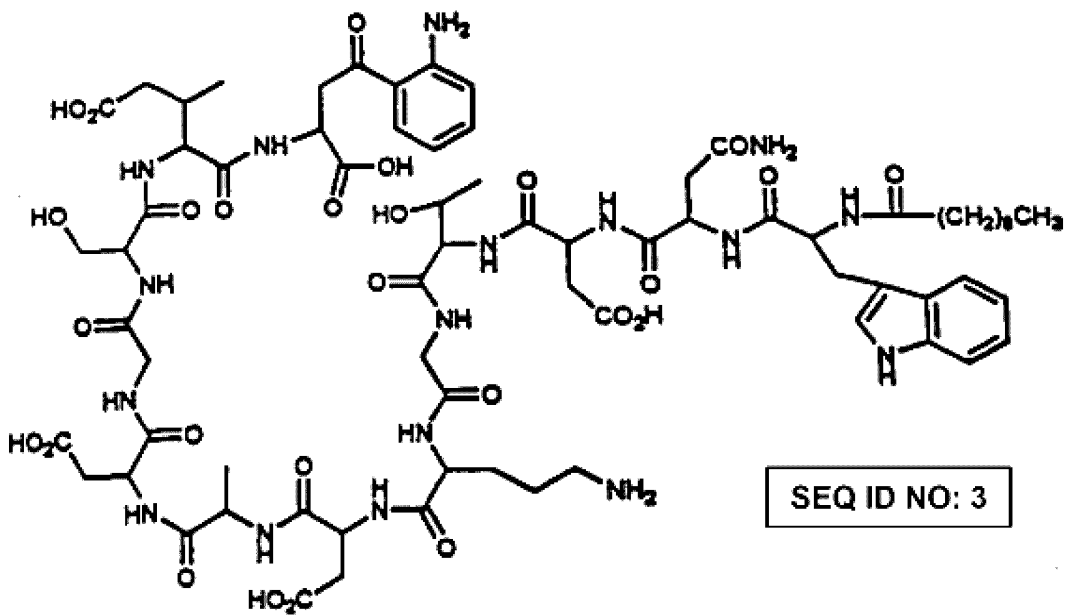


FIG. 4

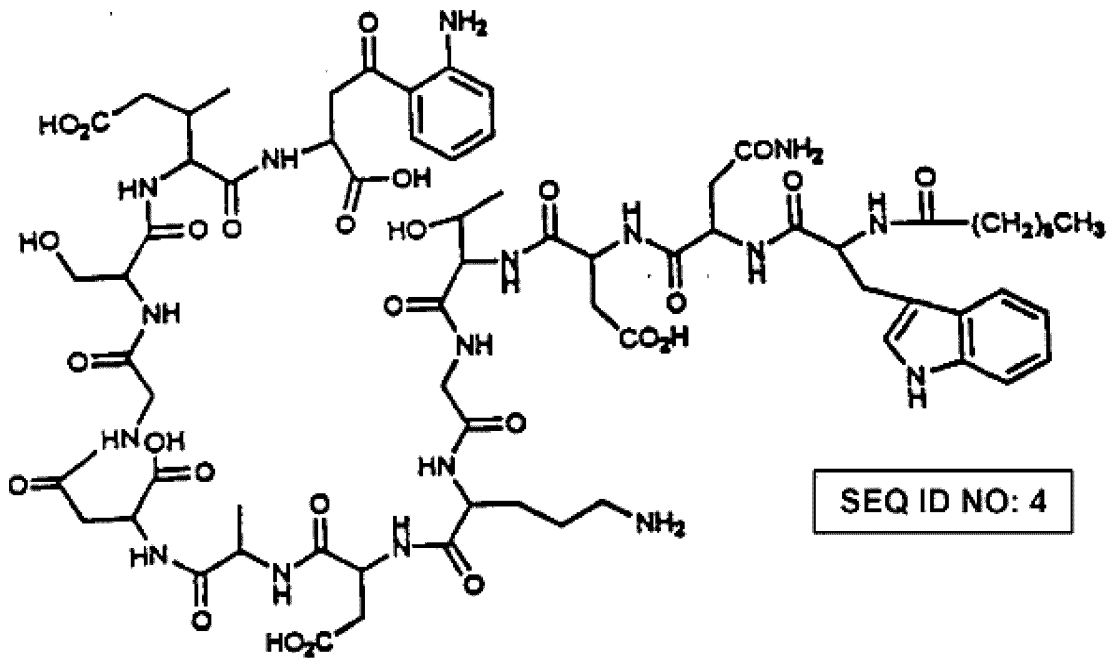


FIG. 5

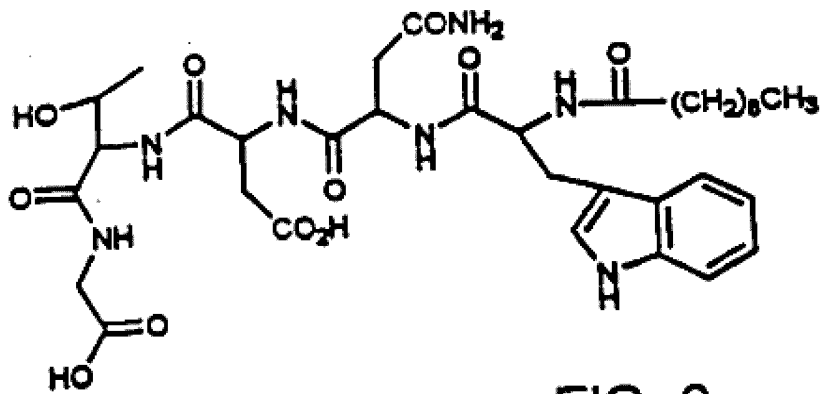


FIG. 6





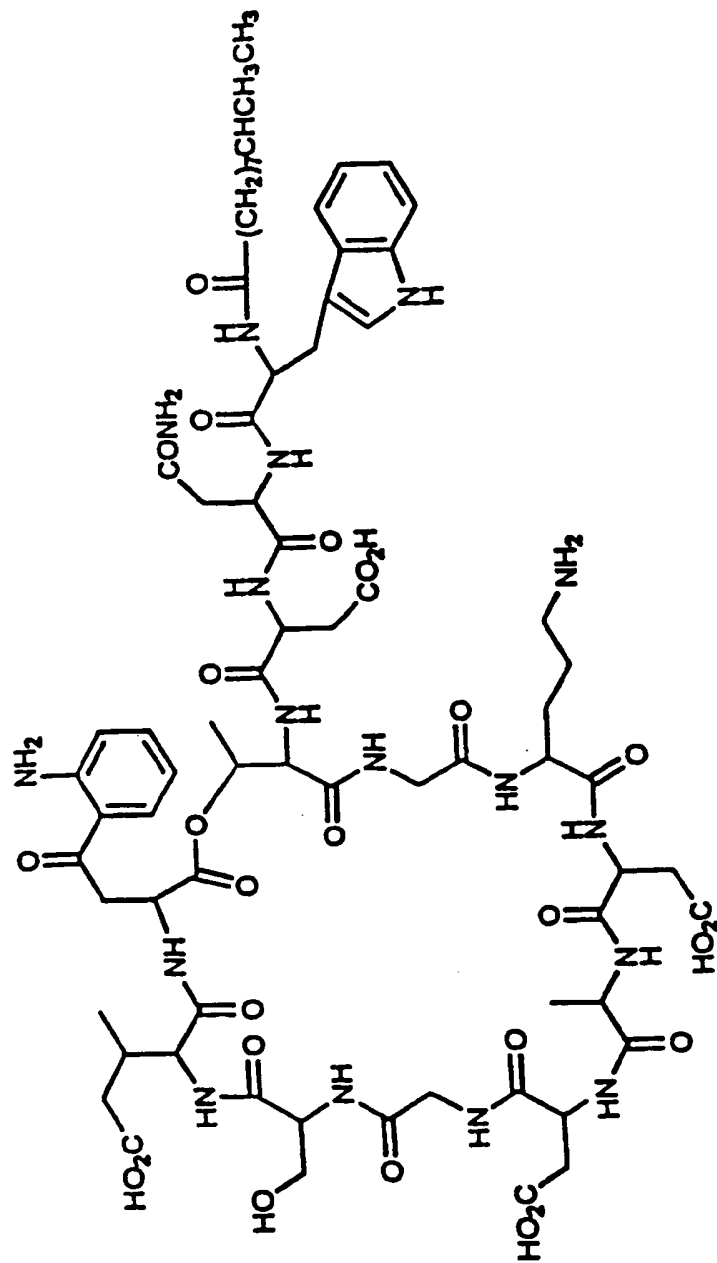


FIG. 11

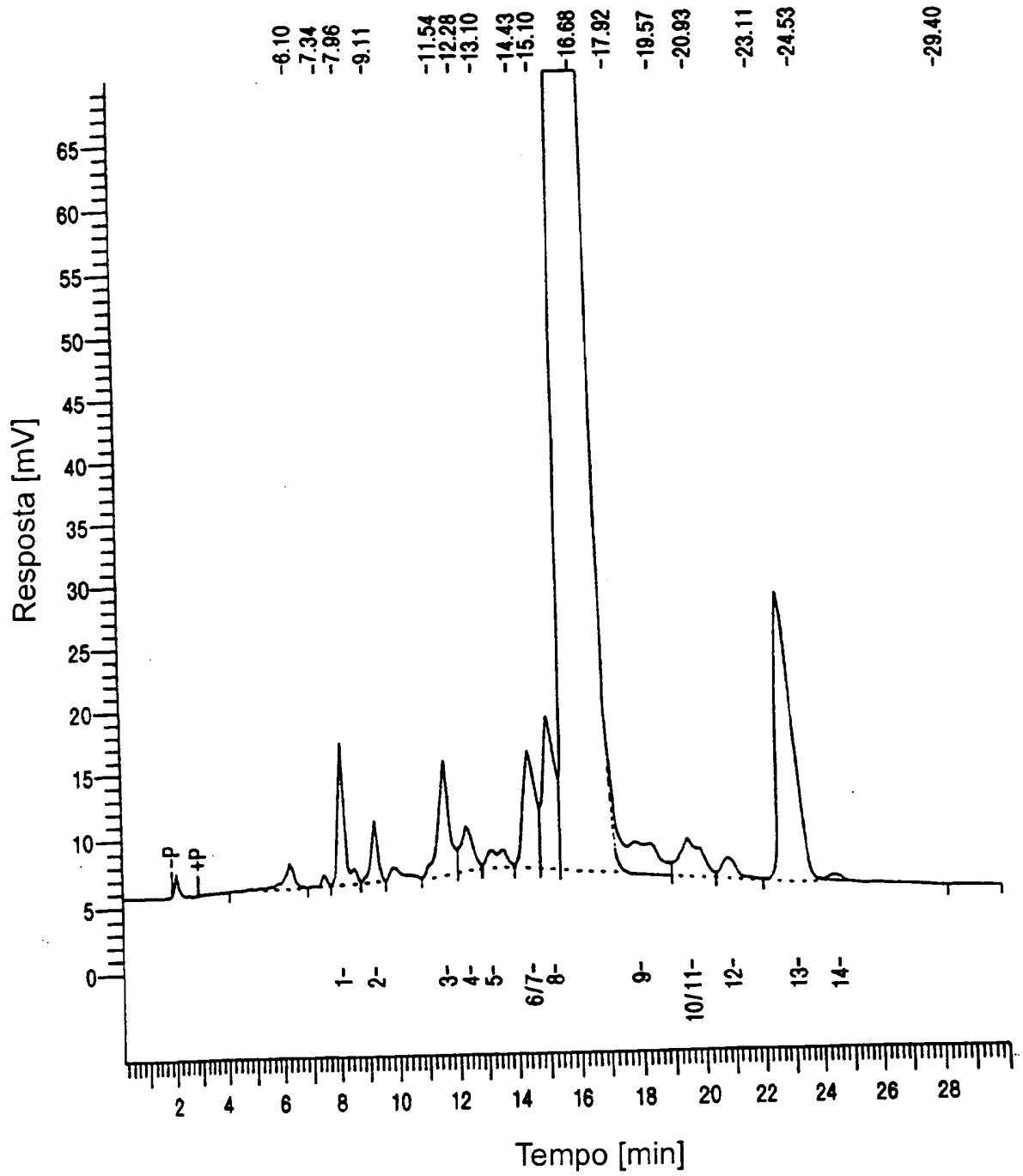


FIG. 12

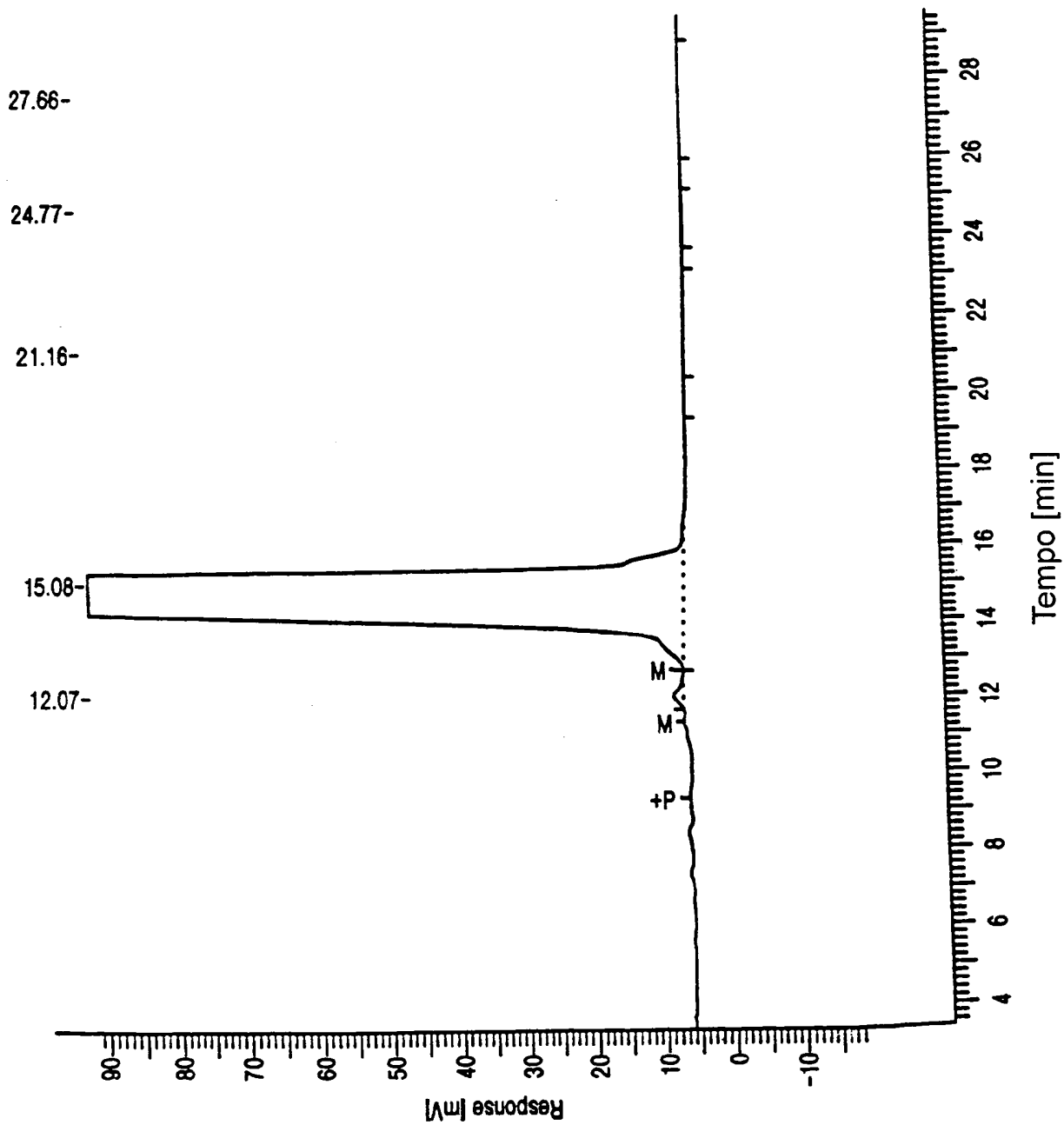


FIG. 13

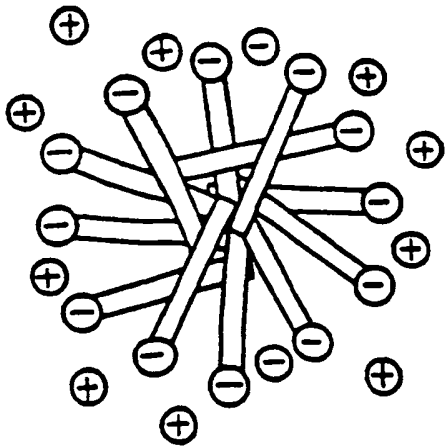


FIG. 14(a)

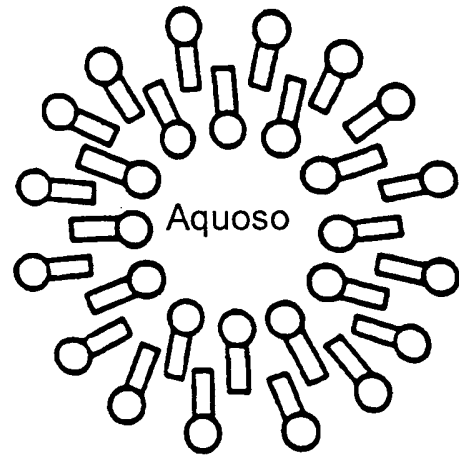


FIG. 14(c)

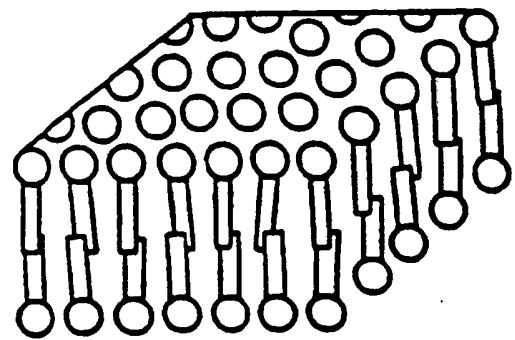


FIG. 14(b)

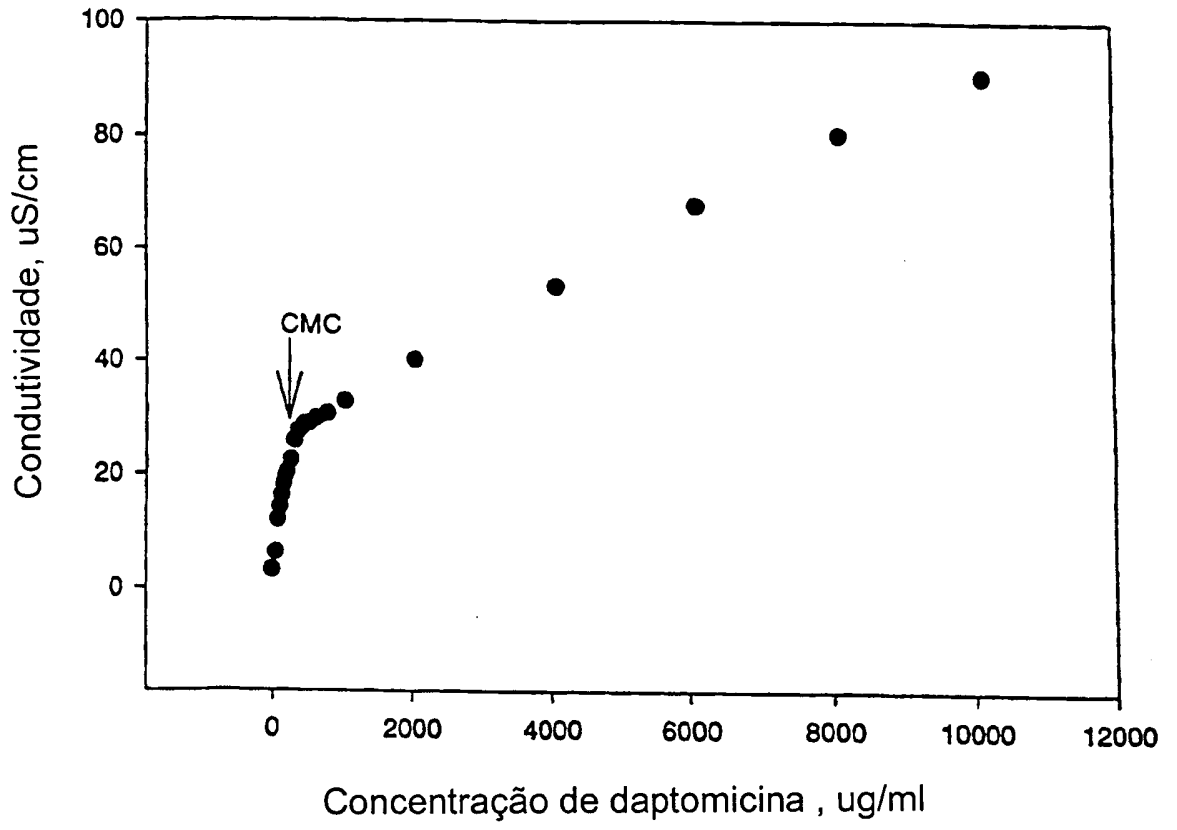


FIG. 15

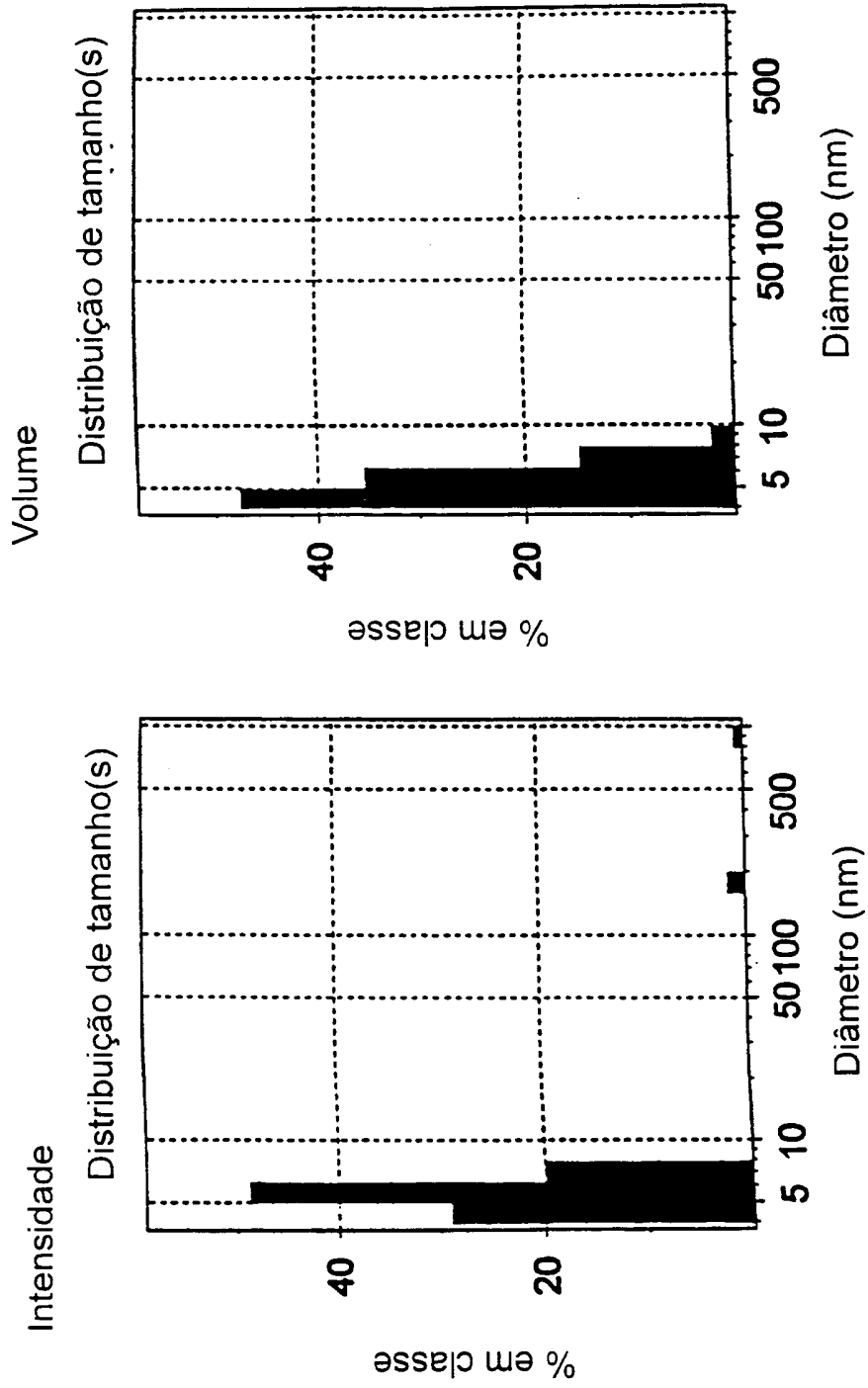


FIG. 16

## RESUMO

Patente de Invenção: "**MÉTODO PARA PURIFICAR DAPTOMICINA**".

A presente invenção refere-se a daptomicina altamente purificada e composições farmacêuticas compreendendo este composto. A invenção descreve um método para purificar daptomicina que compreende as etapas seqüenciais de cromatografia por troca aniônica, cromatografia por interação hidrofóbica e cromatografia por troca aniônica. A invenção também descreve um método para purificar daptomicina por cromatografia por troca aniônica melhorada com tampão modificado. A invenção também descreve um método aperfeiçoado para produzir daptomicina por fermentação de *Streptomyces roseosporus*. A invenção também descreve métodos de cromatografia líquida de alta pressão para análise da pureza de daptomicina. A invenção também descreve micelas de lipopeptídeo e métodos para fazer as micelas. A invenção também descreve métodos de uso de micelas de lipopeptídeo para purificar antibióticos lipopeptídicos, tal como daptomicina. A invenção também descreve o uso terapêutico de micelas de lipopeptídeo.