

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 004

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2002-2830**
(22) Přihlášeno: **18.01.2001**
(30) Právo přednosti:
20.01.2000 US 2000 177170
28.11.2000 US 2000 735191
(40) Zveřejněno: **13.11.2002**
(Věstník č. 11/2002)
(47) Uděleno: **11.02.2015**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku:
25.03.2015
(Věstník č. 12/2015)
(86) PCT číslo: **PCT/US2001/001748**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2001/053330**

(56) Relevantní dokumenty:
Debono a kol. (1988) J. Antibiot. 41, 1093-1105; Tally a kol. (1999) Exp. Opin. Invest. Drugs 8, 1223-1238; Lin a kol. (1998) J. Chromatogr. A 825, 149-159; Lin a Jiang (1997) Biotechnol. Tech. 11, 413-416.
US 5912226; US 4874843; EP 0294990; EP 1252179.

(73) Majitel patentu:
CUBIST PHARMACEUTICALS, INC.,
Lexington, MA, US

(72) Původce:
Thomas J. Kelleher, Weston, MA, US
Jan-Ji Lai, Westborough, MA, US
Joseph P. Decourcey, Charlestown, MA, US
Paul D. Lynch, Arlington, MA, US
Maurizio Zenoni, Paullo, IT
Auro R. Tagliani, Pavia, IT

(74) Zástupce:
Ing. Eduard Hakr, patentový zástupce, Přístavní 24,
170 00 Praha 7

(54) Název vynálezu:
Způsob čištění daptomycinu

(57) Anotace:
Způsob čištění daptomycinu zahrnující postupné kroky fermentace *Streptomyces roseosporus* s živnou kyselinou n-dekanovou za vzniku daptomycinu ve fermentační kapalině, vyčerení fermentační kapaliny a její podrobení anion-výměnné chromatografii za vzniku obohaceného daptomycinového preparátu, upravení jeho pH na hodnotu 2,5 až 5,0 použitím kyseliny za vzniku micel, separace obohaceného daptomycinového preparátu takto získaného od nízkomolekulárních kontaminantů ultrafiltrací a podrobení obohaceného daptomycinového preparátu chromatografii s hydrofobními interakcemi na pryskyřici HP-20ss za účelem získání částečně vyčištěného daptomycinového preparátu, přičemž během chromatografie s hydrofobními interakcemi daptomycinové micely disociují při pH 6,0 až 7,5 na nemichelární monomery daptomycinu elucí 30 až 40% izopropylalkoholem při pH 3,5 až 6,5, a podrobení částečně vyčištěného daptomycinového preparátu anion-výměnné chromatografii za získání vyčištěného daptomycinu.

CZ 305004 B6

Způsob čištění daptomycinu

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobů přípravy vysoce čistých forem lipopeptidu daptomycinu, antibiotika se silnou baktericidní aktivitou proti gram–pozitivním baktériím, zahrnujících kmeny, které jsou rezistentní vůči konvenčním antibiotikům. Vynález dále popisuje přípravu micel tohoto lipopeptidu. Předložený vynález se dále zabývá způsoby výroby lipopeptidových micel z neasociovaného monomeru lipopeptidů a přeměnou lipopeptidových micel na neasociované monomery. Tento vynález se také zabývá způsobem přípravy lipopeptidu daptomycinu s využitím micel, který je snadno rozšiřitelný do průmyslového měřítka.

15

Dosavadní stav techniky

Rychlý nárůst výskytu gram–pozitivních infekcí, včetně těch, které jsou způsobeny baktériemi rezistentními vůči antibiotikům, vyvolal obnovený zájem o vývoj nových typů antibiotik. Jedním z těchto typů jsou lipopeptidová antibiotika, zahrnující daptomycin. Daptomycin má silnou baktericidní aktivitu *in vitro* proti klinicky důležitým gram–pozitivním baktériím, způsobujícím vážné, život ohrožující onemocnění. Tyto bakterie zahrnují rezistentní patogeny, jako jsou enterokoky rezistentní vůči vankomycinu (VRE), *Staphylococcus aureus* rezistentní vůči methicilinu (MRSA), *Staphylococcus aureus* s glykopeptidem zprostředkovanou vnímavostí (GISA), stafylokoky negativní vůči koaguláze (CNS) a *Streptococcus pneumoniae* rezistentní vůči penicilinu (PRSP), pro které je jen velmi málo terapeutických alternativ. Viz např. Tally et al., 1999, Exp. Opin. Invest. Drugs 8: 1223–1238, dále zmiňovaný jako „Tally“. Inhibiční efekt daptomycinu je rychlý, vykazující koncentračně závislé působení *in vitro* i *in vivo* a dále relativně dlouhodobý koncentračně závislý post–antibiotický efekt *in vivo*.

30

Daptomycin je popsán v Baltz, Biotechnology of Antibiotics, 2. vydání, ed. W. R. Strohl (New York, Marcel Dekker, Inc.), 1997, str. 415–435, dále označovaný jako „Baltz“. Daptomycin, také známý jako LY 146032, je cyklické lipopeptidové antibiotikum, které může být získáno fermentací *Streptomyces roseosporus*. Daptomycin je členem typu antibiotik *Streptomyces roseosporus*, majících faktor A–21978C₀ a skládá se z dekanoylového postranního řetězce připojenému k N–terminálnímu tryptofanu cyklického peptidu obsahujícího 13 aminokyselin (Obr. 1). Daptomycin má vynikající aktivní profil, protože je vysoce efektivní vůči většině gram–pozitivních baktérií, je vysoce baktericidní a rychle působící, má nízký podíl rezistence a je účinný vůči organismům rezistentním proti antibiotikům. Sloučenina byla v současnosti rozvinuta do celé řady přípravků pro léčení vážných infekcí způsobených baktériemi, zahrnujících (výčet není vyčerpávající) *Staphylococcus aureus* rezistentní vůči methicilinu (MRSA) a enterokoky rezistentní vůči vancomycinu (VRE).

45

Mnoho amerických patentů popisuje A–21978C antibiotika a jejich deriváty včetně daptomycinu (LY 146032), stejně jako způsoby výroby a izolace A–21978C antibiotik a jejich derivátů.

50

United States patenty Re. 32 333, Re. 32 455 a 4 800 157 popisují způsob syntézy daptomycinu kultivací *Streptomyces roseosporus* NRL 15998 za podmínek aerobní fermentace. United State patent 4 885 243 popisuje upravenou metodu přípravy daptomycinu, při které se fermentační kultura živí dekanovou mastnou kyselinou, jejím esterem nebo solí.

55

United States patenty Re. 32 310, Re. 32 311, 4 537 717, 4 482 487 a 4 524 135 popisují způsoby deacylace antibiotika A–21978C a reacylace peptidového jádra a antibiotických derivátů připravených tímto způsobem. Všechny tyto patenty popisují čištěné deacylované jádro antibiotika A–21978C nebo jeho deriváty, které se izolují z fermentační kapaliny filtrací a poté čištěním pomocí Diaion HP–20 chromatografie a chromatografie na silikagel/C18.

United States patenty Re. 32 333 a Re. 32 455 popisují způsoby deacylace antibiotika A-21978C a reacylace peptidového jádra a antibiotických derivátů připravených tímto způsobem. Všechny tyto patenty popisují čištěné deacylované jádro antibiotika A-21978C nebo jeho deriváty, které se izolují z fermentační kapaliny filtrací a poté čištěním pomocí Diaion HP-20 chromatografie a chromatografie na silikagel/C18.

United States patenty Re. 32 333 a Re. 32 455 popisují způsob čištění, při kterém se filtrát celé fermentační kapaliny čistí mnoha srážecími a extrakčními kroky za vzniku surového komplexu A-21978C. Surový komplex se dále čistí pomocí iontově výměnné chromatografie na IRA-68 a pomocí dvoukolové chromatografie na silikagelu. Individuální A-21978C faktory byly separovány pomocí chromatografie na reverzní fázi s využitím silikagelu nebo silikagel/C18. United States patenty Re. 32 333 a Re. 32 455 také popisují, že A-21978C může být čištěn dávkovou chromatografií s využitím Diaion HP-20 pryskyřice, následované chromatografií na silikagelové koloně.

United States patent 4 874 843 popisuje způsob čištění daptomycinu, při kterém se fermentační kapalina zfiltruje a protlačí přes kolonu obsahující pryskyřici HP-20. Po eluování se částečně vyčištěný daptomycin protlačí přes kolonu obsahující HP-20ss a poté se opět separuje na HP-20 pryskyřici. Patent 4 874 843 říká, že finální resoluce a separace daptomycinu ze strukturně podobných sloučenin pomocí této metody je znesnadňována přítomností nečistot, které nejsou identifikovatelné pomocí ultrafialové analýzy fermentační kapaliny. Patent '843 dále říká, že pokusy o odstranění těchto nečistot pomocí silikagelové chromatografie na reverzní fázi, chromatografie na silikagelu s normální fází nebo pomocí iontově výměnné chromatografie nebyly úspěšné při zvyšování čistoty daptomycinu. Patent '843 dále popisuje „reverzní metodu“ čištění zahrnující kroky kontaktování vodného roztoku fermentačního produktu s nefunkční pryskyřicí ve vodné fázi, fyzikální odstranění vody z pryskyřice, opětovné zvlhčení pryskyřice s polárním organickým rozpouštědlem, promytí pryskyřice organickým rozpouštědlem, eluování fermentačního produktu z pryskyřice zvyšováním polarity rozpouštědla a získání fermentačního produktu. Patent '843 popisuje, že tato metoda upravuje finální čistotu z asi 80 % na asi 93 % a zvyšuje výtěžek z asi 5 % na 35 %, ovšem patent '843 nepopisuje typ nečistot přítomných v daptomycinovém preparátu.

United States patent 5 912 226 popisuje identifikaci a izolaci dvou nečistot během přípravy daptomycinu. Daptomycin, α -aspartylpeptid, se transpeptiduje za vzniku stabilního intermediátu, ve kterém se aspartyllová skupina stává anhydrosukcinimidoskupinou (Obr. 3). Patent '226 říká, že přítomnost tohoto intermediátu, označovaného jako anhydro-daptomycin, je zvýšený při pH 4 až 6. Rehydrace anhydro-sukcinimidové formy poskytuje druhý degradační produkt, obsahující β -aspartyllovou skupinu a je označován jako β -izomerní forma daptomycinu (Obr. 3).

Patent 5 912 226 popisuje, že t-BOC derivát anhydrodaptomycinu může být izolován pomocí chromatografie s reverzní fází na koloně obsahující silikagel/C-18, srážením a dalším čištěním pomocí silikagel/C-18 chromatografie s reverzní fází. Patent 5 912 226 také popisuje, že β -izomerní forma daptomycinu může být chromatografována na pryskyřici Diaion HP-20ss, odsolena chromatografií na Diaion HP-20 a dále čištěním pomocí chromatografie s reverzní fází na C-18 koloně následované kolonou s HP-20 pryskyřicí v reverzním módu.

Kirsch et al. (Pharmaceutical Research. 6:387-393, 1989, dále označovaný jako „Kirsch“) uvedl, že anhydro-daptomycin a β -izomer byly získány při čištění daptomycinu. Kirsch popsal metody minimalizace koncentrace anhydro-daptomycinu a β -izomeru prostřednictvím manipulace s hodnotami pH a teplotou. Ovšem Kirsch nebyl schopen stabilizovat daptomycin a zabránit jeho konverzi na anhydro-daptomycin a jeho následné izomerizaci na β -izomer. Kirsch také nebyl schopen zabránit degradaci daptomycinu na další degradační produkty, které nejsou příbuzné s anhydro-daptomycinem a β -izomerem.

Patent '226 říká, že daptomycin může být připraven s využitím popsaných procedur tak, že neobsahuje výše než celkem 2,5 % hmotnosti anhydro-daptomycinu a β -izomeru, ovšem neuvádí žádné konkrétní koncentrace dalších nečistot. Ve způsobu popsaném v United States patent 4 874 843 a u přípravy daptomycinu pro klinické testování ve velkém měřítku, byla nejvyšší pozorovaná koncentrace kolem 90 až 93 %. Je tedy potřeba komerčně vhodné metody přípravy mnohem čistšího daptomycinu a pokud je to možné, i zvýšení jeho výtěžku po čištění. Dále by bylo vhodné získávat daptomycin, který by obsahoval méně nebo vůbec žádný anhydro-daptomycin a β -izomerní formu daptomycinu. Bylo by také žádoucí snížit koncentrace dalších nečistot v daptomycinu. Ovšem v současném stavu techniky není dostupná žádná metoda, která by byla schopna dále snížit koncentrace anhydro-daptomycinu, β -izomerní formy a dalších nečistot v daptomycinovém produktu.

Podstata vynálezu

Předložený vynález řeší zmíněné problémy tím, že poskytuje komerčně zajímavé způsoby přípravy vedoucí k vysokým stupňům čistoty lipopeptidu daptomycinu. V jednom provedení tohoto vynálezu je popsána komerčně vhodná metoda, vedoucí k daptomycinu o stupni čistoty 95 až 97 %, která téměř zcela eliminuje hlavní nečistoty anhydro-daptomycin a β -izomer, stejně jako další nečistoty při přípravě daptomycinu. Dále jsou popsány komerčně přijatelné metody čištění lipopeptidu daptomycinu zahrnující oddělení lipopeptidových micel od nízko molekulárních kontaminantů a separaci lipopeptidových micel od vysokomolekulárních nečistot. Popisuje se rovněž způsob analýzy čistoty daptomycinu pomocí vysokorozlišovací kapalinové chromatografie a dále detekci a charakterizaci dalších nečistot v daptomycinu, z nichž některé byly dosud neznámé.

Vynález tak zajišťuje čištěný daptomycin, který vykazuje čistotu alespoň 98 % nebo který je v podstatě zbaven anhydro-daptomycinu a β -izomeru. Vynález zajišťuje čištěný daptomycin, který je prakticky zbaven anhydro-daptomycinu a který obsahuje mnohem nižší koncentrace β -izomeru a dalších kontaminantů, než bylo možné dosáhnout v současném stavu techniky.

Objasnění obrázků

- Obrázek 1 ukazuje strukturu daptomycinu.
- Obrázek 2 zachycuje strukturu nečistoty 8, CB-131010 (dříve identifikovaný jako β -izomer, LY 213846).
- Obrázek 3 ukazuje strukturu nečistoty 13, CB-130952 (dříve identifikovaný jako anhydro-daptomycin, LY178480).
- Obrázek 4 ukazuje předpokládanou strukturu nečistoty 1, CB-131012 (dříve identifikovanou jako LY212218).
- Obrázek 5 ukazuje předpokládanou strukturu nečistoty 2, CB-131011.
- Obrázek 6 ukazuje předpokládanou strukturu nečistoty 3, CB-131008 (dříve identifikovanou jako LY213928).
- Obrázek 7 ukazuje předpokládanou strukturu nečistoty 4, CB-131006.
- Obrázek 8 ukazuje předpokládanou strukturu nečistoty 6, CB-130989 (dříve identifikované jako LY213827).
- Obrázek 9 ukazuje předpokládanou strukturu nečistoty 7, CB-131005.
- Obrázek 10 ukazuje předpokládanou strukturu nečistoty 12, CB-131009.
- Obrázek 11 ukazuje předpokládanou strukturu nečistoty 14, CB-131078 (dříve identifikovanou jako LY109208).

Obrázek 12 ukazuje HPLC chromatogram přípravy daptomycinu (velké měřítko), včetně nečistot 1 až 14.

Obrázek 13 ukazuje HPLC chromatogram přípravy daptomycinu po čištění na pryskyřici Poros P150.

5 Obrázky 14A až 14C ukazují micelární struktury. Obrázek 14A ukazuje sférickou micelu, ve které jsou hydrofobní konce amfifilních molekul orientovány dovnitř směrem ke středu, zatímco hydrofilní hlavy amfifilních molekul jsou směřovány ven z micely a jsou v kontaktu s vodným prostředím. Obrázek 14A ukazuje příklad, ve kterém jsou hydrofilní hlavy s negativním nábojem. Obrázek 14B ukazuje lipidickou dvojvrstvou strukturu, ve které jsou dvě vrstvy amfifilních molekul orientovány tak, že hydrofobní konce každé vrstvy jsou orientovány vůči sobě navzájem, zatímco hydrofilní hlavy jsou na obou stranách dvojvrstvy a jsou v kontaktu s vodným prostředím. Lipidické dvojvrstvy mohou být buď kulovité, nebo rovinné. Obrázek 14C ukazuje liposom, ve kterém je lipidická dvojvrstva, jako třeba ta na Obrázku 14B, ve formě kulovité struktury uzavírající uvnitř vodné prostředí. Hydrofilní hlavy liposomu jsou na vnitřní straně (interiér) a na vnější straně v kontaktu s vodným prostředím (exteriér).

15 Obrázek 15 ukazuje výsledky pokusu o určení kritické micelární koncentrace (cmc) daptomycinu při pH 4,0.

Obrázek 16 ukazuje distribuci velikosti částic daptomycinových micel pomocí rozptylu světla. Daptomycinové micely mají průměrnou velikost částic 5,4 nm (54 Å).

20

Detailní popis vynálezu

Předmět vynálezu

25 Předmětem tohoto vynálezu je způsob čištění lipopeptidu daptomycinu, který je snadno rozšiřitelný na měřítko komerční výroby zahrnující unikátní kombinaci anion-výměnné chromatografie a chromatografie využívající hydrofobní interakce. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je popsán způsob výroby čištěného daptomycinu, jehož čistota je vyšší než 95 % a který vykazuje snížené koncentrace nečistot ve srovnání s daptomycinem připraveným postupy známými v současném stavu techniky. V dalším preferovaném provedení se popisuje způsob čištění daptomycinu, využívající snížené hodnoty rozpouštědel ve srovnání se současným stavem techniky. V dalším provedení vynálezu je popsán způsob čištění lipopeptidu daptomycinu mající vyšší než 95% čistotu.

35 Konkrétně způsob čištění daptomycinu podle vynálezu zahrnuje kroky:

- a) fermentace *Streptomyces roseosporus* s živnou kyselinou n-dekanovou za vzniku daptomycinu ve fermentační kapalině;
- b) vyčištění fermentační kapaliny;
- c) podrobení fermentační kapaliny anion-výměnné chromatografii za vzniku obohaceného daptomycinového preparátu;
- 40 d) upravení pH obohaceného daptomycinového preparátu na hodnotu 2,5 až 5,0 použitím kyseliny za vzniku micel;
- e) separace obohaceného daptomycinového preparátu získaného v kroku d) od nízkomolekulárních kontaminantů ultrafiltrací
- 45 f) podrobení obohaceného daptomycinového preparátu chromatografií s hydrofobními interakcemi na pryskyřici HP-20ss za účelem získání částečně vyčištěného daptomycinového preparátu, přičemž během chromatografie s hydrofobními interakcemi v kroku f) daptomycinové micely disociují při pH 6,0–7,5 na nemicelární monomery daptomycinu elucí 30 až 40 % isopropylalkoholem při pH 3,5 až 6,5; a
- 50 g) podrobení částečně vyčištěného daptomycinového preparátu anion-výměnné chromatografii za získání vyčištěného daptomycinu.

- Dále se popisuje způsob zvyšování koncentrace lipopeptidů, vzniklých vyživováním mikroorganismů fermentační kultury sníženými koncentracemi mastné kyseliny. Použití nižších koncentrací dekanové kyseliny než bylo popsáno v United States patent 4 885 243, vede ke zlepšení ekonomiky, kromě toho, že se vyrobí vysoce čistá forma daptomycinu nebo daptomycinu příbuzného lipopeptidu. V preferovaném provedení se popisuje způsob zvýšení koncentrace a množství daptomycinu vyrobeného *Streptomyces roseoporus*, přičemž je minimalizována produkce odpovídajících nečistot. Nižší úroveň kontaminantů ve fermentační kapalině vede k efektivnějšímu získávání a čištění daptomycinu, čímž je zajištěn způsob výroby s vyšším výtěžkem.
- Dalším aspektem tohoto vynálezu je zajištění způsobu čištění daptomycinu zahrnující použití modifikované pufrův zvýšené anion-výměnné chromatografie. V preferovaném provedení je popsán způsob výroby daptomycinu s čistotou alespoň 98 % nebo takového, který je v podstatě zbaven anhydro-daptomycinu nebo β -izomeru. V dalším preferovaném provedení vynálezu je popsán způsob čištění daptomycinu o čistotě alespoň 98 %.
- Dalším aspektem vynálezu je zajištění chromatografické metody čištění lipopeptidů, zahrnující novou kombinaci anion-výměnné chromatografie, chromatografie využívající hydrofobní interakce a anion-výměnnou chromatografií zesílenou pufrův. V preferovaném provedení je popsán způsob chromatografického čištění daptomycinu nebo daptomycinu příbuzných lipopeptidů. Modifikovaný pufr nečekaně dovoluje separaci anhydro-daptomycinu od daptomycinu, která nebyla možná s využitím dosud známých chromatografických metod.
- Dále se popisuje způsob čištění lipopeptidů, který je snadno rozšiřitelný pro výrobu lipopeptidových micel v komerčním měřítku. V jednom provedení je popsán způsob výroby zahrnující převedení lipopeptidového roztoku z monomerního nemicelárního stavu do micelárního stavu a poté zpátky během čistícího procesu. V preferovaném provedení způsob výroby zahrnuje vystavení lipopeptidů takovým podmínkám, při kterých se tvoří micely, separaci lipopeptidových micel od nízkomolekulárních kontaminantů, např. pomocí technik separujících na základě velikosti. V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu způsob zahrnuje podrobení lipopeptidu takovým podmínkám, při kterých jsou lipopeptidy v monomerní formě a separaci monomerního lipopeptidu od molekul s vyšší molekulovou hmotností nebo od agregátů, např. pomocí separačních technik dělících na základě různé velikosti. V preferovanějším provedení vynálezu zahrnuje způsob oba kroky: podrobení lipopeptidu podmínkám, při kterých vznikají micely a separace lipopeptidových micel z nízkomolekulárních kontaminantů a poté podrobení lipopeptidových micel podmínkám, při nichž jsou lipopeptidy ve formě monomerů a separace lipopeptidových monomerů od vysokomolekulárních molekul a agregátů. Tyto dva kroky mohou být provedeny v libovolném pořadí. V ještě preferovanějším provedení je separační metodou ultrafiltrace nebo size-exclusion chromatografie.
- Dalším objektem popisu je zajištění vylepšené metody měření čistoty lipopeptidů, včetně daptomycinu, pomocí vysokorozlišovací kapalinové chromatografie (HPLC).
- Dalším předmětem popisu je zajištění čištěných lipopeptidů, jako je daptomycin nebo daptomycinu příbuzné lipopeptidy a jejich farmaceuticky přijatelné soli nebo přípravky je obsahující. V preferovaném provedení se popisuje daptomycin čištěný jedním ze způsobů popsaných v tomto popisu. Popisují se také farmaceutické přípravky čištěného lipopeptidu nebo jeho soli a způsoby podávání těchto přípravků. V preferovaném provedení farmaceutický přípravek zahrnuje čištěný daptomycin.
- Dalším předmětem tohoto popisu je zajištění lipopeptidových micel a jejich farmaceuticky přijatelných přípravků. V preferovaném provedení se tento popis týká daptomycinových micel nebo micel z daptomycinu příbuzných lipopeptidů a jejich farmaceuticky přijatelných přípravků. V dalším provedení se popis také týká způsobu podávání lipopeptidových micel nebo jejich přípravků potřebným pacientům. V preferovaném provedení se lipopeptidové micely podávají intravenózně, parenterálně, intramuskulárně nebo místně.

Definice

Pokud není definováno jinak, všechny technické a vědecké termíny použité v tomto vynálezu mají význam, který je obvyklý pro odborníky v oboru, jimž je tento vynález určen. Provedení tohoto vynálezu používá, pokud není uvedeno jinak, konvenční techniky chemie, biochemie a mikrobiologie a základní terminologii zde použitou.

Termín „izolovaný“ označuje sloučeninu nebo produkt, který odpovídá sloučenině reprezentující nejméně 10 %, s výhodou alespoň 20 % nebo 30 %, výhodněji alespoň 50 %, 60 % nebo 70 % a nejméně 80 % nebo 90 % sloučeniny přítomné ve směsi.

Termín „lipopeptid“ označuje molekulu zahrnující lipidovou skupinu kovalentně vázanou na peptidovou skupinu, stejně jako její soli, estery, amidy a ethery. Termín „lipopeptid“ také zahrnuje chráněné formy lipopeptidů, kde je jedna nebo více aminoskupin, karboxylových skupin nebo hydroxylových skupin ochráněna. Příklady chráněných skupin viz např. „Protective Groups in Organic Synthesis“ (Theodora W. Greene), John Wiley and Sons, New York, 1981. V preferovaném provedení je lipopeptidem antibiotikum. V dalším preferovaném provedení je lipopeptidem LY 303366, echinocandiny, pneumocandiny, aculeaciny, surfactin, plipastatin B1, amphomycin nebo lipopeptidový derivát popsáný v United States patentu 5 629 288. tyto lipopeptidy jsou známé v současném stavu techniky. Viz např. United States patent 5 202 309 a mezinárodní patentová přihláška WO 00/08197. V dalším preferovaném provedení je lipopeptid daptomycinu příbuzná molekula, včetně (mimo jiné) daptomycinu, A54145, daptomycinu příbuzný lipopeptid popsáný v United States patentech 4 537 717, 4 482 487, Re. 32 311, Re. 32 310, 5 912 226, v současné době ve znovu podaném United States ser. 09/547 357, mezinárodní patentové přihlášce WO 01/44272, WO 01/44271, které jsou zde všechny zahrnuté jako reference, nebo antibiotikum A-21978, ve kterém je n-dekanoylový postranní řetězec daptomycinu nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem. Daptomycinu příbuzné lipopeptidy popsáné ve WO 01/44272, WO 01/44274 a WO 01/44271 se vztahují k syntetickým a semisyntetickým lipopeptidům, kde jsou modifikovány ornithinové nebo kynurinové zbytky nebo postranní řetězec mastné kyseliny. V ještě preferovanějším provedení je lipopeptidem daptomycin. Termín daptomycinu příbuzný lipopeptid označuje sloučeniny výše popsáné a jejich soli.

Termín „daptomycin“ označuje n-dekanoylový derivát antibiotického faktoru A-21978C₀ nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli. „Daptomycin“ je synonymum s LY146032. Viz Obrázek 1.

Termín „anhydro-daptomycin“ označuje daptomycinový derivát, kde je α -aspartylová skupina daptomycinu transpeptidována na anhydro-sukcinimidovou skupinu.

Termín „ β -izomer“ nebo „ β -izomer daptomycinu“ označuje daptomycinové deriváty, které obsahují β -aspartylovou skupinu namísto α -aspartylové skupiny. Viz Obrázek 2.

Daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid je „v podstatě čistý“, když alespoň 95 % vzorku je daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid. S výhodou, daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid je „prakticky čistý“, když alespoň 97 % vzorku je daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid.

Daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid je „prakticky čistý“, když alespoň 98 % vzorku je daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid, daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid je „prakticky čistý“, když alespoň 99 % vzorku je daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid.

Daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid je „prakticky zbaven“ další látky, když další sloučenina je přítomna v množství, které není vyšší než 1 % hmotnosti daptomycinu nebo daptomycinu příbuzného lipopeptidového přípravku.

Daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid je „v podstatě zbaven“ další sloučeniny, když další sloučenina je přítomna v množství, které není vyšší než 0,5 % hmotnosti daptomycinu nebo daptomycinu příbuzného lipopeptidového přípravku.

- 5 Daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid je „zbaven“ další látky, když další sloučenina je přítomna v množství, které není vyšší než 0,1 % hmotnosti daptomycinu příbuzného lipopeptidového přípravku. Alternativně, daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid je „zbaven“ další sloučeniny, když tato sloučenina nemůže být detekována pomocí HPLC za podmínek maximální citlivosti, při kterém je detekční limit přibližně 0,05 % nebo nižší množství daptomycinu nebo daptomycinu příbuzného lipopeptidového přípravku. Příklady HPLC metod jsou popsány dále (Tabulka 1 a 2).

- 15 „Čištěný“ daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid označuje prakticky čistý daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid, v podstatě čistý daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid nebo jejich soli nebo daptomycin, daptomycinu příbuzný lipopeptid nebo jejich soli, které jsou v podstatě čisté nebo zbavené další sloučeniny.

- 20 „Částečně čištěný“ daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid označuje daptomycin, daptomycinu příbuzný lipopeptid nebo jejich sůl, která má nižší než 90% čistotu.

- 25 Čistota daptomycinu, daptomycinu příbuzného lipopeptidu nebo jiného lipopeptidu označuje lipopeptid před jeho formulováním do farmaceutického přípravku. Čistota může být měřena libovolným prostředkem včetně nukleárně magnetické resonance (NMR), plynové chromatografie/hmotnostní spektroskopie (GC/MS), kapalně chromatografie/hmotnostní spektroskopie (LC/MS) nebo mikrobiologickým stanovením. Preferované prostředky pro měření čistoty daptomycinu je analytická vysokorozlišovací kapalinová chromatografie (HPLC).

- 30 Termín „micela“ označuje agregáty amfifilních molekul. Ve vodném prostředí je lipofilní doména molekul agregátů orientována proti interiéru micely a hydrofilní domény jsou v kontaktu s médiem. Struktury micel zahrnují (výčet není vyčerpávající) sférické, laminární, cylindrické, elipsovité, vesikulární (liposomální), lamerální a kapalně krystaly. Viz Obrázek 14.

- 35 Termín „smíšené micely“ označuje konkrétní typ micely, ve kterém micela obsahuje více než jeden typ amfifilní molekuly. V kontextu tohoto vynálezu smíšené micely obsahují lipopeptid a alespoň jednu další amfifilní molekulu, kterou může být další lipopeptid. Smíšené micely obsahují alespoň 10 % lipopeptidu (hmotnostní %). V dalších provedeních obsahují smíšené micely alespoň 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % nebo 90 % lipopeptidu.

- 40 Termín „micelární roztok“ označuje roztok, ve kterém více než 50 % molekul lipopeptidu v roztoku je přítomno v micelách (hmotnostní údaje). S výhodou, alespoň 60 %, 70 %, 80 %, 90 % nebo 95 % molekul je ve formě micel. Micelární roztok se zachycuje na ultrafiltrační membráně, pokud je vyrobena (cutoff) pro nominální molekulovou hmotnost 10 000 dalton.

- 45 Termín „kritická micelární koncentrace“ (cmc) označuje určitou koncentraci molekul, která závisí na teplotě, koncentraci soli a typu amfifilní molekuly. Nad cmc existují v rovnováze neasociované molekuly a micely.

- 50 Termín „monomer“ označuje amfifilní molekulu, která není částí agregátu, ovšem která existuje jako jediná molekula. V kontextu tohoto vynálezu označuje termín monomer neasociovaný lipopeptid.

Termín „monomerní roztok“ označuje roztok, ve kterém je více než 50 % lipopeptidových molekul přítomno ve formě monomeru (hmotnostní údaje). S výhodou, alespoň 60 %, 70 %, 80 %, 90 % nebo 95 % je přítomno ve formě monomeru. Monomerní roztok není zachycen na ultrafil-

trační membráně, pokud je vyrobena (cutoff) pro nominální molekulovou hmotnost 10 000 dalton, a spíše touto membránou prochází.

5 Termín „pufr s nízkou iontovou silou“ označuje roztok, který má koncentraci soli pod 50 nM, termín „pufr se střední iontovou silou“ označuje roztok mající koncentraci soli mezi 50 až 250 mM, termín „pufr s vysokou iontovou silou“ označuje roztok mající koncentraci soli vyšší než 250 mM.

Způsoby výroby čištěných lipopeptidů

10

Jedno provedení tohoto vynálezu popisuje chromatografickou metodu, která produkuje čištěný lipopeptid komerčně zajímavým způsobem. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid. Způsob chromatografické metody zahrnuje sekvenční použití anion-výměnné chromatografie, chromatografie s hydrofobními interakcemi (HIC) a anion-výměnné chromatografie k čištění přípravků obsahujících lipopeptid jako je daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid.

15

V preferovaném provedení způsob čištění dále zahrnuje změnu fermentačních podmínek, kdy vzniká A21978C obsahující surový produkt pomocí *Streptomyces roseosporus*, za účelem zvýšení produkce daptomycinu a snížení koncentrace nečistot a odpovídajících kontaminantů, vyráběných fermentační kulturou *S. roseosporus*.

20

Preferované provedení způsobu chromatografické metody je popsáno dále:

25

Streptomyces roseosporus je fermentován s živnou n-dekanovou kyselinou, podle popisu v United States patent 4 885 243, s modifikací kdy dekanová kyselina byla udržována na co nejnižších koncentracích bez toho, aby to ovlivnilo celkový výtěžek fermentace. V preferovaném provedení je udržována zbytková kyselina dekanová během aerobní fermentace na koncentraci nižší než 50 part per milion (ppm). V ještě preferovanějším provedení je udržována zbytková kyselina dekanová během aerobní fermentace na koncentraci nižší než 20 part per milion (ppm). V preferovaném provedení je udržována zbytková kyselina dekanová během aerobní fermentace na koncentraci přibližně 10 part per milion (ppm). V preferovaném provedení tohoto vynálezu se koncentrace zbytkové dekanové kyseliny měří během fermentace a koncentrace živného roztoku dekanové kyseliny se adjustuje tak, aby koncentrace zbytkové dekanové kyseliny byla udržována během aerobní fermentace v rámci preferovaných parametrů. Současný stav techniky nepopisuje *in situ* konkrétní a nízkou reziduální koncentraci dekanové kyseliny, požadovanou pro dosažení optimální exprese daptomycinu obsahujícího nízké koncentrace nečistot.

30

35

Po fermentaci se extracelulární roztok vyčeří odstraněním mycelia od fermentační kapaliny. Odstranění mycelia od fermentační kapaliny se provádí standardními separačními technikami jako je centrifugace nebo mikrofiltrace. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se fermentační kapalina čistí mikrofiltrací s využitím Pall Sep™ membránového systému. V preferovanějším provedení se fermentační kapalina čistí s využitím průmyslové centrifugy jako je Westfalia™, následované dokončením na hloubkovém filtru. K odstranění mycelia od fermentační kapaliny mohou být použity další přístroje, jako jsou filtrační lisy, rotační bubnové filtry nebo hloubkové filtry pro jedno použití za vzniku čiré kapaliny vhodné pro sloupcovou chromatografii ve velkém měřítku.

40

45

V dalším provedení může být daptomycin extrahován z fermentace mycelia přímo s využitím organického rozpouštědla, jako je butanol, předtím než je vyčeřeno separací na odstředivce nebo filtru. Podle tohoto provedení může být pro extrakci použit libovolný alkohol mající čtyři nebo více atomů. Preferovaným rozpouštědlem je n-butanol. Využití organického rozpouštědla vede k dodatečnému čištění daptomycinu ve srovnání s čistě vodnou separací daptomycinu. Například, daptomycin se rozděluje do n-butanolu, je-li butanol použit v koncentracích vyšších než 10 % a

50

když je proces prováděn za podmínek, při kterých *n*-butanol vytváří oddělenou fázi, např. při hodnotách pH 4 až 5, což je blízko isoelektrického bodu daptomycinu (viz Příklad 4).

5 V dalším provedení se daptomycin vyrábí v imobilizovaném reaktoru, který využívá předem aktivované mycelium pro nefermentační produkci daptomycinu s využitím zdroje energie, s výhodou cukru, základních složek jako jsou aminokyseliny a amoniak a dekanová kyselina. Produkce daptomycinu v reaktoru s imobilizovaným enzymem se poté provádí pomocí popsanych metod.

10 Po vyčerení fermentační kapaliny se koncentrace daptomycinu obohacuje (to jest zakoncentrovává se) pomocí anion-výměnné chromatografie. Vyčerený roztok se nechá nejdříve kontaktovat s anion-výměnnou pryskyřicí za podmínek, kdy se většina daptomycinu váže na anion-výměnnou pryskyřici. Po navázání se pryskyřice promyje vodným pufrem s vhodnou iontovou silou kvůli odstranění nevázaného materiálu a daptomycinových nečistot. Nakonec se čištěný daptomycin vázaný na pryskyřici eluuje za podmínek, při nichž daptomycin disociuje z pryskyřice.

15 Navázání, promytí a eluování může být provedeno podle tohoto vynálezu s využitím pufrů a metod známých v současném stavu techniky. Například, eluování může být provedeno s využitím pufru obsahujícího zvýšenou koncentraci soli ve srovnání s promývacím pufrem, s pufrem, který má nižší hodnotu pH ve srovnání s promývacím pufrem nebo s pufrem, který má jak vyšší koncentraci soli, tak i nižší hodnotu pH, než má promývací pufr. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se daptomycin váže na anion-výměnnou pryskyřici, která byla předtím nechána reagovat s pufrem neobsahujícím žádnou přidanou sůl nebo obsahující pouze nízké koncentrace soli při neutrálním až bazickém pH. Pryskyřice se po navázání daptomycinu promyje trojnásobným 20 objemem vody a poté šesti objemy pufru se středním obsahem soli obsahujícím 30 až 60 mM NaCl. Daptomycin je eluován z kolony jedním až třemi objemy pufru se zvýšeným obsahem soli nebo s nižším pH obsahujícím 300 až 500 mM NaCl. Vyšší koncentrace chloridu sodného a alternativní soli jako je chlorid draselný bude také eluovat daptomycin z pryskyřice. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se používá anionická výměnná pryskyřice s nižším průtokem. 25 V preferovanějším provedení se používá pryskyřice FP-DA 13 (Mitsubishi).

Anion-výměnná chromatografie může být prováděna pomocí chromatografické kolony nebo může být provedena v dávkovém módu. Pro komerční využití může být preferován dávkový mód. Anion-výměnná pryskyřice může být promyta a eluována postupných krokovým gradientem soli nebo kontinuálním gradientem. Vhodný krokový nebo kontinuální gradient je takový, 35 který dovoluje separaci daptomycinu od kontaminantů. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se kontinuální solný gradient pohybuje v rozmezí od 0 do 1000 mM NaCl. V preferovanějším provedení se kontinuální solný gradient pohybuje v rozmezí od 100 do 500 mM NaCl nebo od 0 do 400 mM NaCl. Může být také použita chromatografie s radiálním tokem podle United States patentů 5 756 680, 4 865 729, 4 840 730 nebo 4 708 782.

Po anion-výměnné chromatografii je daptomycin dále čištěn pomocí chromatografie s hydrofobními interakcemi (HIC). Jedno z provedení je popsáno v United States patentu 4 874 843, zahrnutém zde jako reference. Eluovaný daptomycinový přípravek se nechá kontaktovat s HIC pryskyřicí za podmínek, kdy většina daptomycinu nebo všechen daptomycin se váže na pryskyřici. Obsah vody pryskyřice s navázaným daptomycinem se sníží kontaktem pryskyřice se zvýšenou koncentrací nepolárního rozpouštědla. Pryskyřice se promyje vhodným polárním organickým rozpouštědlem za podmínek, kdy nečistoty disociují z pryskyřice zatímco daptomycin zůstává navázán. Nakonec se daptomycinový preparát eluuje za podmínek, při kterých daptomycin disociuje z pryskyřice. Obecně se daptomycin eluuje s využitím rozpouštědel obsahujících pufr s nižší polaritou (vyšší koncentrace polárního rozpouštědla) a/nebo s vyšší hodnotou pH než měl 40 promývací pufr.

55 V preferovaném provedení tohoto vynálezu se používá nefunkcionalizovaná pryskyřice HIC, kterou je HP-20ss s malými částicemi. Vázaný daptomycin se specificky odstraňuje z HP-20ss

pryskyřice fází s organickým rozpouštědlem jako např. fází obsahující isopropylalkohol, acetonitril, butanol nebo jiné vhodné rozpouštědlo. V preferovanějším provedení je daptomycin nasycen na pryskyřici, promývanou s acetátovým pufrem obsahujícím 10 % acetonitrilu nebo ekvivalentního polárního rozpouštědla jako je isopropylalkohol. Daptomycinem nasycená pryskyřice se 5 promývá alespoň trojnásobným objemem pufru použitého pro ekvilibraci. Pryskyřice nasycená daptomycinem se dále zbavuje dalších nečistot promýváním třemi až šesti objemy acetátového promývacího pufru obsahujícího neeluující koncentraci polárního rozpouštědla. V preferovaném 10 provedení tohoto vynálezu se daptomycinem nasycená pryskyřice promývá 30% acetonitrem nebo 45% isopropylalkoholem. Daptomycinem nasycená pryskyřice se eluuje jedním až třemi objemy acetátového pufru obsahujícího 35 % nebo více acetonitrilu nebo více než 50 % isopropylalkoholu. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se daptomycin eluuje 35% acetonitrem při pH 4,0 až 5,0 nebo 55 až 60% isopropylalkoholem. V dalším provedení se daptomycinem nasycená pryskyřice eluuje jedním až třemi objemy pufru při zvýšeném pH. V tomto provedení se pH pufru postupně zvyšuje, aby došlo k eluování různých sloučenin z kolony při různých hodnotách pH 15 vzhledem k rozdílům v nábojích. Při zvýšeném pH, např. pH 6,0 až 7,0 se eluční koncentrace acetonitrilu snižuje na 10 až 20 %. Podobně, při zvýšeném pH, např. 6,0 až 7,0, se eluční koncentrace isopropylalkoholu snižuje na 20 až 25 %. Kontrola teploty, při které se provádí chromatografie, má také vliv na koncentraci rozpouštědla. Eluování při nižší teplotě, to jest za 20 podmínek chlazení, vyžaduje zvýšené koncentrace rozpouštědla při všech hodnotách pH.

Po HIC se obsah organického rozpouštědla v daptomycinovém preparátu sníží pomocí anion-výměnné chromatografie. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se používá FP-DA 13, diskutovaný v tomto vynálezu.

Po druhé anion-výměnné chromatografie se čištěný daptomycin depyrogenuje, filtruje a koncentruje za chladicích podmínek. Filtrování daptomycinu může být provedeno libovolnou metodou známou v oboru. V jednom provedení se filtrování a depyrogenace provádí pomocí:

- i) vyvolání takových podmínek, při kterých je daptomycin v daptomycinovém roztoku v monomerním a nemichelárním stavu,
- 30 ii) filtrování daptomycinového roztoku za podmínek, při kterých bude daptomycin přecházet přes filtr, ovšem pyrogeny přes filtr nebudou procházet, např. tak, že se daptomycinový roztok udržuje při pH 6,0 až 7,0 a zfiltrováním roztoku přes ultrafiltr, který je nastaven na hodnotu 3000 až 30 000 NMW,
- 35 iii) změnou podmínek daptomycinového roztoku tak, že daptomycin agreguje, např. změnou pH daptomycinového roztoku na 2,5 až 4,5, takže daptomycin tvoří micely,
- iv) zfiltrováním daptomycinového roztoku za podmínek, při kterých bude daptomycin zůstat na filtru, např. zakoncentrováním daptomycinu na ultrafiltru při 30 000 NMW nebo méně, jako třeba na reverzní osmotické membráně, a
- v) shromážděním depyrogenového daptomycinu.

40 V preferovaném provedení tohoto vynálezu se daptomycin z kroku (ii) filtruje za tlaku přes ultrafiltr s hranicí molekulové hmotnosti 10 000 dalton při pH přibližně 7 až 8. V preferovanějším provedení daptomycin prochází přes filtr, ovšem pyrogeny jako třeba lipopolysacharidy (LPS) nikoliv. Po počáteční ultrafiltraci se pH filtrátu sníží na hodnotu 2,5 až 4,5 a filtrát se zkoncentruje na ultrafiltru s hranicí 10 000 MWCO na přibližně 120 mg/ml. Za těchto okolností daptomycin 45 zůstává na filtru. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je pH substrátu 3,5. Po zkoncentrování je koncentrace daptomycinu adjustována na 105 mg/ml, je zkontrolována koncentrace endotoxinu a vzorek se plní do vialek za aseptických podmínek.

50 V dalším provedení se provádí reverzní osmotická nanofiltrace při pH 1,5 až 3,0. Nižší pH a chlazení se používají kvůli zabránění degradace čištěného daptomycinu. Daptomycin může být dále zfiltrován přes 0,2 µm filtr kvůli snížení bioněčistot a poté se lyofilizuje vcelku nebo ve vialkách.

Jako alternativa k výše uvedenému ultrafiltračnímu a koncentračnímu kroku se eluované frakce obsahující daptomycin smíchají s butanolem (buď *n*-butanol, isobutanol nebo terc-butylalkohol) při pH přibližně 4,5 v poměru vyšším než jedna část butanolu na devět částí daptomycinového roztoku. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se jeden díl butanolu smíchá se čtyřmi díly daptomycinového roztoku za vzniku 20% butanolového roztoku. Roztok daptomycinu v butanolu se nechá oddělit na organickou a vodnou fázi. Daptomycin přechází do organické fáze, která se oddělí. Dehydratace daptomycinu v organickém rozpouštědle může stabilizovat daptomycin a zabraňovat degradaci čištěného daptomycinu na anhydrodaptomycin a následnému vzniku β -izomeru. Nakonec může být daptomycin vrácen do vodné fáze přidáním pufru o hodnotě pH 6,5 až 7,5 do organické fáze. Po zkoncentrování nebo shromáždění daptomycinu se daptomycin lyofilizuje.

V dalším provedení tohoto vynálezu se používá chromatografická metoda pro čištění lipopeptidů jiných než daptomycinu, jako jsou třeba A54145, LY303366, echinocandiny, pneumocandiny, aculeacin, surfactin, plipastatin B1, amphomycin nebo lipopeptidový derivát popsáný v United States patentu 5 629 288. V dalším provedení se používá způsob čištění pomocí chromatografie pro čištění daptomycinu příbuzných lipopeptidů, včetně A54145 nebo lipopeptidu popsaného v United States patentech 4 537 717, 4 482 487, Re. 32 311, Re. 32 310, 5 912 226, který je v současné době vydán jako United States Serial. No. 09/547 357, Mezinárodní PCT přihláška WO 01/44272, WO 01/44274 a WO 01/44271 nebo antibiotika A-21978, kde je *n*-dekanoylový postranní řetězec daptomycinu nahrazen *n*-oktanoylovým, *n*-nonanoylovým, *n*-undekanoylovým, *n*-dodekanoylovým, *n*-tridekanoylovým nebo *n*-tetradekanoylovým postranním řetězcem.

V dalším provedení tohoto vynálezu je použita „Salt Cloud Method“ (Genetic Engineering News, vol. 19, č. 20, str. 1, 34 a 43, (15. listopadu 1999)) při čištění daptomycinu nebo jiných lipopeptidů. Metoda „Salt Cloud“ je systém založený na membráně, který kombinuje selektivní separaci s vysokoobjemovou propustností. Metoda „Salt Cloud“ může být použita ve spojení s procesními kroky popsány v tomto vynálezu nebo může být použita odděleně k čištění daptomycinu nebo jiných lipopeptidů.

Další provedení tohoto vynálezu se zabývá chromatografickou metodou, která produkuje vysoce čistý lipopeptid, jaký je nedosažitelný metodami známými v současném stavu techniky. Chromatografická metoda zahrnuje použití anion-výměnné chromatografie s modifikovaným pufrem k čištění preparátů obsahujících lipopeptid. V provedení tohoto vynálezu se metoda používá k produkci vysoce čistého daptomycinu nebo daptomycinu příbuzného lipopeptidu. Tato metoda, je-li použita na částečně čištěný daptomycin, produkuje daptomycin o čistotě alespoň 98 %. Tento způsob také produkuje daptomycin, který je zbaven nebo prakticky zbaven anhydro-daptomycinu. Metoda zahrnuje následující kroky:

Částečně čištěný daptomycin se připraví libovolnou metodou známou v současném stavu techniky. Daptomycinový preparát se poté dále čistí pomocí anion-výměnné chromatografie zesílené modifikovaným pufrem. Daptomycin je navázán na anion-výměnnou pryskyřici v přítomnosti vhodného iontově modifikovaného pufru, za podmínek, při kterých se daptomycin váže na pryskyřici v monomerním nemicelárním stavu. Modifikovaný pufr zahrnuje pufrovací činidlo jako je např. (výčet není limitující) acetát, fosfát, citrát a Tris-HCl nebo libovolné jiné pufrovací činidlo, které dobře pufruje při neutrálním pH. Modifikovaný pufr dále zahrnuje jedno nebo více chaotropických činidel, včetně (bez omezení) guanidinu, amoniaku, močoviny, silně redukční činidla, benzoát, askorbát nebo jiné činidlo zvyšující iontovou sílu, schopné modifikovat pufr tak, aby byl daptomycin snadno oddělen od nečistot. Daptomycinem napuštěná pryskyřice se promývá vhodným iontově modifikovaným pufrem kvůli vymytí nečistot včetně anhydro-daptomycinu. Daptomycin se poté eluuje za podmínek, dovolujících separaci daptomycinu od nečistot, které zůstávají navázané k pryskyřici, včetně β -izomeru.

V preferovaném provedení tohoto vynálezu je modifikovaný pufr při neutrálním pH (pH = 6 až 8) a obsahuje 2 až 6 M močovinu. V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu se používá anion-výměnná pryskyřice Porous Resin P150 nebo Porous D50 (PE Biosystems). Ve více preferovaném provedení tohoto vynálezu se používá anion-výměnná pryskyřice Porous P150. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se daptomycin váže na pryskyřici v pufru majícím nižší iontovou sílu, promyje se pufrům o nízké až střední iontové síle a eluuje se pufrům o vysoké iontové síle. V jednom z preferovaných provedení se daptomycin váže na pryskyřici Porous P50 v Tris pufru o pH 7,0 obsahujícím močovinu. Pryskyřice Porous P150 s navázaným daptomycinem se promyje trojnásobným objemem Tris pufru nebo jiného vhodného pufru obsahujícího takovou koncentraci solí, která odstraní kontaminanty a anhydro-daptomycin bez toho, aby byl eluován daptomycin. Daptomycin se eluuje z pryskyřice Porous P150 s Tris pufrům nebo jiným vhodným pufrům se zvýšeným obsahem solí, které nechají další nečistoty včetně významného podílu β -izomeru vázané na koloně. V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu se používá pryskyřice Porous P150 a daptomycin se váže na pryskyřice v pufru o pH 6,0 obsahujícím 2M močovinu. Pryskyřice Porous P150 s navázaným daptomycinem se promyje a eluuje podobně jako ve výše popsané metodě, s tou výjimkou, že se použije acetátový pufr o pH 6,0 obsahující 2M močovinu. Frakce produktu mohou být měřeny pomocí HPLC nebo pomocí UV spektroskopie.

Anion-výměnná chromatografie s modifikovaným pufrům může být prováděna pomocí sloupcové chromatografie nebo může být provedena v dávkovém módu.

Může být také použita chromatografie s radiálním tokem, podle popisu v United States patentech 5 756 680, 4 865 729, 4 840 730 nebo 4 708 782. Anion-výměnná pryskyřice s modifikovaným pufrům může být promývána a eluována krokovým solným gradientem nebo kontinuálním solným gradientem. Vhodný krokový nebo kontinuální gradient je takový, který dovoluje separaci daptomycinu od nečistot, včetně (výčet není limitující) anhydro-daptomycinu a β -izomeru. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se používá kontinuální solný gradient od 0 do 1000 mM NaCl. V preferovanějším provedení se používá solný gradient 100 až 500 mM NaCl nebo 0 až 400 mM NaCl.

V dalším provedení tohoto vynálezu se používá anion-výměnná chromatografie s modifikovaným pufrům pro čištění lipopeptidových sloučenin jiných než daptomycinu. Tyto lipopeptidové sloučeniny zahrnují (bez omezení) A54145, LY303366, echinocandiny, pneumocandiny, aculeacin, surfactin a plipastatin B1 (Tsuge et al., 1996, Arch. Microbiol. 165: 243–51) a lipopeptidové deriváty uvedené v United States patentu 5 629 288. V dalším provedení se používá anion-výměnná chromatografie s modifikovaným pufrům pro čištění daptomycinu příbuzných lipopeptidů jako jsou A54145 nebo lipopeptidů popsaných v United States patentech 4 537 717, 4 482 487, Re. 32 311, Re. 32 310, 5 912 226, v současné době vydaných jako United States Serial. N. 09/547 357, mezinárodních PCT přihláškách WO 01/44272, WO 01/44274 a WO 01/44271 nebo antibiotika A-21978, ve kterých je n-dekanoylový postranní řetězec daptomycinu nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem.

V dalším provedení tohoto vynálezu se používá nová kombinace chromatografických kroků k čištění daptomycinu nebo daptomycinu příbuzných lipopeptidů. Způsob zahrnuje anion-výměnnou chromatografii, chromatografii na reverzní fázi s malou velikostí částic a anion-výměnnou chromatografii s modifikovaným pufrům. Čisticí metoda může dále zahrnovat změnu fermentačních podmínek, při kterých je surový produkt obsahující A21978C produkován pomocí *Streptomyces roseosporus*. Tyto metody produkují daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid, mající alespoň 98% čistotu. V preferovaném provedení tohoto vynálezu metoda produkuje daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid, který má vyšší než 98% čistotu.

Preferované provedení způsobu chromatografické metody je popsáno dále:

Streptomyces roseosporus je fermentován s přidavkem dekanové kyseliny, podle popisu v United States patentu 4 885 243, s tou modifikací, že se dekanová kyselina udržuje na co nejnižší koncentraci bez toho, že by to mělo negativní vliv na celkový výtěžek fermentace, jak bylo popsáno výše. V alternativním provedení mohou být použity jiné živné látky, pokud zajišťují n-dekanoylovou skupinu pro adici na daptomycinové jádro. Příklady těchto živných látek jsou (bez omezení) amid kyseliny dekanové, estery dekanové kyseliny včetně butylesterů, surové zdroje kokosového nebo palmového oleje, živočišné zdroje dekanové kyseliny, různé soli dekanové kyseliny a petrochemické zdroje dekanové kyseliny. Po fermentaci se extracelulární kapalina vyčerpá podle výše uvedeného popisu. V alternativním provedení může být daptomycin extrahován od mycelia s využitím organického rozpouštědla jako je n-butanol, před tím než se provede vyčerpání na centrifuze nebo filtru podle výše uvedeného popisu. Po vyčerpání fermentační kapaliny je koncentrace daptomycinu ve vyčerpáném roztoku obohacena nejdříve pomocí anion-výměnné chromatografie a poté pomocí HIC, jak bylo popsáno výše.

Po provedení HIC se obsah rozpouštědla v daptomycinovém preparátu snižuje libovolnou metodou známou v oboru. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se obsah organického rozpouštědla snižuje pomocí anion-výměnné chromatografie podle výše uvedeného popisu. Daptomycin by měl být z kolony eluován pufrem, kompatibilním s pufrem požadovaným pro anion-výměnnou chromatografii s modifikovaným pufrem. Alternativně, eluční pufr může být zaměněn za modifikovaný pufr pomocí reverzní osmózy nebo filtrací přes filtr s hranicí 10 000 MWCO. V dalším provedení se obsah organického rozpouštědla snižuje odpařením nebo naředěním v pufru. Ve třetím preferovaném provedení tohoto vynálezu se rozpouštědlo z chromatografie na reverzní fázi a zbytková sůl odstraňují s využitím reverzní osmózy při pH 1,5 až 4,0 nebo ultrafiltrací při pH 2,5 až 4,5. Vznikající produkt může být zmrazen pro skladování ve velkém nebo sušen lyofilizací a poté rehydratován ve vodě nebo v pufru používaném pro anion-výměnnou chromatografii s modifikovaným pufrem.

Daptomycin je dále čištěn pomocí anion-výměnné chromatografie s modifikovaným pufrem, jak bylo popsáno výše.

Po anion-výměnné chromatografie s modifikovaným pufrem je čištěný daptomycin filtrován a zkoncentrován za chlazení. Filtrování daptomycinu může být provedeno libovolnou známou metodou v současném stavu techniky. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se daptomycin depyrogenuje a koncentruje podle výše uvedeného popisu. Alternativně, daptomycin může být zkoncentrován pomocí reverzní osmózy za chlazení při pH 1,5 až 4. Nižší pH a chlazení se používají kvůli zabránění degradace čištěného daptomycinu.

Jako alternativa k výše uvedené filtraci a koncentraci nebo kromě těchto kroků, mohou být frakce obsahující daptomycin z anion-výměnné chromatografie s modifikovaným pufrem smíchány s butanolem (buď n-butanolem, isobutanolem nebo terc-butylalkoholem) při pH přibližně 4,5 v poměru vyšším než jeden díl butanolu na devět dílů daptomycinového roztoku. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je jeden díl butanolu smíchán se čtyřmi díly daptomycinového roztoku za vzniku 20% butanolového roztoku. Butanolový roztok daptomycinu se nechá rozdělit na organickou a vodnou fázi. Daptomycin přechází do organické fáze, která je sebrána. Dehydratace daptomycinu v organickém rozpouštědle může stabilizovat daptomycin a zabraňovat degradaci čištěného daptomycinu na anhydro-daptomycin a následnému vzniku β -izomeru.

Po zkoncentrování nebo sebrání daptomycinu je daptomycin lyofilizován.

Dále se používá popsaná chromatografická metoda pro čištění lipopeptidů jiných než je daptomycin, jako jsou lipopeptidy popsané výše.

Vznik lipopeptidových micel a způsoby jejich použití

Další provedení tohoto vynálezu popisuje lipopeptidové micely, způsoby výroby lipopeptidových micel a způsoby použití lipopeptidových micel pro čištění lipopeptidů a farmaceutické přípravky. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycinu příbuzná molekula, včetně (mimo jiné) daptomycinu, A54145 a daptomycinu příbuzného lipopeptidu popsaného v United States patentech 4 537 717, 4 482 487, Re. 32 311, Re. 32 310, 5 912 226, který je v současné době vydán jako United States Serial. No. 09/547.357, mezinárodních PCT přihláškách WO 01/44272, WO 01/44274 a WO 01/44271 nebo antibiotika A-21978, kde je n-dekanoylový postranní řetězec daptomycinu nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem. V preferovanějším provedení je lipopeptidem daptomycin.

Micely jsou agregáty amfifilních molekul. Ve vodném prostředí se lipofilní části molekul orientují dovnitř interiéru micely a hydrofilní části molekul jsou v kontaktu s vodným prostředím. Micely se tvoří spontánně v roztoku obsahujícím amfifilní molekuly, pokud je koncentrace molekul dostatečně vysoká.

Vznik micel způsobuje změny v některých makroskopických fyzikálních vlastnostech roztoku, včetně změn v osmotickém tlaku, turbiditě, elektrické vodivosti, povrchovém napětí, iontových a proti-iontových aktivitách (v případě, že amfifilní molekuly jsou iontové), indexu lomu, UV a NMR spektrech, parciálním molárním objemu, viskozitě, difúzním koeficientu a rozpustnosti barev. Cmc může být určena měřením jedné nebo více fyzikálních vlastností závislých na tvorbě micel, jako funkce koncentrace amfifilní sloučeniny. Velikost a tvar micel může být určen dynamickým rozptylem laserového záření, ultracentrifugací, viskozitou a/nebo rentgenovou spektroskopii pod nízkým úhlem. Micely mohou existovat v kapalně krystalických fázích.

Lipopeptidy mohou agregovat do micel tehdy, když koncentrace lipopeptidu je vyšší než cmc daného lipopeptidu. Cmc je závislá na druhu lipopeptidu a teplotě, koncentraci soli a pH vodného roztoku obsahujícího lipopeptid. S ohledem na druh lipopeptidu, cmc lipopeptidu se sníží přidáním CH₂ skupiny k lipofilnímu uhlíkovému řetězci. Máme-li tedy cmc pro daptomycin při konkrétní koncentraci soli, teplotě a pH, potom antibiotikum typu A-21978, kde je dekanoylový postranní řetězec mastné kyseliny nahrazen n-oktanoylovým nebo nonanoylovým postranním řetězcem bude mít vyšší cmc, zatímco antibiotikum A-21978, kde je dekanoylový postranní řetězec mastné kyseliny nahrazen n-undekanoylovým n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem bude mít nižší cmc ve srovnání s daptomycinem.

V jednom provedení tohoto vynálezu může být cmc lipopeptidu měněno přidáním nebo odebráním CH₂ skupiny lipopeptidu. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem A-21978, ve kterém je n-dekanoylový postranní řetězec mastné kyseliny nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem. V dalším provedení lze vypočítat přibližnou hodnotu cmc lipopeptidu podle uvedených specifikací. Máme-li hodnotu cmc lipopeptidu jako je daptomycin, lze přibližně vypočítat hodnotu cmc příbuzného lipopeptidu, ve kterém je n-dekanoylový postranní řetězec mastné kyseliny nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem. Výpočet může být proveden způsoby známými odborníkům v oboru.

V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu, máme-li hodnotu cmc lipopeptidu, můžeme přibližně spočítat cmc lipopeptidu, který obsahuje odpovídající peptidovou skupinu. V preferovaném provedení tohoto vynálezu, máme-li hodnotu cmc pro daptomycin, lze jednoduše spočítat hodnotu cmc pro odpovídající lipopeptid jako je A54145, daptomycinu příbuzný lipopeptid popsaný v United States patentech 4 537 717, 4 482 487, Re. 32 311, Re. 32 310, 5 912 226, které jsou v současné době vydány jako United States Serial. No. 09/547.357, mezinárodních PCT přihláškách WO 01/44272, WO 01/44274 a WO 01/44271.

V dalším provedení tohoto vynálezu se cmc lipopeptidu mění změnou teploty roztoku obsahujícího lipopeptid. Cmc lipopeptidu obvykle vzrůstá se vzrůstající teplotou roztoku. Tvorba micel je tedy zvýšena při snížené teplotě a je zabráněna při zvýšené teplotě. Například, roztok obsahující lipopeptid může tvořit micely při 4 °C, protože teplota cmc je snížena a koncentrace lipopeptidu je nad hodnotou cmc, ovšem, stejný roztok lipopeptidu může být monomerní při 20 °C, protože hodnota cmc se zvýšila s rostoucí teplotou a koncentrace lipopeptidu je pod cmc. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je tedy koncentrace lipopeptidu vyšší než cmc při jedné teplotě, a je nižší než hodnota cmc při jiné vyšší teplotě. V preferovanějším provedení je lipopeptidem daptomycin nebo daptomycinu příbuzná molekula jako třeba výše popsané deriváty. V ještě preferovanějším provedení je použitým lipopeptidem daptomycin.

V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu se schopnost manipulace se vznikem micel lipopeptidu provádí s využitím různých teplot, které ovlivňují hodnotu cmc při čištění lipopeptidu. V ještě preferovanějším provedení je lipopeptidem daptomycin nebo příbuzná molekula, jako třeba deriváty popsané výše. V ještě preferovanějším provedení je lipopeptidem daptomycin. V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu se schopnost manipulovat se vznikem lipopeptidových micel pomocí změny teploty používá při výrobě farmaceutických přípravků, které jsou za určité teploty micelární a jsou monomerní za jiné teploty. V preferovaném provedení zahrnují farmaceutické přípravky daptomycin nebo daptomycinu příbuznou molekulu, podle výše uvedeného popisu. V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu zahrnuje farmaceutický přípravek daptomycin.

V dalším provedení tohoto vynálezu se používá přídavek elektrolytu pro zvýšení cmc iontového lipopeptidu. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se sůl, jako třeba NaCl, přidává do roztoku obsahujícího lipopeptid, kvůli snížení repulze mezi nabitými skupinami v lipopeptidových micelách. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin nebo daptomycinu příbuzná molekula, jako třeba výše uvedené deriváty. Například, peptidová skupina daptomycinu obsahuje tři zbytky asparagové kyseliny a L-threo-3-methylglutamové kyseliny (3-MG), které budou všechny nabitě při neutrálním pH. Přídavek elektrolytu jako třeba NaCl nebo podobné soli, tedy bude zvyšovat cmc hodnotu daptomycinu. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je koncentrace soli nejméně 100 mM. V ještě preferovanějším provedení je koncentrace soli 150 mM až 300 mM. V ještě preferovanějším provedení je solí NaCl.

Snížení hodnoty cmc je také pozorováno při přidavku elektrolytu do jiných lipopeptidů, jako třeba u molekul příbuzných daptomycinu, které obsahují zbytky asparagové kyseliny, 3-MG zbytky nebo jiné nabitě skupiny. V preferovaném provedení tohoto vynálezu se tedy sůl přidává do roztoku za účelem snížení cmc daptomycinu příbuzného lipopeptidu, jako třeba A54145, daptomycinu příbuzného lipopeptidu popsaného v United States patentech 4 537 717, 4 482 487, Re. 32 311, Re. 32 310, 5 912 226, které jsou v současné době vydány jako United States Serial. No. 09/547 357, mezinárodních PCT přihláškách WO 01/44272, WO 01/44274 a WO 01/44271 nebo antibiotika A-21978, ve kterém je n-dekanoylový postranní řetězec mastné kyseliny nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem. V dalším provedení se koncentrace soli snižuje za účelem zvýšení cmc iontového lipopeptidu. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je iontovým lipopeptidem daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid podle výše uvedeného popisu.

V dalším provedení se schopnosti manipulace se vznikem micel lipopeptidu pomocí změny koncentrace elektrolytu, a tím i ovlivňování cmc, využívá k čištění lipopeptidu. V provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin. V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu se schopnosti manipulovat s tvorbou lipopeptidových micel pomocí koncentrace elektrolytu, používá k výrobě farmaceutických přípravků, které jsou micelární při určité koncentraci elektrolytu a které jsou monomerní při jiné koncentraci elektrolytu. V preferovaném provedení zahrnuje farmaceutický přípravek daptomycin podle výše uvedeného popisu. V dalším preferovaném provedení zahrnuje farmaceutický prostředek daptomycin.

V dalším provedení tohoto vynálezu se manipuluje s pH roztoku obsahujícího lipopeptid za účelem ovlivnění cmc lipopeptidu. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid, jako třeba výše popsané struktury. V ještě preferovanějším provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin. V jednom provedení tohoto vynálezu je manipulováno s pH tak, aby koncentrace lipopeptidu byla vyšší než hodnota cmc při jednom pH a byla nižší než cmc při jiném pH. Například, pro daptomycin je hodnota cmc při pH 4 ve vodě o teplotě 20 až 25 °C mnohem menší než při pH 6,0 až 7,5. Při pH 4,0 je cmc za těchto podmínek přibližně 400 µg/ml. Viz obrázek 15. Daptomycin je dále monomerní dokonce při 150 mg/ml při pH 6,5 (přičemž koncentrace soli je 150 mM až 300 mM NaCl a teplota je 4 °C). Takže pro daptomycin je hodnota cmc při pH 4,0 menší než u roztoků buď při vyšším pH nebo při nižším pH. Změna cmc při různých hodnotách pH může být také použita pro další nabitě lipopeptidy, včetně lipopeptidů, které jsou příbuzné daptomycinu podle výše uvedeného popisu.

V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu se schopnost manipulování se vznikem micel lipopeptidu změnou pH kvůli ovlivnění cmc používá k čištění lipopeptidu. V provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin. V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu se schopnost manipulování se vznikem micel lipopeptidu změnou pH používá k výrobě farmaceutických přípravků, které jsou micelární při určitém pH a monomerní při jiném pH. V provedení tohoto vynálezu zahrnuje farmaceutický přípravek daptomycin.

V dalším aspektu tohoto vynálezu může být lipopeptid částí smíšené micely. Smíšená micela je taková, kde lipopeptid vytváří micelu s jedním nebo více typy amfipatických molekul. Příklady amfipatických molekul zahrnují (bez omezení) mastné kyseliny se středním nebo dlouhým řetězcem, fosfoglyceridy (fosfolipidy), sfingomyelin, glykolipidy a cholesterol. V jednom provedení mohou být do micely zabudovány alkoholy se střední délkou řetězce, kde zmenšují elektrostatickou repulzi a sterické bránění, čímž se snižuje cmc lipopeptidu. V dalším provedení může být použit přídavek jednoho nebo více typů amfipatických molekul kvůli změně struktury micely z micely sférické (viz Obrázek 14, část a) na planární lipidickou dvojrstevnatou strukturu (viz Obrázek 14, část b) nebo na strukturu liposomu (viz Obrázek 14, část c). Obecně, smíšené micely zahrnující fosfolipidy a/nebo glykolipidy budou způsobovat přeměnu sférických micel na lipidické dvojrstevnaté struktury, které slouží jako permeabilní bariéry pro ionty a většinu polárních molekul.

V dalším provedení může být směsná micela vytvořena ze dvou nebo více různých lipopeptidů. Například, směsná micela může být tvořena z daptomycinu a dalšího lipopeptidu jako třeba A54145 nebo daptomycinu příbuzného lipopeptidu podle výše uvedeného popisu. V dalším provedení může směsná micela zahrnovat lipopeptid společně s jedním nebo více terapeuticky užitečných amfipatických molekul, jako jsou antibiotika, protizánětlivá nebo protihoubová činidla, která jsou známa odborníkům v oboru. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid jako třeba A54145, daptomycinu příbuzné lipopeptidy popsané výše nebo antibiotikům A-21978, ve kterém je n-dekanoylový postranní řetězec mastné kyseliny nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem.

V preferovanějším provedení je lipopeptidem daptomycin.

V dalším provedení tohoto vynálezu zahrnují micely, ať již směsné nebo z jednoho typu lipopeptidové molekuly, lipopeptid, který je terapeuticky užitečný. V preferovanějším provedení je lipopeptidem daptomycin. Daptomycin vytváří micely o velikosti přibližně 5,4 nm (54 Å) při koncentraci 1 mg/ml při pH přibližně 4,5 ve vodě. Viz Obrázek 16.

V dalším provedení tohoto vynálezu zahrnují micely jeden nebo více různých typů terapeutických látek. V jednom z provedení tohoto vynálezu může být terapeutická látka smíchána s lipopeptidem v roztoku tak, že vzniká micela lipopeptidu a terapeutická látka je uzavřena v hydrofobním interiéru. V dalším provedení tohoto vynálezu se terapeutická látka smíchá s lipopeptidem a

jednou nebo více amfipatickými molekulami tak, že vznikají smíšené micely z lipopeptidu a dalších amfipatických molekul a terapeutická látka se nachází v hydrofobním interiéru. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je terapeutickou látkou antibiotikum, protizánětlivé nebo protihoubové činidlo. V preferovanějším provedení tohoto vynálezu je terapeutickou látkou antibiotikum nebo protihoubové činidlo popsané výše. V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu je terapeutická látka rozpustná v hydrofobním prostředí, ale není rozpustná ve vodném roztoku.

V dalším provedení tohoto vynálezu mohou být lipopeptidy formovány do liposomů, což jsou vesicles, v nichž sférické lipidické dvojvrstvy ohraničují vodný interiéru. Viz Obrázek 14, část c. Liposomy jsou výhodné pro terapeutické použití, protože snadno fúzí s plazmatickou membránou a mohou být také použity k zachycení látek v jejich vnitřním vodném prostředí. Látky mohou být takové, které jsou ve vodě rozpustné. V jednom provedení může být sonifikován roztok obsahující lipopeptid a další amfipatickou molekulu za vzniku liposomů. V dalším provedení tohoto vynálezu může být sonifikován samotný lipopeptid za vzniku liposomů. V preferovaném provedení tohoto vynálezu může být sonifikován roztok obsahující daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid jako třeba A54145, lipopeptid popsaný v United States patentech 4 537 717, 4 482 487, Re. 32 311, Re. 32 310, 5 912 226, v současné době vydané jako United States Serial. No. 09/547.357, mezinárodních PCT přihláškách WO 01/44272, WO 01/44274 a WO 01/44271 nebo antibiotika A-21978, kde je n-dekanoylový postranní řetězec daptomycinu nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem. V preferovanějším provedení je lipopeptidem daptomycin.

V dalším provedení zahrnují liposomy jednu nebo více terapeutických látek v jejich vnitřním vodném prostoru. V preferovaném provedení tohoto vynálezu jsou terapeutickou látkou antibiotika, protizánětlivá nebo protihoubová činidla. V ještě preferovanějším provedení je terapeutickou látkou antibiotikum nebo protihoubové činidlo podle níže uvedeného popisu. V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu je terapeutické činidlo rozpustné ve vodném roztoku. V dalším preferovaném provedení tohoto vynálezu obsahuje farmaceutický přípravek liposomy.

V preferovaném provedení zahrnuje farmaceutický přípravek lipopeptidové uspořádání micelárního typu obsahující terapeutickou látku. Lipopeptidové uspořádání micelárního typu mohou být sférické micely, smíšené micely nebo liposomy. Farmaceutické přípravky zahrnující lipopeptidické micely mohou minimalizovat lokální podráždění v místě injekce nebo při intravenózním podávání. V jednom provedení zahrnuje farmaceutický přípravek sůl, pufr k udržení určitého pH a micely. V dalším provedení zahrnuje farmaceutický přípravek jednoho nebo více činidel ke stabilizaci micel a/nebo ke stabilizaci lipopeptidu nebo další terapeutické látky. V jednom provedení farmaceutický přípravek také zahrnuje jednu nebo více terapeutických látek. V preferovaném provedení je terapeutickou látkou antibiotikum, protizánětlivé nebo protihoubové činidlo. V ještě preferovanějším provedení tohoto vynálezu je terapeutickou látkou antibiotikum nebo protihoubové činidlo popsané níže. Terapeutická látka může být přítomna kromě terapeutické substance zabudované do micely nebo může být terapeutickým činidlem, které je zabudováno do micely.

Farmaceutický přípravek může být sušený nebo lyofilizovaný, přičemž v takovémto případě dochází ke vzniku micel poté, kdy je k farmaceutickému přípravku přidán vodný roztok, jako je voda nebo pufr. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je farmaceutický přípravek lyofilizován a obsahuje fyziologickou koncentraci soli po rekonstituci a pufr, který udržuje takové pH, při kterém se spontánně tvoří micely při laboratorní teplotě, když se přidá sterilní voda nebo další pufr. V ještě preferovanějším provedení farmaceutický přípravek zahrnuje daptomycin nebo odpovídající lipopeptid jako je A54145, daptomycinu příbuzné lipopeptidy popsané výše nebo antibiotikum A-21978, ve kterém je n-dekanoylový postranní řetězec daptomycinu nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem. V ještě preferovanějším provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin. V dalším provedení je farmaceutický přípravek vodný. Je prefero-

váno použití liposomů. V preferovaném provedení zahrnuje farmaceutický přípravek stabilizační činidlo pro liposomy.

5 V dalším aspektu se micelární roztok izoluje a/nebo čistí. V jednom provedení tohoto vynálezu se micely izolují od menších substituentů ultrafiltrací. Výběr ultrafiltrační membrány bude záviset na velikosti micel. Obecně, membrány typu 10 000 NMW nebo 30 000 NMW budou dostatečné pro sebrání micel, přičemž dovolí menším substituentům, jako jsou kontaminanty, procházet. V dalším provedení tohoto vynálezu mohou být micely izolovány a/nebo čištěny dialýzou, centrifugací na základě hustotního gradientu nebo size-exclusion chromatografií. Tyto metody jsou velmi dobře známy v oboru. V jednom provedení tohoto vynálezu mají micely vyšší než 30% čistotu, kde čistota je měřena jako hmotnost micel ve srovnání s hmotností monomerní formy lipopeptidu nebo jiné molekuly. V preferovaném provedení tohoto vynálezu mají micely vyšší čistotu než 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % nebo 95 %.

15 V dalším aspektu tohoto vynálezu schopnost lipopeptidu tvořit micely a poté disociovat změnou teploty, pH, koncentrace elektrolytu a/nebo koncentrace lipopeptidu poskytuje způsob čištění lipopeptidů. V jednom provedení metoda zahrnuje čištění lipopeptidů od nízkomolekulárních kontaminantů vystavením lipopeptidů takovým podmínkám, při kterých lipopeptidy tvoří micely a poté separaci micel od kontaminantů pomocí techniky selektivní na velikost jako je ultrafiltrace nebo size-exclusion chromatografie. V dalším provedení tohoto vynálezu je popsána metoda zahrnující zkoncentrování lipopeptidů tím, že se lipopeptidy vystaví podmínkám, při kterých lipopeptidy tvoří micely a poté se zkoncentrovávají pomocí velikostně-selektivní techniky.

25 V ještě preferovanějším provedení tohoto vynálezu zahrnuje metoda jak čištění, tak i zkoncentrování v jediném kroku.

30 V dalším provedení tohoto vynálezu zahrnuje způsob čištění lipopeptidu od vysokomolekulárních kontaminantů, včetně pyrogenů (např. lipopolysacharidů) tím, že se lipopeptid vystaví podmínkám, při kterých je lipopeptid v monomerní formě a poté separaci monomerního lipopeptidového roztoku od vysokomolekulárních kontaminantů pomocí velikostně-selektivní techniky. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je velikostně-selektivní technikou ultrafiltrace, jak bylo popsáno výše. V dalším provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin nebo příbuzný lipopeptid jako je A54145, daptomycinu příbuzný lipopeptid popsáný výše nebo antibiotikum A-21978, ve kterém je n-dekanoylový postranní řetězec mastné kyseliny nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem. V ještě preferovanějším provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin.

40 Preferované provedení způsobu chromatografického dělení s využitím micel za účelem získání čistého daptomycinu je popsáno dále:

Streptomyces roseosporus se fermentuje s živnou kyselinou n-dekanovou podle výše uvedeného popisu. Po fermentaci se extracelulární kapalina vyčeří podle výše uvedeného popisu.

45 Vyčeřený roztok se poté aplikuje na anion-výměnnou pryskyřici, jako je FP-DA 13, podle výše uvedeného popisu. Daptomycin se eluuje z kolony jedním až třemi objemy pufru se zvýšeným obsahem soli, obsahujícím 300 až 500 mM NaCl.

50 Eluovaný daptomycinový preparát se adjustuje při pH 2,5 až 5,0 s využitím kyseliny. V preferovaném provedení je kyselinou kyselina fosforečná. Při pH 2,5 až 4,5, koncentraci NaCl od 300 do 500 mM NaCl a teplotě od 2 do 15 °C tvoří daptomycin micely.

55 Daptomycinový preparát se zfiltruje na ultrafiltrační membráně s hranicí 10 000 až 30 000 NMW. Během ultrafiltrace se daptomycinový preparát promývá pufrům obsahujícím 30 mM acetátu sodného při pH 3,5 a teplotě do 15 °C. Počáteční koncentrace soli je 300 mM

NaCl vzhledem k podmínkám eluce, ovšem jak pokračuje promývání, koncentrace soli se snižuje. Protože daptomycin je v micelární formě, je zadržován na filtru, zatímco nečistoty menší než 10 000 až 30 000 (v závislosti na použitém filtru) procházejí přes filtr. Takto získaný daptomycinový preparát má čistotu 85 až 90 %.

5

Jako případný krok může být daptomycin naředěn a jeho pH nastaveno až na 6,5 za účelem převedení daptomycinu na monomerní formu. Daptomycinový preparát poté prochází přes ultrafiltrační membránu s hranicí 10 000 NMW. Tento nepovinný krok významně snižuje obsah pyrogenů.

10

Způsoby analýzy čistoty daptomycinu

Dále se popisují analytické metody měření čistoty daptomycinu.

15 V současném stavu techniky jsou mnohé kontaminanty, které se čistí společně s daptomycinem, nerozlišeny nebo neidentifikovány, protože možnosti jejich vizualizace a měření nečistot byly omezeny analytickými metodami a požadovaným vybavením. Viz např. United States patent 4 874 843 a Kirsch et al. Rozvoj citlivějších analytických HPLC systémů a technik dovolu-
20 je rozlišení mnoha kontaminantů, které existují v daptomycinových várkách připravených metodami současného stavu techniky. Vyšší rozlišení HPLC metod demonstruje, že daptomycin čištěný metodami současného stavu techniky je kontaminován dříve identifikovanými nečistotami, jako je anhydro-daptomycin a β -izomer, a dalšími dříve neznámými kontaminanty, které se čistí společně s daptomycinem (a eluují společně při dříve popsáných detekčních podmínkách) během čištění na základě metod současného stavu techniky. Identifikace těchto kontaminantů nyní do-
25 luje vývoj metod vedoucích k eliminaci těchto kontaminantů.

Jak bylo probráno výše, anhydro-daptomycin a β -izomer byly popsány dříve jako nečistoty, které se vytrvale a konsistentně vyskytovaly během přípravy daptomycinu. S využitím HPLC analýzy popsané v tomto vynálezu bylo rozlišeno dalších přibližně dvanáct nečistot, vyprodukovaných během výroby daptomycinu, přičemž některé z nich nebyly dříve identifikovány. Tyto
30 nečistoty nebyly odstraněny po čištění pomocí metody popsané v United States patentu 4 874 843. Alespoň deset z těchto nečistot bylo identifikováno (viz např. Obrázek 2 až 11). Kromě toho, alespoň šest z těchto sloučenin není přímým výsledkem reakce produkující anhydro-daptomycin a β -izomer z daptomycinu, spíše jde o sloučeniny produkované jinými nepřibuznými
35 procesy, ke kterým dochází během fermentace nebo čištění daptomycinu. Způsob čištění podle tohoto vynálezu také významně snižuje koncentrace mnoha těchto nečistot (viz Příklady).

K měření množství dalších sloučenin v daptomycinovém preparátu mohou být použity libovolné metody známé v současném stavu techniky. Způsoby identifikace daptomycinových kontaminantů zahrnují (bez omezení) hmotnostní spektroskopii, infračervenou spektroskopii, kapilární elektroforézou a nukleární magnetickou rezonanční spektroskopii. Preferovaný způsob měření množství dalších sloučenin v daptomycinovém preparátu je HPLC.

K měření daptomycinových nečistot podle tohoto vynálezu byly použity dvě metody. První metoda je s lehce nižším rozlišením než metoda druhá. V obou metodách byl použit Shimadzu nebo HP HPLC systém s PE Nelson's Turbochrom Software verze 4.1. „První“ rezoluční metoda je shrnuta v tabulce 1 a „druhá“ rezoluční metoda je popsána v tabulce 2:

Tabulka 1

- 50 1. Systém k dodávce rozpouštědla:
Mód: isokratické pumpování
Rychlost toku: 1,5 ml/min
Doba experimentu: 30 min

2. Rozpouštědlo A: 34% acetonitril v 0,5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ při pH 4,5
Rozpouštědlo B: 20% acetonitril v 0,5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ při pH 4,5

5 Cílovými podmínkami je udržet daptomycin při 15,0 +/-0,5 min. Rozpouštědlo B může být použito společně s rozpouštědlem A kvůli adjustaci HPLC mobilní fáze za účelem dosažení požadovaného retenčního času.

3. Chladič autosampleru: 5 (4 až 6) °C
- 10 4. Nastříknutý objem: 5 µl až 75 µl (20 µl normálně)
5. Kolona: IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5 µm, 4,6 x 250 mm (nebo ekvivalent)
6. Předkolonka: IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5 µm, 4,6 x 30 mm (nebo ekvivalent)
- 15 7. Detekční vlnová délka: 214 nm
8. Teplota kolony: laboratorní
- 20 9. Integrace: Počítačový systém nebo integrátor schopný měření plochy píku.

Tabulka 2

- 25 1. Systém k dodávce rozpouštědla:
Mód: isokratické pumpování
Rychlost toku: 1,5 ml/min
Doba experimentu: 75 min
- 30 2. Rozpouštědlo A: 20% acetonitril v 0,45% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ při pH 3,25
Rozpouštědlo B: 50% acetonitril v 0,45% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ při pH 3,25

35 Cílovými podmínkami je přibližně 35% acetonitril v 0,45% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ při pH 3,25, aby byl daptomycin udržen při 36,0 +/- 1,5 min. Ovšem, poměr rozpouštědel bude použit kvůli adjustaci HPLC mobilní fáze za účelem dosažení požadovaného retenčního času.

3. Chladič autosampleru: 5 (4 až 6) °C
4. Nastříknutý objem: 5 µl až 75 µl (20 µl normálně)
- 40 5. Kolona: IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5 µm, 4,6 x 250 mm (nebo ekvivalent)
6. Předkolonka: IB-SIL (Phenomenex), C-8, 5 µm, 4,6 x 30 mm (nebo ekvivalent)
- 45 7. Detekční vlnová délka: 214 nm
8. Teplota kolony: 25 (22 až 28) °C
9. Integrace: Počítačový systém nebo integrátor schopný měření plochy píku.

50 Čištěné lipopeptidy, farmaceutické přípravky je obsahující a způsoby jejich využití

Dalším předmětem tohoto popisu je zajištění čištěných lipopeptidů, stejně jako jejich solí, esterů, amidů, etherů a chráněných forem, stejně jako farmaceutických přípravků obsahujících čištěné

lipopeptidy nebo jejich soli. V provedení tohoto vynálezu je lipopeptidem daptomycin podle výše uvedeného popisu. Dalším předmětem tohoto popisu je zajištění farmaceutických prostředků obsahujících lipopeptid v uspořádání micelárního typu. V preferovaném provedení tohoto vynálezu lipopeptidové micely jsou micely zahrnující daptomycin nebo jeden nebo více daptomycinu příbuzných lipopeptidů. Všechny zde uvedené reference na lipopeptidové micely označují nejen všechna lipopeptidová uspořádání micelárního typu, ale také konkrétně předpokládají daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid jako je A54145, daptomycinu příbuzné lipopeptidy popsané výše nebo antibiotikum A-21978, ve kterém je n-dekanoylový postranní řetězec mastné kyseliny nahrazen n-oktanoylovým, n-nonanoylovým, n-undekanoylovým, n-dodekanoylovým, n-tridekanoylovým nebo n-tetradekanoylovým postranním řetězcem. Dále všechny reference na lipopeptidická uspořádání micelárního typu specificky předpokládají sférické nebo smíšené micely a liposomy, jak bylo diskutováno výše.

Čištěné lipopeptidy, jejich farmaceuticky přijatelné soli nebo lipopeptidové micely mohou být formulovány pro orální, intravenózní, intramuskulární, subkutánní, aerosolové, místní nebo parenterální podávání pro terapeutické nebo profylaktické léčení nemocí, obzvláště bakteriálních nemocí. V preferovaném provedení tohoto vynálezu čištěný lipopeptid je čištěný daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid. Odkazy na „čištěný daptomycin“, „čištěný daptomycinu příbuzný lipopeptid“ nebo „čištěný lipopeptid“ zahrnují jejich farmaceuticky přijatelné soli. Daptomycin, daptomycinu příbuzný lipopeptid nebo jiné lipopeptidové micely mohou být formulovány s využitím libovolného farmaceuticky přijatelného nosiče nebo excipientu, který je kompatibilní s daptomycinem nebo s lipopeptidem našeho zájmu. Viz např. 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 a I. Ash, 1996, The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, ed. S. Budavari, Annual, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA; Martindale: The Complete Drug Reference, ed. K. Parfitt, 1999; a Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New York, NY, ed. L. S. Goodman et al., jejichž obsah je zde zahrnut jako reference pro obecný popis způsobů podávání různých antimikrobiálních činidel v lidské terapii. Čištěný daptomycin, daptomycinu příbuzný lipopeptid nebo jiné lipopeptidové micely podle tohoto vynálezu mohou být smíchány s konvenčními farmaceutickými nosiči a excipienty a mohou být použity ve formě tablet, kapslí, elixírů, suspenzí, sirupů, oplatek, krémů a podobně. Daptomycin, daptomycinu příbuzný lipopeptid nebo jiné lipopeptidové micely mohou být smíchány s dalšími terapeutickými činidly a antibiotiky jak bylo diskutováno v textu. Přípravky budou obsahovat sloučeninu podle tohoto vynálezu v množství od 0,1 do 90 % hmotnosti aktivní sloučeniny a obecněji od 10 do asi 30 %.

Přípravky podle tohoto vynálezu mohou být podávány s využitím kontrolovaného uvolňování (např. kapsle) nebo pomocí systémů s odloženým uvolňováním (např. biodegradovatelné matrice). Příklady systémů se zpožděným uvolňováním pro dodání léčiv, které jsou vhodné pro podávání přípravků podle tohoto vynálezu, jsou popsány v Patentech US 4 452 775 (Kent), 5 239 660 (Leonard), 3 854 480 (Zaffaroni).

Přípravky mohou obsahovat běžné nosiče a excipienty, jako jsou obilný škrob nebo želatina, laktóza, sacharóza, mikrokrytalická celulóza, kaolin, mannitol, fosfát divápenatý, chlorid sodný a alginová kyselina. Přípravky mohou obsahovat sodnou sůl kroskarmelózy, mikrokrytalickou celulózu, obilný škrob, sodný škrobglykolát a alginovou kyselinu.

Tabletová pojiva, která mohou být použita, zahrnují akacii, methylcelulózu, natrium-karboxymethylcelulózu, polyvinylpyrrolidon (Povidon), hydroxypropylmethylcelulózu, sacharózu, škrob a ethylcelulózu.

Lubrikanty, které mohou být použity, zahrnují stearát hořečnatý nebo jiné metalické stearáty, kyselinu stearovou, silikonovou kapalinu, talek, vosky, oleje a koloidní oxid křemičitý.

Mohou být také použita chuťová činidla jako je pepermint, olej wintergreen, cherry apod. Může být vhodné přidávat barvicí činidlo, aby vznikla dávková forma vzhledově estetičtější nebo aby byl produkt identifikován.

5 Pro orální použití jsou prakticky užitečné tuhé formulace, jako jsou tablety a kapsle. Také mohou být vhodné prostředky s odloženým účinkem nebo preparáty potažené pro průchod střevem. Pro
 10 pediatrické a geriatrické aplikace jsou obzvláště vhodné suspenze, sirupy a žvýkací tablety. Pro orální podávání jsou farmaceutické přípravky ve formě např. tablet, kapslí, suspenzí nebo kapalin. Farmaceutické přípravky jsou s výhodou připravovány ve formě dávkových forem obsahujících
 15 terapeuticky účinné množství aktivní složky. Příklady těchto dávkových forem jsou tablety a kapsle. Pro terapeutické účely mohou tablety a kapsle kromě aktivní složky obsahovat konvenční nosiče jako jsou pojiva, např. akáciovou gumu, želatinu, polyvinylpyrrolidon, sorbitol nebo tragacant; pojiva jako např. fosfát vápenatý, glycin, laktóza, kukuřičný škrob, sorbitol nebo sacharóza; lubrikanty jako např. stearát hořečnatý, polyethylenglykol, silikát nebo talek; desintegrační
 20 činidla jako např. bramborový škrob, chuťová nebo barvicí činidla nebo akceptovatelná smáčecí činidla. Orální kapalně přípravky jsou obecně ve formě vodných nebo olejových roztoků, suspenzí, emulzí, sirupů nebo elixírů a mohou obsahovat konvenční aditiva, jako jsou suspenzní činidla, emulgační činidla, nevodná činidla, prezervativa, barvicí činidla a chuťová činidla. Orální kapalně přípravky mohou obsahovat lipopeptidové micely nebo monomerní formy
 25 lipopeptidu. Příklady přídavných látek pro kapalně přípravky zahrnují akácii, mandlový olej, ethylalkohol, frakcionizovaný kokosový olej, želatinu, glukózový sirup, glycerin, hydrogenované jedlé tuky, lecithin, methylcelulózu, methyl- nebo propyl-para-hydroxybenzoát, propylenglykol, sorbitol nebo kyselinu sorbovou.

25 Pro intravenózní (IV) použití může být vodorozpustná forma daptomycinu, daptomycinu příbuzného lipopeptidu nebo jiného lipopeptidu rozpuštěna v libovolné běžně používané intravenózní kapalině a podávána infuzí. Pokud jde o lipopeptidové micely, lipopeptid se rozpustí
 30 v intravenózní formulaci za podmínek, při kterých je lipopeptid přítomný při koncentracích nad jeho cmc. Odborník v oboru může měnit hodnoty pH, teplotu nebo koncentraci soli podle popisu ve vynálezu za účelem získání intravenózního roztoku zahrnujícího lipopeptidové micely. Dále může být lipopeptidový roztok sonifikován za účelem získání lipopeptidových liposomů. Intravenózní formulace mohou obsahovat nosiče, excipienty nebo stabilizátory včetně (bez omezení)
 35 vápníku, albuminu lidského séra, citrátu, acetátu, chloridu vápenatého, uhličitanu a dalších solí. Intravenózní kapaliny zahrnují (bez omezení) fyziologický roztok nebo Ringerův roztok. Daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid může být také umístěn do injektorů, kanyly, katetrů a vedení.

Formulace pro parenterální podávání může být ve formě vodných nebo nevodných izotonických sterilních roztoků nebo suspenzí pro injektování. Tyto roztoky nebo suspenze mohou být připraveny ze sterilních prášků nebo granulí majících jeden nebo více nosičů zmíněných u použití pro
 40 orální podávání. Lipopeptidové micely mohou být obzvláště vhodné pro parenterální podávání. Sloučeniny mohou být rozpuštěny v polyethylenglykolu, propylenglykolu, ethanolu, obilném oleji, benzylalkoholu, chloridu sodném a/nebo různých pufrch. Pro intramuskulární přípravky mohou být sterilní formulace lipopeptidové sloučeniny nebo jejich vhodné rozpustné solné formy, např. hydrochloridová sůl, rozpuštěny a podávány ve farmaceutickém ředidle jako je voda pro injekce (WFI), fyziologický slaný roztok nebo 5% glukóza.

Lipopeptidové micely mohou být obzvláště výhodné pro parenterální podávání, protože je pravděpodobné, že nebudou způsobovat žádné lokální podráždění v místě injekce. Bez toho aniž bychom se cítili být nějak vázání teorií, je pravděpodobné, že lipopeptidové micely budou způsobovat
 50 menší lokální podráždění než monomerní lipopeptidy, protože lipidické ocásky, které mohou při injekci způsobovat podráždění, budou nasměrovány dovnitř micely, zatímco peptidové jádro, u něhož je menší pravděpodobnost místního podráždění než u lipidických ocásků, bude vystaveno směrem ke tkáním. Lipopeptidové micely mohou být připraveny pro intramuskulární a parenterální přípravky podle popisu v tomto vynálezu za vzniku přípravku obsahujícího lipopeptidové
 55

micely. Dále může být lipopeptidový roztok sonifikován za účelem získání lipopeptidových liposomů. Vhodná nerozpustná forma sloučeniny může být také připravena a podávána jako suspenze ve vodném základu nebo farmaceuticky přijatelné olejové bázi, např. ester dlouhé mastné kyseliny jako třeba ethyloléát.

5

Injektovatelné depotní formy mohou být vyrobeny zabudováním mikroenkapsulovaných maticí sloučeniny v biodegradovatelných polymerech jako je polyaktidepolyglykolid. V závislosti na poměru léčiva k polymeru a druhu konkrétního použitého polymeru může být řízena rychlost uvolňování léčiva. Příklady dalších biodegradovatelných polymerů zahrnují poly(orthoestery) a poly(anhydridy). Depotní injektovatelné přípravky se také připravují uzavřením léčiva v mikroemulzích, které jsou kompatibilní s tělními tkáněmi.

10

Pro místní použití mohou být sloučeniny a micely podle tohoto vynálezu připraveny ve vhodné formě k aplikaci na kůži nebo sliznice nosu a krku a mohou mít formu krémů, mazání, kapalných sprejů nebo inhalantů, bonbonů nebo krčních mazání. Tyto místní formulace mohou dále zahrnovat chemické sloučeniny jako je dimethylsulfoxid (DMSO) kvůli usnadnění povrchové penetrace aktivní složky. Jako místní přípravky mohou být podávány sterilní přípravky daptomycinu, daptomycinu příbuzného lipopeptidu, jejich vhodné solné formy nebo lipopeptidové micely ve formě krémů, mazání, sprejů nebo dalších přípravků pro místní aplikaci. Přípravky pro místní použití mohou být také ve formě bandáží, které byly impregnovány s čišťeným daptomycinem, daptomycinu příbuzným dipopeptidem nebo přípravkem obsahujícím lipopeptidové micely.

15

20

Pro aplikace do očí nebo uší mohou být sloučeniny podle tohoto vynálezu přítomny v kapalně nebo polokapalně formě formulované v hydrofobních nebo hydrofilních základech jako mazání, lotion, nátěry nebo prášky.

25

Pro rektální podávání mohou být sloučeniny podle tohoto vynálezu podávány ve formě čípků, kde jsou smíchány s konvenčními nosiči, jako je kakaové máslo, vosk nebo jiný glycerid.

30

Pro aerosolové přípravky mohou být sterilní formulace čišťeného daptomycinu nebo daptomycinu příbuzného lipopeptidu nebo solných forem těchto sloučenin použity v inhalátorech jako jsou inhalátory s měřenou dávkou a rozprašovače. Pro aerosolové přípravky mohou být také použity sterilní formulace lipopeptidových micel. Aerosolizované formy mohou být obzvláště užitečné pro léčení respiračních infekcí jako je pneumonie a infekce dutin.

35

Alternativně, sloučeniny podle tohoto popisu mohou být v práškové formě pro rekonstituci ve vhodném farmaceuticky přijatelném nosiči v čase použití. Má-li být prášková forma rekonstituována ve formě lipopeptidových micel, může prášek obsahovat pufr a/nebo sůl tak, aby rekonstrukce s určitým množstvím sterilní vody nebo solanky vedla ke vzniku micel. Alternativně, prášková forma může obsahovat instrukce týkající se množství a typu farmaceuticky přijatelného nosiče, který má být použit na rekonstituci lipopeptidu, aby byly získány micely. V dalším provedení jednotková dávková forma sloučeniny podle tohoto popisu může být roztok sloučeniny, její soli nebo lipopeptidových micel ve vhodném ředidle ve sterilních hermeticky uzavřených ampulích. Koncentrace sloučeniny v dávkové formě se může lišit, např. od 1 % do asi 50 %, v závislosti na použité sloučenině a její rozpustnosti a na dávce vyžadované lékařem. Jestliže přípravek obsahuje dávkové formy, každá dávková forma s výhodou obsahuje od 50 do 500 mg aktivní látky. Pro léčení dospělých pacientů dávky s výhodou obsahují od 100 mg do 3 g denně, v závislosti na způsobu podávání a frekvenci podávání.

45

50

V dalším aspektu se vynález zabývá způsobem léčení infekcí, obzvláště takových, které jsou způsobeny gram-pozitivními bakteriemi u lidí a u zvířat. Termín „léčení“ je použit k označení jak prevence infekce, tak i kontroly již projevené infekce poté co byl živočich infikován. Projevená infekce může být akutní nebo chronická. Způsob léčení zahrnuje podávání lidem nebo jiným živočichům účinné množství sloučeniny podle tohoto vynálezu. Účinná dávka je obecně mezi 0,1 a asi 25 mg/kg čišťeného daptomycinu, daptomycinu příbuzného lipopeptidu nebo jejich

55

farmaceuticky přijatelné soli. Daptomycin nebo daptomycinu příbuzný lipopeptid může být v monomerní formě nebo může být částí lipopeptidových micel. Preferovaná dávka je od asi 1 do asi 12 mg/kg čištěného daptomycinu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli.

5 Je také popsán způsob léčení infekcí, obzvláště takových, které jsou způsobeny gram-pozitivními baktériemi u subjektu s terapeuticky účinným množstvím daptomycinu nebo jiným antibakteriálním lipopeptidem. Daptomycin nebo antibakteriální lipopeptid může být monomerní nebo ve formě lipopeptidových micel. Příklady způsobů podávání antibakteriálních činidel jsou popsány v Patent US 5 041 567 (Rogers) a v PCT patentové přihlášce EP94/02552 (publikace č. 10 WO 95/05384), jejichž obsah je zde zahrnut jako reference. V tomto vynálezu označuje termín „terapeuticky účinné množství“ množství daptomycinu nebo antibakteriálního lipopeptidu podle tohoto vynálezu, které zabraňuje počátku bakteriální infekce, zmírňuje její symptomy nebo zastavuje rozvoj bakteriální infekce. Termín „léčení“ je definován jako podávání terapeuticky účinného množství sloučeniny podle tohoto popisu, jak za účelem prevence výskytu infekce a kontroly 15 nebo eliminace infekce. Termín „subjekt“ v tomto vynálezu definuje savce, rostlinu nebo buňčnou kulturu. V preferovaném provedení tohoto popisu je subjektem lidský nebo zvířecí pacient potřebný léčení lipopeptidovou sloučeninou.

Lipopeptidová antibiotická sloučenina může být podávána jako jediná denní dávka nebo ve více- 20 násobných dávkách za den. Režim léčení může vyžadovat podávání během dlouhé časové periody, např. několik dní nebo od dvou do čtyř týdnů. Množství v podávané dávce nebo celkové podávané množství bude záviset na takových faktorech, jako jsou druh a závažnost infekce, věk a obecné zdraví pacienta, tolerance pacienta k antibiotikům a mikroorganismům nebo na mikroorganismech zahrnutých v infekci. Způsob podávání je popsán v mezinárodní PCT přihlášce 25 WO 00/18419.

Způsob podle tohoto popisu zahrnuje podávání čištěného daptomycinu nebo jiného lipopeptidového antibiotika nebo jejich farmaceutického přípravku pacientům v množství, které je dostatečné pro redukování nebo eliminaci infekce způsobené gram-pozitivními baktériemi. Daptomycin 30 nebo lipopeptidové antibiotikum mohou být monomery nebo mohou být přítomny ve formě micel. Antibiotikum může být podáváno orálně, parenterálně, inhalací, místně, rektálně, nasálně, bukálně, vaginálně nebo pomocí implantovaného zásobníku, externí pumpou nebo katetrem. Antibiotikum může být připraveno pro oftalmické nebo aerosolové použití. Čištěný daptomycin, lipopeptidové antibiotikum nebo jejich farmaceutické přípravky mohou být přímo injektovány 35 nebo podávány do abscesu, orgánové dutiny nebo kloubů. Parenterální podávání zahrnuje subkutánní, intravenózní, intramuskulární, intraartikulární, intra-synoviální, cisternální, intratheciální, intrahepatické, intralesionální a intrakraniální injekce nebo infuze.

V preferovaném provedení se daptomycin nebo jiný lipopeptid podává intravenózně, subkutánně 40 nebo orálně.

Způsob léčení zde popsáný může být použit pro léčení pacientů majících bakteriální infekce, které jsou způsobené nebo zhoršené působením libovolného typu gram-pozitivních baktérií. V preferovaném provedení se čištěný daptomycin, daptomycinu příbuzný lipopeptid, jiný lipopeptid 45 nebo farmaceutický přípravek je obsahující podává pacientovi v rámci způsobu léčení podle tohoto vynálezu. V dalším provedení mohou být bakteriální infekce způsobené nebo zhoršené působením baktérií zahrnujících (bez omezení) stafylokoky vnímavé a stafylokoky rezistentní na methicilin (včetně *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus* a stafylokoky negativní na koagulázu), *Staphylococcus aureus* středně vnímavý na glykopeptid (GISA), streptokoky vnímavé a rezistentní k penicilinu (včetně *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus sangius* a *Streptococci* skupiny C, *Streptococci* skupiny G a viridans streptococci), enterokoky (včetně kmenů vnímavých a rezistentních k vankomycinu jako jsou *Enterococcus faecalis* and 55 *Enterococcus faecium*), *Clostridium difficile*, *Clostridium clostridiiforme*, *Clostridium innocu-*

um, *Clostridium perfringers*, *Clostridium ramosum*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium jeikeium*, *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium aerofaciens*, *Eubacterium lentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lctobacillus plantarum*, *Lactocoecus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus*, *Peptostrepiococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Peptostreptococcus magnus*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus productus*, *Propionibacterium acnes* a *flectinomyces* spp.

Protibakteriální aktivita daptomycinu proti klasicky „rezistentním“ kmenům je srovnatelná s aktivitou proti klasicky „vnímavým“ kmenům při in vitro experimentech. Kromě toho, hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro daptomycin vůči vnímavým kmenům jsou typicky čtyřikrát nižší než aktivita vankomycinu. V preferovaném provedení se tedy čištěný daptomycin, daptomycinu příbuzné lipopeptidové antibiotikum nebo jejich farmaceutické přípravky podávají pacientům, kteří vykazují bakteriální infekce, které jsou rezistentní vůči antibiotikům včetně vankomycinu. Kromě toho, na rozdíl od glykopeptidových antibiotik, daptomycin vykazuje rychlou koncentračně závislou baktericidní aktivitu proti gram–pozitivním organismům. V preferovaném způsobu léčení zde popsaném se tedy čištěný daptomycin, lipopeptidové antibiotikum nebo jejich farmaceutické přípravky podávají pacientům vyžadujícím rychlou terapii pomocí antibiotik.

Způsob léčení zde popsaný může být použit pro gram–pozitivní bakteriální infekce libovolných tělních orgánů nebo tkání. Tyto orgány nebo tkáně zahrnují (bez omezení) skeletální svaly, kůži, krevní oběh, ledviny, srdce, žaludek a kosti. Způsob léčení podle tohoto vynálezu může být použit pro léčení (bez omezení) kůže a infekcí měkkých tkání, bakteriémie a infekcí vylučovacího traktu. Způsob léčení zde popsaný může být použit pro léčení infekcí dýchacího traktu vzniklých nákazou ve společnosti včetně (bez omezení) otitis media, sinusitis, chronické bronchitidy a pneumonie, způsobené lékově–rezistentními *Streptococcus pneumoniae* nebo *Haemophilus influenzae*. Způsob léčení zde popsaný může být použit pro léčení smíšených infekcí zahrnujících různé druhy gram–pozitivních bakterií nebo zahrnujících jak gram–pozitivní tak i gram–negativní bakterie, včetně aerobních, kaprofilních nebo anaerobních bakterií. Tyto typy infekcí zahrnují intra–abdominální infekce a porodnicko–gynekologické infekce. Způsoby léčení podle tohoto vynálezu mohou být použity v sestupné terapii nemocničních infekcí, včetně (bez omezení) pneumonie, intra–abdominální sepse, infekcí kůže a měkkých tkání a infekcí kostí a kloubů.

Způsob léčení zde popsaný může být také použit pro léčení infekcí zahrnujících (bez omezení) endokarditis, nefritis, septickou arthritid a osteomyelitis. V preferovaném provedení může být libovolná výše popsaná nemoc léčená s využitím čištěného daptomycinu, lipopeptidového antibiotika nebo jejich farmaceutického přípravku. Dále mohou být nemoci léčeny s využitím daptomycinových nebo lipopeptidových antibiotik buď v monomerní nebo micelární formě.

Daptomycin, daptomycinu příbuzný lipopeptid nebo jiný lipopeptid mohou být také podávány v dietě nebo výživě pacientů nebo zvířat. Jsou-li podávány jako část celkového dietního příjmu, může být množství daptomycinu nebo jiného lipopeptidu menší než 1 % hmotnosti potravy a s výhodou ne více než 0,5 % hmotnosti. Dietou zvířat mohou být normální potraviny, do nichž může být daptomycin nebo lipopeptid přidán nebo zamíchán.

Způsob léčení zde popsaný může být prováděn při současném podávání jednoho nebo více protihoubových činidel a/nebo jednoho nebo více antibiotik jiných než daptomycin nebo dalších lipopeptidových antibiotik. Současné podávání protihoubových činidel a antibiotik jiných než daptomycin nebo jiných lipopeptidových antibiotik může být užitečné při léčení smíšených infekcí, jako jsou infekce způsobené gram–pozitivními bakteriemi, infekce způsobené gram–pozitivními a gram–negativními bakteriemi nebo infekce způsobené jak bakteriemi, tak i houbami. Kromě toho, daptomycin nebo jiné lipopeptidové antibiotikum může zlepšit profil toxicity jednoho nebo více současně podávaných antibiotik. Bylo prokázáno, že podávání daptomycinu a aminoglykosidu může zlepšit renální toxicitu způsobenou aminoglykosidem. V preferovaném provedení tohoto vynálezu může být antibiotikum a/nebo protihoubové činidlo podáváno společně s čištěným

daptomycinem, jiným lipopeptidovým antibiotikem nebo s farmaceutickými přípravky zahrnujícími čištěný daptomycin nebo jiné lipopeptidové antibiotikum.

5 Společné podávání jiného terapeutického činidla s daptomycinem nebo jiným lipopeptidovým antibiotikem může být prováděno s využitím daptomycinu nebo lipopeptidového antibiotika buď v monomerní nebo v micelární formě. Jak bylo diskutováno výše, sférické lipopeptidové micely mohou být použity k rozpuštění činidla, které vykazuje nízkou rozpustnost ve vodě. Kromě toho, lipopeptidové liposomy mohou být použity k uzavření činidla, která jsou rozpustná ve vodných médiích uvnitř liposomu. Následováním popisu vynálezu bude odborník v oboru schopen připravit micely obsahující terapeutická činidla, jako jsou protizánětlivá činidla, protihoubová činidla nebo jiná antibiotika.

15 Antibakteriální činidla a jejich třídy, které mohou být podávány společně s daptomycinem nebo jinými lipopeptidovými antibiotiky zahrnují (bez omezení) peniciliny a příbuzná léčiva, karbapenemy, cefalosporiny a příbuzná léčiva, aminoglycosidy, bacitracin, gramicidin, mupirocin, chloramfenikol, thiamfenikol, natrium-fusidat, lincomycin, clindamycin, makrolidy, novobiocin, polymyciny, rifamyciny, spektinomycin, tetracykliny, vankomycin, teikoplanin, streptograminy, činidla proti listové kyselině včetně sulfonamidů, trimethoprim a jeho kombinace a pyrimethamin, syntetické antibakteriální činidla včetně nitrofuránů, methenamin mandelát a methenamin hippurát, nitroimidazoly, chinolony, fluorochinolony, isoniazid, ethambutol, pyrazinamid, para-aminosalicylová kyselina (PAS), cykloserin, capreomycin, ethionamid, prothionamid, thiace-
20 zon, viomycin, eveminomycin, glykopeptid, glycylicline, ketolidy, oxazolidinon; imipenen, amikacin, netilmicin, fosfomycin, gentamicin, ceftriaxon, Ziracin, LY 333328, CL 331002, HMR 3647, Linezolid, Synercid, Aztreonam a Metroimidazol, Epiroprim, OCA-983, GV-143253, Sanfetrinm sodium, CS-834, Biapenem, A-99058.1, A-165600, A-179796, KA 159, Dynemicin A, DX8739, DU 6681; Cefluprenam, ER 35786, Cefoselis, Sanfetrinem celexetil, HGP-31, Cefpirom, Hlv-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, Cyclothialidine,
30 Sch-40832, SEP 132613, micacocidin A, SB-275833, SR-15402, SIJN A0026, TOC 39, carumonam, Cefozopran, Cefetamet pivoxil a T 3811.

V preferovaném provedení zde popsaném, antibakteriální činidlo, které může být podáváno společně s daptomycinem, zahrnuje (bez omezení) imipenen, amikacin, netilmicin, fosfomycin, gentamicin, ceftriaxon, teicoplanin, Ziracin, LY 333328, CL 331002, HMR 3647, Linezolid, Synercid, Aztreonam a Metronidazol.

40 Antibakteriální činidlo, které může být podáváno společně s daptomycinem nebo jiným lipopeptidovým antibiotikem zahrnuje (bez omezení) Caspofungen, Voriconazol, Sertaconazol, IB-367, FK-463, LY-303366, Sch-56592, Sitaflaxacin, DB-289 polyeny, jako třeba Amphotericin, Nystatin, Primaricin; azoly, jako třeba Fluconazol, Itraconazol a Ketoconazol; allylaminy, jako třeba Naftifin a Terbinafin; a anti-metabolity jako třeba Flucytosin. Další protihoubová činidla zahrnují (bez omezení) ta, která jsou popsána ve Foster et al., Drug Discovery Today 5: 25-32 (2000), zahrnutém zde jako reference. Foster et al. popisuje protihoubová činidla zahrnující Co-
45 ryneccandin, Mer-WF3010, Fusacandins, Artrichitin/LL 15G256γ, Sordarins, Cispentacin, Azoxybacillin, Aureobasidin a Khafrefungin.

Daptomycin nebo jiné lipopeptidové antibiotikum, včetně daptomycinu-příbuzných lipopeptidů, mohou být podávány až do vymizení bakteriální infekce nebo do jejího zredukování. V jednom provedení zde popsaném je daptomycin nebo jiný lipopeptid podáván po dobu od 3 dnů do 6 měsíců. V preferovaném provedení se daptomycin nebo jiný lipopeptid podává 7 až 56 dní. V ještě preferovanějším tohoto vynálezu se daptomycin nebo jiný lipopeptid podává 7 až 28 dnů. V ještě preferovanějším provedení se daptomycin nebo jiný lipopeptid podává 7 až 14 dní. Daptomycin nebo jiný lipopeptid může být podáván po kratší nebo delší dobu, je-li to potřeba.

Za účelem plného pochopení tohoto vynálezu následují příklady provedení tohoto vynálezu. Tyto příklady jsou uvedeny za účelem ilustrace a v žádném případě nejsou zamýšleny jako omezující pro rozsah tohoto vynálezu.

5

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

10

Fermentace kultury *S. roseosporus* NRRL kmen 15998 byla prováděna za podmínek kontrolovaného přísunu dekanové kyseliny při koncentracích optimalizovaných pro produkci antibiotika, přičemž byl minimalizován vznik kontaminantů. Zbytková koncentrace kyseliny dekanové byla měřena pomocí plynové chromatografie a cílová zbytková koncentrace byla 10 ppm dekanové kyseliny od nastartování indukce až do sběru (přibližně 30 h). Centrifugace kultury a následná analýza vyčěrené kapaliny bylo použito pro měření produkce daptomycinu pomocí HPLC. Titr sebrané kapaliny byl typicky mezi 2,1 a 2,6 g na litr fermentační kapaliny.

Fermentace byla zpracována buď mikrofiltrací s využitím Pall-Sep nebo pomocí průmyslové centrifugy a hloubkového filtru. Vyčěřený roztok byl aplikován na anion-výměnnou pryskyřici, Mitsubishi FP-DA 13, promyt 30 mM NaCl při pH 6,5 a eluován 300 mM NaCl při 6,0 až 6,5. Alternativně, FP-DA 13 kolona byla promyta 60 mM NaCl při pH 6,5 a eluována 500 mM NaCl při pH 6,0 až 6,5. Eluát byl aplikován na HIC pryskyřici, HP-20ss, promyt 30% acetonitrilem a eluován 35% acetonitrilem při pH 4,0 až 5,0. Alternativně, HIC pryskyřice byla promyta 45% isopropylalkoholem a eluována 55 až 60% isopropylalkoholem. Eluát byl aplikován na FP-DA 13 pryskyřici a byl promyt jako předtím. Konečný anion-výměnný krok redukuje rozpouštědlo o jednu třetinu nebo více. Byla provedena reverzní osmotická diafiltrace a zkoncentrování při pH 1,5 až 2,5 s využitím 0,2 µm filtru a daptomycinový preparát byl zmražen. Finální reverzní osmotická diafiltrace byla prováděna s vodou pro injekce (WFI) kvůli vymytí daptomycinu a kvůli nastavení jeho koncentrace před plněním ve sterilních podmínkách. Víálky nebo velké objemy daptomycinu byly poté lyofilizovány.

30

Příklad 2

35

Daptomycin byl vyroben ve fermentační kultuře *S. roseosporus* a částečně čištěný daptomycin (9,9 kg) byl čištěn pomocí mikrofiltrace z 5500 l fermentační kapaliny pomocí metody popsané v United States patentu 4 885 243. Částečně čištěný daptomycin byl dále čištěn pomocí metody popsané v Pat US 4 874 843 a vznikl daptomycinový preparát o čistotě 91 %. Daptomycinový preparát byl aplikován na Poros P150 anion-výměnnou pryskyřici (PE Biosystems) v Tris pufru pH 7,0 obsahujícím 6M močovinu a byl ponechán navázat se na pryskyřici. Pryskyřice byla promyta se třemi objemy pufru před započítím NaCl gradientu v tom samém pufru.

40

Alternativně, kontaminanty mohou být účinně odstraněny z kolony s fixní úrovní 30 mM NaCl. K eluování čištěného daptomycinu z pryskyřice došlo při koncentraci přibližně 300 mM NaCl během 0 na 1000 mM NaCl gradientu. Daptomycin eluovaný z kolony měl čistotu vyšší než 99 % (měřeno HPLC „první“ metodou). Čištěný daptomycin obsahoval pouze jednu detekovatelnou daptomycinovou nečistotu. Anhydro-daptomycin a β-izomer byly nedetekovatelné (méně než 0,01 % kontaminace). Koncentrace neidentifikovaných nečistot byla vyšší než 0,1 % a nižší než 0,5 %.

50

Příklad 3

Daptomycinový preparát s čistotou 91 % byl připraven podle popisu v Příkladu 2. Produkt byl aplikován na Poros D50 anion-výměnnou pryskyřici (PE Biosystems) v acetátovém pufru pH 7,0 obsahujícím 6M močovinu. Poros D50 pryskyřice byla promyta a eluována stejným způsobem jako bylo popsáno v Příkladu 2. Daptomycin eluovaný z kolony měl čistotu 96,92 % (měřeno HPLC „druhou“ metodou). Produkt podle tohoto vynálezu obsahoval pouze dvě z počátečních čtrnácti nečistot (méně než 0,5 % kontaminantů). Anhydro-daptomycin nemohl být detekován v čištěném daptomycinovém preparátu (méně než 0,01 % kontaminace a s přesným obsahem méně než 0,05 %).

Příklad 4

Fermentační kapalina obsahující daptomycin byla vyrobena podle popisu v Příkladu 2. Fermentační kapalina byla vyčereňena mikrofiltrací. Vyčereňený produkt byl extrahován 20% n-butanolem nebo iso-butanolem při pH 4,5 (jedna část butanolu na čtyři části vyčereňeného roztoku). Byla provedena následná extrakce vyčereňeného roztoku za vzniku částečně čištěného daptomycinu s čistotou vyšší než 90 % celkového obsahu daptomycinu ve vyčereňeném roztoku. Daptomycin byl získán z butanolové fáze přidávkem vodného pufru o pH 6,5 v objemu rovném jedné polovině nebo více objemu butanolu kvůli extrakci daptomycinu z butanolové fáze do fáze vodné. Butanolvý extrakční krok vedl k částečně čištěnému daptomycinovému preparátu, který byl čištěný pětkrát a zkoncentrován desetkrát vzhledem k vyčereňenému roztoku.

Vodný daptomycinový preparát byl čištěn metodou popsanou v patentu US 4 874 843, což vedlo k daptomycinu o 91% čistotě. Daptomycin obsahoval čtrnáct nečistot. Produkt byl aplikován na Poros D50 pryskyřici v Tris pufru při pH 7,0 obsahujícím 6M močovinu. Pryskyřice byla promyta s třemi objemy Tris pufru při pH 7,0 obsahujícím 6M močovinu před zahájením NaCl gradientu od 0 do 1000 mM ve stejném pufru. K eluování čištěného daptomycinu z pryskyřice došlo při přibližně 300 mM NaCl. Daptomycin měl 98% čistotu (měřeno „druhou“ HPLC metodou).

Příklad 5

Daptomycin byl fermentován podle popisu v Příkladu 2. 5500 l fermentační kapaliny obsahovalo 13 kg daptomycinu. Fermentační kapalina byla přímo extrahována s 20% n-butanolem při pH 4,5, což vedlo k převedení daptomycinu do butanolu. Byla provedena opakovaná extrakce fermentační kapaliny s butanolem za vzniku daptomycinu o celkové čistotě vyšší než 90 % ve fermentační kapalině. Butanolová fáze byla extrahována s vodným acetátovým puffrem při pH 6,5 což vedlo k daptomycinu pětinasobně čištěnému (35%) a desetinásobně zkoncentrovanému vzhledem k fermentační kapalině. Vodný daptomycin byl mikrofiltrován metodou popsanou v United States patentu 4 885 243, a poté čištěn pomocí metody popsané v Pat. US 4 874 843. Tato metoda vedla k daptomycinu o čistotě přibližně 91 %. Daptomycin obsahoval 14 nečistot pomocí HPLC metody používané v současném stavu techniky. Produkt byl aplikován na kolonu s pryskyřici Poros D50 v acetátovém pufru při pH 7,0 obsahujícím 6M močovinu. Promytí a eluování pryskyřice bylo provedeno podle popisu v Příkladu 2. Produkt chromatografického kroku měl přibližně 98 až 99% čistotu (měřeno „druhou“ HPLC metodou).

Příklad 6

Daptomycin byl vyroben fermentací kultury *S. roseosporus* s tou výjimkou, že byla použita snížená zbytková koncentrace živné kyseliny dekanové, za účelem zlepšení kvality fermentace na přibližně 10% čistotu pro vyčereňení pomocí mikrofiltrace nebo centrifugace. Koncentrace dekanové kyseliny byla monitorována a periodicky adjustována za účelem udržení zbytkové koncentrace

dekanové kyseliny na úrovni nižší než 50 ppm a s výhodou mezi 1 až 10 ppm během fermentace. Fermentační kapalina byla mikrofiltrována metodou popsanou v United States patentu 4 885 243 za vzniku 12,1 kg částečně čištěného daptomycinu z 5500 l fermentační kapaliny. Vyčištěný fermentační kapalina byla navázána na anion-výměnnou pryskyřici FP-DA 13 (Mitsubishi) v acetátovém pufru při neutrálním pH, promyta s acetátovým pufrům obsahujícím 30 mM NaCl a následně eluována s acetátovým pufrům 300 mM NaCl. Tento krok s anion-výměnnou pryskyřicí vedl k daptomycinu s čistotou vyšší než 70 %. Tento částečně čištěný daptomycin byl dále čištěn pomocí metody popsané v United States patentu 4 874 843 s touto modifikací, že byla použita pryskyřice HP-20ss. Částečně čištěný daptomycin byl navázán na pryskyřici HP-20ss v acetátovém pufru obsahujícím 10 % acetonitrilu, byl promyt acetátovým pufrům obsahujícím 30% acetonitril a byl eluován 40% acetonitrilem v acetátovém pufru, což vedlo k daptomycinu s čistotou od asi 94 do 96 % (měřenou „druhou“ HPLC metodou). Produkt byl podroben anion-výměnné chromatografii s modifikovaným pufrům s využitím pryskyřice Poros D50 podle popisu v Příkladu 5. Daptomycin měl čistotu vyšší než 99 % a obsahoval pouze dvě ze čtrnácti nečistot vyrobených metodou známou v současném stavu techniky.

Příklad 7

Daptomycinový preparát s čistotou 93 % byl připraven podle popisu v Příkladu 2. Produkt byl aplikován na pryskyřici Poros P150 (PE Biosystems) v acetátovém pufru pH 6,0 obsahujícím 2M močovinu. Pryskyřice Poros P150 byla promyta trojnásobkem objemu pufru. Daptomycin byl eluován z pryskyřice s využitím 0 až 400 mM NaCl gradientu v acetátovém pufru pH 6,0, obsahujícím 2M močovinu. Daptomycin byl eluován mezi 150 a 300 mM NaCl. Daptomycin eluovaný z kolony měl čistotu 99,0 až 99,5 % (měřeno „první“ HPLC metodou). Daptomycin obsahoval stopová množství čtyř nečistot, jejichž obsah byl menší než 1 % celkového daptomycinu. V čištěném daptomycinovém preparátu anhydrodaptomycin nemohl být detekován (méně než 0,02 % kontaminace).

Příklad 8

Daptomycinový preparát s čistotou 93 % byl připraven podle popisu v Příkladu 2. Produkt byl aplikován na pryskyřici Poros P150 (PE Biosystems) v acetátovém pufru pH 6,0, obsahujícím 2M močovinu. Kolona byla promyta šestinásobným objemem 60 mM NaCl v acetátovém pufru pH 6,0, obsahujícím 2M močovinu („promývací pufr“). Promývací pufr se může pohybovat v rozmezí od 50 do 75 mM NaCl. Promytí odstranilo v podstatě všechny anhydro-daptomycin. Daptomycin byl eluován šestnácti objemy 250 mM NaCl v acetátovém pufru pH 6,0, obsahujícím 2M močovinu. Čistota daptomycinu je 98,5 až 99,5 % (měřeno „první“ HPLC metodou).

Příklad 9

Daptomycinový preparát popsaný v Příkladu 2 byl připraven s využitím metody, která významně snížila koncentraci rozpouštědla požadovaného pro provedení HP-20ss chromatografie. Nečekaně, rozpouštědlo pro eluování daptomycinu, 40% acetonitril nebo 55 až 60% isopropylalkohol, bylo sníženo na 12% a 25%, když HP-20ss chromatografie byla prováděna při neutrálním pH raději než při kyselém pH jak bylo popsáno v United States patentu 4 874 843. V preferovaném provedení tohoto vynálezu mohou být použity změny pH k recyklování HP-20ss pryskyřice bez odstranění rozpouštědla.

Po eluování z FP-DA13 kolony při pH 6,5–7,0 byl daptomycin navázán na ekvilibrovanou kolonu HP-20ss, jako třeba na kolonu ekvilibrovanou v 60 mM acetátu při pH 6,6. Kolona byla promyta pěti až osmi objemy (objem sloupce pryskyřice = CBV) promývacího pufru. Příkladem promývacího pufru je 5% isopropylalkohol/60mM acetát při pH 6,6. Daptomycin byl eluován

z kolony elučním pufrům. Příkladem elučního pufru jsou dva až tři objemy CBV 25% isopropylalkohol/60 mM acetát při pH 6,6. Kolona byla promyta vymývacím pufrům. V jednom provedení tohoto vynálezu byla kolona vymyta jedním CBV 40% isopropylalkohol/60 mM acetát při pH 6,6 až 7,0. Daptomycinový roztok byl adjustován na pH 3,5 až 4,0 a byl znovu navázán na kolonu HP-20ss pryskyřice za účelem zvýšení čistoty. V jednom provedení tohoto vynálezu je daptomycin, eluovaný z kolony HP-20ss pryskyřice při pH 6,5, adjustován na pH 3,5 s využitím 0,25M fosforečné kyseliny. Daptomycinový roztok byl znovu navázán na dříve vymytou kolonu HP-20ss, která byla ekvilibrována v 60 mM acetátu při pH 3,5. Kolona byla promyta s pH adjustačním pufrům např. o pH 6,5. Kolona byla promyta s pH adjustačním pufrům např. o pH 6,5. Příklad pH adjustačního pufru je pět až osm CBV 5% isopropylalkohol/60 mM acetát při pH 6,6. Daptomycin byl eluován elučním pufrům a může být dále čištěn pomocí anion-výměnné chromatografie nebo jiné čisticí metody, pokud je to vyžadováno. HP-20ss kolona byla vymyta vymývacím pufrům a vyčištěna před opětovným použitím. Příklad čisticího procesu zahrnuje promytí třemi objemy (CBV) 0,5 M NaOH, promytí jedním objemem vody a poté promytí 0,25M fosforečnou kyselinou před ekvilibrací. Kolona může být uskladněna v 0,5 M NaOH.

Příklad 10

Velký daptomycinový preparát připravený podle popisu v Příkladu 2 byl charakterizován pomocí semi-preparativní HPLC a charakterizovány pomocí kapalinové chromatografie/hmotnostní spektroskopie (LC/MS) s využitím jak pozitivního tak i negativního módu. Profil nečistot velkého daptomycinového preparátu před chromatografií na anion-výměnné pryskyřici Poros P150 je uveden v Tabulce 3 a chromatogram velkého daptomycinového preparátu je uveden na Obrázku 12.

Tabulka 3

Identifikační číslo nečistoty	Retenční čas	Pozorovaná molekulární hmotnost	Lilly identifikační číslo	Cubist identifikační číslo	% celkové plochy pomocí 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		Neznámý-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%
Daptomycin	16.68	1620	LY146032	CB-109187	>90%
9	17.92	874		Neznámý-2	<0.5%, >0.1%
10	19.57	1810		Neznámý-3	<0.5%, >0.1%
11	19.57	1635		Neznámý-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

Nečistota 1 (CB-131012), která eluuje přibližně při 7,96 min (molekulární hmotnost: 1638). Předpokládá se, že jde o produkt hydrolyzy laktonu daptomycinu (Obrázek 4). Zdá se, že výsled-

ky jsou v soulase s LY212218, identifikovaném dříve Lilly jako derivát daptomycinu s otevřeným decylovým kruhem.

5 *Nečistota 2* (CB–131011), která eluuje přibližně při 9,11 min (molekulární hmotnost: 1638). Předpokládá se, že jde také o produkt hydrolyzy laktonu β -izomeru daptomycinu (Obrázek 5).

10 *Nečistota 3* (CB–131008), která eluuje přibližně při 11,54 min (molekulární hmotnost: 745). Předpokládá se, že jde také o lineární lipopeptid skládající se z řetězce pěti aminokyselin obsahujícího tryptofan, asparagin, aspartát, threonin a glycin s řetězcem dekanové kyseliny (Obrázek 6). Zdá se, že výsledky jsou v soulase s LY213928, identifikovaném dříve Lilly.

15 *Nečistota 4* (CB–131006), která eluuje přibližně při 12,28 min (molekulární hmotnost: 1624). Předpokládá se, že jde o oxidovaný analog daptomycinu, ve kterém byla aminokyselina tryptofan oxidována na kyanurovou kyselinu (Obrázek 7).

Nečistota 5, která eluuje přibližně při 13,10 min (molekulární hmotnost: 1618). Její struktura zatím nebyla určena.

20 *Nečistota 6* (CB–130989) a *Nečistota 7* (CB–131005), které společně elují přibližně při 14,43 min. Zdá se, že CB–130989 (MW: 587) je shodná s LY213827, lineárním lipopeptidem skládajícím se z řetězce tří aminokyselin obsahujícího tryptofan, asparagin a aspartát, s řetězcem dekanové kyseliny (Obrázek 8), jak bylo dříve identifikováno Lilly. CB–131005 (molekulární hmotnost: 1606) odpovídá daptomycinovému analogu, ve kterém dekanová kyselina postrádá jednu methylovou skupinu (Obrázek 9).

25 *Nečistota 8* (CB–131010), která eluuje přibližně při 15,10 min (molekulární hmotnost: 1620) se shoduje s LY213846 (β -izomer) jak bylo dříve identifikováno Lilly (Obrázek 2) Koncentrace β -izomeru je vyšší než 1 %.

30 *Nečistota 9*, která eluuje přibližně při 17,92 min (molekulární hmotnost: 874). Její struktura zatím nebyla určena.

Nečistoty 10 a 11, která společně elují přibližně při 19,57. Jejich struktura zatím nebyla určena.

35 *Nečistota 12* (CB–131009), která eluuje přibližně při 20,93 min (molekulární hmotnost: 859). Předpokládá se, že jde o lineární lipopeptid skládající se z řetězce šesti aminokyselin obsahujícího tryptofan, asparagin, aspartát, threonin, glycin a ornithin, s řetězcem dekanové kyseliny (Obrázek 10).

40 *Nečistota 13* (CB–130952), která eluuje přibližně při 23,11 min (molekulární hmotnost: 1602). Předpokládá se, že jde o anhydro–daptomycin (Obrázek 3) a zdá se, že jde o stejnou sloučeninu jako LY178480. Koncentrace anhydro–daptomycinu je vyšší než 1 %.

45 *Nečistota 14* (CB–131078), která eluuje přibližně při 24,53 min (molekulární hmotnost: 1634). Zdá se, že se shoduje s LY109208, který byl dříve identifikován Lilly jako daptomycinový analog obsahující jednu methylovou skupinu navíc v řetězci dekanové kyseliny (Obrázek 11).

50 Velký daptomycinový preparát může být čištěn na Poros P150 podle popisu v Příkladech 2 nebo 7 a 8 nebo může být čištěn na Poros D50 podle výše uvedeného popisu v Příkladech 3 až 5. Po čištění na Poros P150 podle popisu v Příkladu 2 vykazuje chromatogram (Obrázek 13), že čistota daptomycinu je vyšší než 99,0 %, přičemž koncentrace β -izomeru a anhydro–daptomycinu je pod detekčním limitem (méně než 0,05 % celkově). Je zde pouze jedna nečistota, která je přítomna v množství vyšším než 0,1 % ovšem zároveň méně než 0,5 %.

Příklad 11

Fermentace kultury *S. roseosporus* NRRL kmen 15998 byla prováděna za podmínek kontrolovaného přísunu dekanové kyseliny při koncentracích optimalizovaných pro produkci antibiotika, přičemž byl minimalizován vznik kontaminantů. Zbytková koncentrace kyseliny dekanové byla měřena pomocí plynové chromatografie a cílová zbytková koncentrace byla 10 ppm dekanové kyseliny od nastartování indukce až do sběru (přibližně 30 h). Centrifugace kultury a následná analýza vyčištěné kapaliny bylo použito pro měření produkce daptomycinu pomocí HPLC. Titr sebrané kapaliny byl typicky mezi 1,0 a 3,0 g na litr fermentační kapaliny.

Fermentace byla zpracována buď mikrofiltrací s využitím Pall-Sep nebo pomocí průmyslové centrifugy a hloubkového filtru. Vyčištěný roztok byl aplikován na anion-výměnnou pryskyřici, Mitsubishi FP-DA 13, promyt 30 mM NaCl při pH 6,5 a eluován 300 mM NaCl při 6,0 až 6,5. Alternativně, FP-DA 13 kolona byla promyta 60 mM NaCl při pH 6,5 a eluována 500 mM NaCl při pH 6,0 až 6,5. pH bylo adjustováno na 3,0 až 4,8 a teplota byla nastavena na 2 až 15 °C. Za těchto okolností tvoří daptomycin micely. Micelární daptomycinový roztok byl čištěn promýváním micelárního preparátu zatímco byl preparát zachycen na ultrafiltru s využitím 10 000 NMW filtru (AG Technology Corp. UF duté vlákno nebo ekvivalent) v libovolné konfiguraci. Daptomycinové micely byly zachyceny na filtru, ovšem velké množství nečistot bylo eliminováno, protože prošly přes 10 000 NMW filtr. Ultrafiltrace daptomycinových micel zvýšila čistotu daptomycinu ze 40 % na přibližně 80 % nebo vyšší.

Eluát byl aplikován na HIC pryskyřici, HP-20ss, promyt 30% acetonitrilem a eluován 35% acetonitrilem při pH 4,0 až 5,0. Alternativně, HIC pryskyřice byla promyta 20 až 30% isopropylalkoholem a eluována 30 až 40% isopropylalkoholem při pH 3,5 až 6,5. Za těchto podmínek zvýšeného množství rozpouštědla a vyšší hodnoty pH 6,0 až 7,5 se daptomycin vrací do monomerního nemicelárního stavu. Eluát byl aplikován na FP-DA 13 pryskyřici a byl promyt jako předtím. Konečný anion-výměnný krok redukoval rozpouštědlo o jednu třetinu nebo více. Byla provedena reverzní osmotická diafiltrace a zkoncentrování při pH 1,5 až 2,5 s využitím 0,2 µm filtru a daptomycinový preparát byl zmrazen. Finální reverzní osmotická diafiltrace byla prováděna s vodou pro injekce (WFI) kvůli vymytí daptomycinu a kvůli nastavení jeho koncentrace před plněním ve sterilních podmínkách. Víálky nebo velké objemy daptomycinu byly poté lyofilizovány.

Příklad 12

Lyofilizovaný daptomycin čištěný podle popisu v libovolných výše uvedených příkladech, jako třeba v Příkladu 11, byl rekonstituován ve fyziologickém solném roztoku (přibližně 140 mM NaCl) při pH 4,0 až 5,0. Za těchto okolností je daptomycin přítomný ve formě micel a může být použit pro injekce nebo pro intravenózní, parenterální, orální nebo místní podávání.

Příklad 13

Daptomycin byl vyroben fermentací a fermentační kapalina byla vyčištěna mikrofiltrací podle popisu v Příkladu 11. Vyčištěná kapalina byla aplikována na anion-výměnnou pryskyřici, Mitsubishi FP-DA 13, promyta 30 mM NaCl při pH 6,5 a eluována 300 mM NaCl při pH 6,0 až 6,5 za vzniku daptomycinového preparátu o čistotě přibližně 40 %. Eluát byl adjustován na pH 3,5 pomocí ředěné kyseliny fosforečné, takže prakticky všechen daptomycin tvořil micely. Micelární přípravek byl nanesen na 10 000 NMW ultrafiltrační membránu. Daptomycinový preparát byl promyt 30 mM acetátu sodného při pH 3,5 a teplotě do 15 °C. Redukce objemu a promytí snížilo koncentraci kontaminantů, což vedlo k čistotě daptomycinového preparátu o čistotě 85 %. Daptomycinový preparát může být dále čištěn s využitím libovolné výše popsané metody.

Příklad 14

Daptomycin byl vyroben fermentací a fermentační kapalina byla vyčerena mikrofiltrací a frakci-
 onací na FP-DA 13 podle popisu v Příkladu 11. Eluát byl adjustován na pH 3,5 pomocí ředěné
 5 kyseliny fosforečné tak, že prakticky všechen daptomycin tvořil micely. Micelární přípravek byl
 nanesen na 10 000 NMW ultrafiltrační membránu. Daptomycinový preparát byl promyt 30 mM
 acetátu sodného při pH 3,5 a teplotě od 15 °C. Redukce objemu a promytí snížilo koncentraci
 kontaminantů, což vedlo k čistotě daptomycinového preparátu o čistotě 80 až 90 %. Daptomyci-
 nový preparát může být dále čištěn s využitím libovolné výše popsané metody.

10

Příklad 15

Daptomycin byl vyroben fermentací a fermentační kapalina byla vyčerena mikrofiltrací podle
 15 popisu v Příkladu 11. Preparát byl čištěn pomocí chromatografie s hydrofobními interakcemi
 podle popisu v United States patentu 4 874 843, který je zde zahrnutý jako reference. Čistota
 daptomycinu byla 93 % s viditelnými nečistotami na HPLC chromatogramu a měřitelným pyro-
 genem. Produkt byl naředěn s vodou a jeho pH bylo adjustováno na pH 6,5 s NaOH nebo jeho
 ekvivalentem. Daptomycinový přípravek byl zfiltrován přes 10 000 NMW ultrafiltrační membrá-
 20 nu. Za těchto okolností je daptomycin monomerní a prochází přes ultrafiltrační membránu.
 Vzniklý produkt vykazuje 93% čistotu, ovšem několik nečistot, které byly přítomny v množst-
 vích 0,1 až 0,2 %, bylo odstraněno ultrafiltrační membránou. Kromě toho byl redukován obsah
 pyrogeneru na nedetekovatelnou úroveň.

25

Příklad 16

Daptomycinový přípravek o čistotě 93 % byl připraven podle popisu v Příkladu 15. Daptomyci-
 nový přípravek byl převeden do micelárního stavu snížením pH na 4,7 pomocí HCl nebo ekviva-
 30 lentu a ochlazením daptomycinového přípravku na 2 až 5 °C. Produkt byl zkoncentrován ze 400 l
 na tři litry a na finální koncentraci přibližně 100 mg/ml pomocí filtrace na 10 000 NMW ultrafil-
 trační membráně. Za těchto okolností byl daptomycin zadržen membránou. To vedlo k velkému
 zvýšení daptomycinové koncentrace. Čistota byla přibližně 93 %.

35

Příklad 17

Daptomycinový preparát byl připraven podle popisu v Příkladu 16. Vialky byly naplněny
 s přibližně 250 mg daptomycinu a lyofilizovány. Daptomycin byl rekonstituován v 50 ml sterilní
 40 150 mM solance při pH 4,0 až 5,0 pro podávání lidem nebo zvířecím pacientům. Dávka dap-
 tomycinu, která má být podávána, bude záviset na druhu infekce, věku a hmotnosti pacienta a
 druhu zvířete. Při pH 4,0 až 5,0 bude daptomycin ve 150 mM solance přítomen v micelárním
 stavu, který je rozpustný a vhodný pro intravenózní, intramuskulární nebo parenterální podávání.
 Formulace bude minimalizovat lokální podráždění vzhledem k lipopeptidické povaze daptomyci-
 45 nu.

Příklad 18

Daptomycinové micely byly vyrobeny s využitím daptomycinu při koncentraci 1,0 mg/ml ve
 50 vodě při pH 4,0 při teplotě 25 °C. Velikost daptomycinových micel byla změřena s využitím
 Zetasizer™ (Malvern Instruments, Model 3000 HS). Rychlost počítání 36,3, typem cely byla kapi-
 lární cela, detekční úhel (deg) byl 90° a vlnová délka (nm) byla 633. Výsledky naznačují, že
 průměr micel byl 54 Å, což je asi dvakrát větší než je průměr monomerní daptomycinové mole-
 55 kuly. Viz Obrázek 18.

Všechny publikace a patentové přihlášky citované v tomto vynálezu jsou zde zahrnuty jako reference. Ačkoliv předložený vynález byl v některých detailech popsán pomocí ilustrací a příkladů pro lepší pochopení a srozumitelnost, odborníkovi v oboru bude zřejmé, že ve světle tohoto vynálezu mohou být provedeny určité změny a modifikace aniž bychom se vzdělili duchu a rozsahu
5
připojených nároků.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob čištění daptomycinu, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje kroky:

a) fermentace *Streptomyces roseosporus* s živnou kyselinou n-dekanovou za vzniku daptomycinu
15 ve fermentační kapalině;

b) vyčeření fermentační kapaliny;

c) podrobení fermentační kapaliny anion-výměnné chromatografii za vzniku obohaceného daptomycinového preparátu;

d) upravení pH obohaceného daptomycinového preparátu na hodnotu 2,5 až 5,0 použitím kyseliny za vzniku micel;
20

e) separace obohaceného daptomycinového preparátu získaného v kroku d) od nízkomolekulárních kontaminantů ultrafiltrací;

f) podrobení obohaceného daptomycinového preparátu chromatografii s hydrofobními interakcemi na pryskyřici HP-20ss za získání částečně vyčištěného daptomycinového preparátu, přičemž během chromatografie s hydrofobními interakcemi v kroku f) daptomycinové micely disociují při pH 6,0 až 7,5 na nemicelární monomery daptomycinu elucí 30 až 40% isopropylalkoholem při pH 3,5 až 6,5; a
25

g) podrobení částečně vyčištěného daptomycinového preparátu anion-výměnné chromatografii za získání vyčištěného daptomycinu.
30

2. Způsob čištění daptomycinu podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že živná n-dekanová kyselina v kroku a) je regulována tak, aby bylo během fermentace dosaženo reziduální koncentrace n-dekanové kyseliny ne vyšší než 50 ppm.

3. Způsob čištění daptomycinu podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že vyčeření v kroku b) zahrnuje filtraci nebo centrifugaci a hloubkovou filtraci.
35

4. Způsob čištění daptomycinu podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že anion-výměnná chromatografie v kroku c) se provádí na pryskyřici FP-DA 13.
40

5. Způsob čištění daptomycinu podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že anion-výměnná chromatografie v kroku g) se provádí na anion-výměnné pryskyřici FP-DA 13.

6. Způsob čištění daptomycinu podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že buď jeden nebo oba kroky c) nebo g) zahrnují použití kontinuálního solného gradientu nebo krokového solného gradientu.
45

7. Způsob čištění daptomycinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 nebo 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se provádí pomocí chromatografie s kontinuálním tokem nebo pomocí chromatografie s radiálním tokem.
50

8. Způsob čištění daptomycinu podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále zahrnuje krok filtrace a/nebo koncentrace daptomycinu.

9. Způsob čištění daptomycinu podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále zahrnuje krok depyrogenace daptomycinu.

5 10. Způsob čištění daptomycinu podle nároku 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále zahrnuje krok lyofilizace daptomycinu.

11. Způsob čištění daptomycinu podle nároku 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedená depyrogenace zahrnuje kroky:

10 i) pořízení daptomycinového roztoku za podmínek, při kterých je daptomycin v monomerním a nemicelárním stavu,

ii) filtrování daptomycinového roztoku za podmínek, při nichž daptomycin prochází filtrem, ale pyrogeny přes filtr neprocházejí,

iii) upravení daptomycinového roztoku prošlého filtrem tak, že daptomycin agreguje,

15 iv) filtrování daptomycinového roztoku za podmínek, při nichž daptomycin bude zůstávat na filtru, a

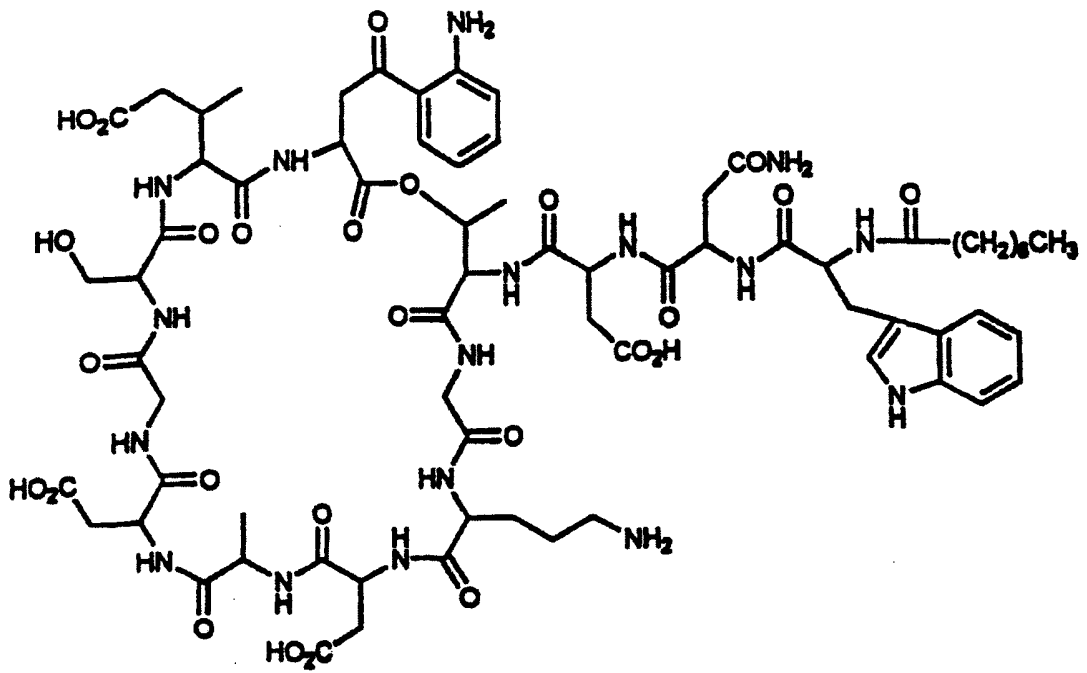
v) sebrání daptomycinu.

12. Způsob čištění daptomycinu podle nároku 11, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále zahrnuje krok lyofilizace daptomycinu.

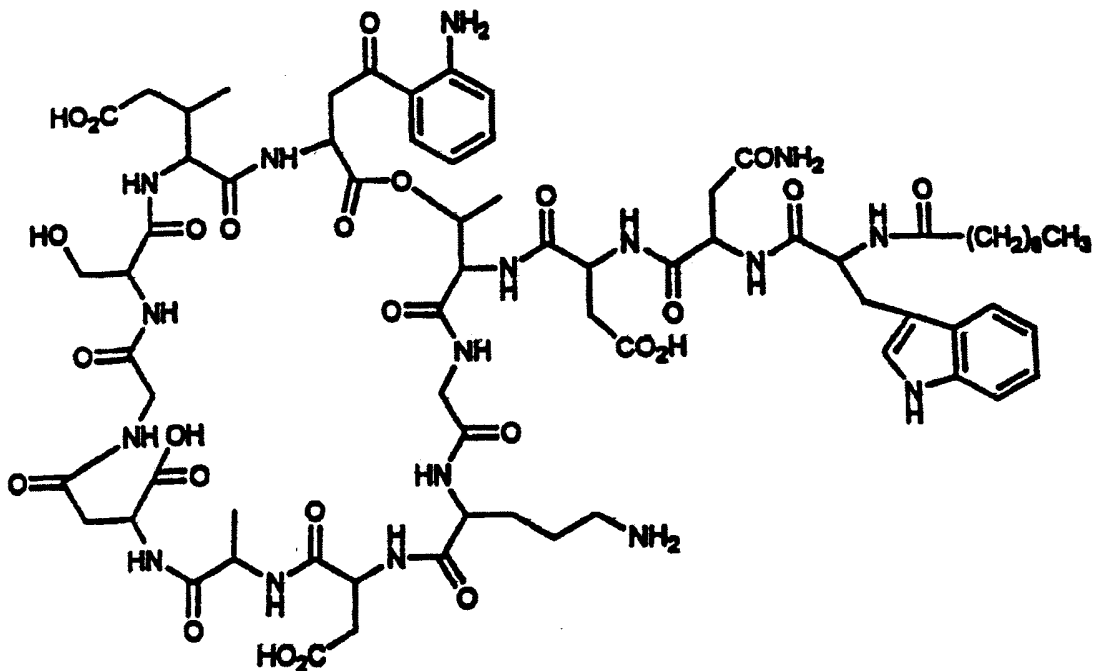
20

11 výkresů

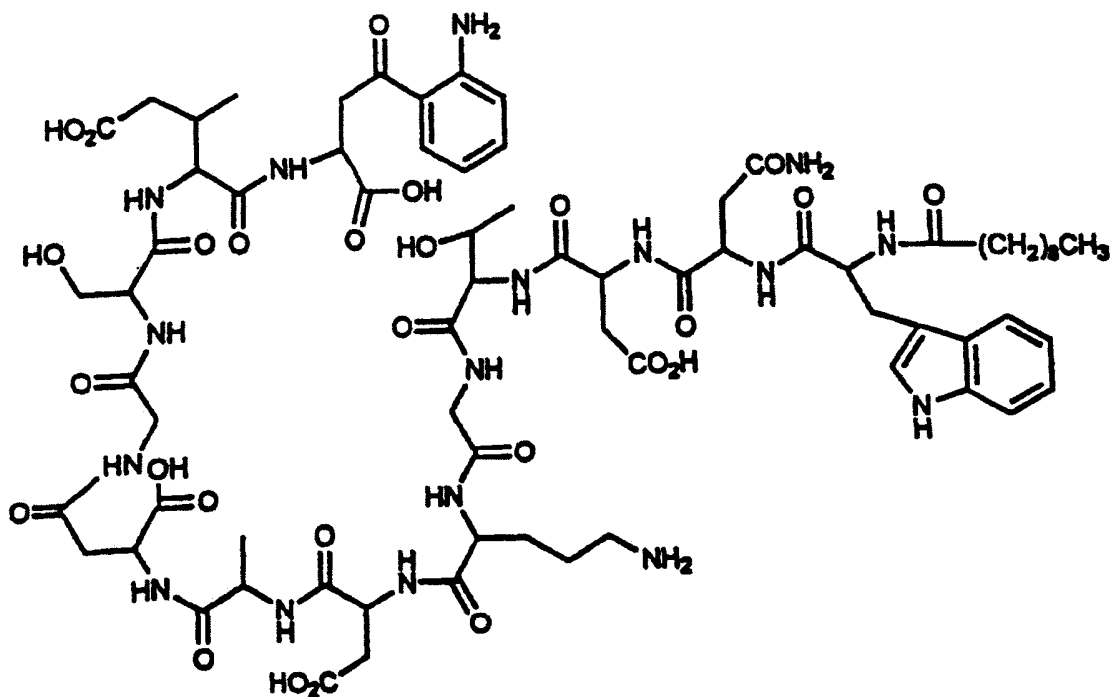
25



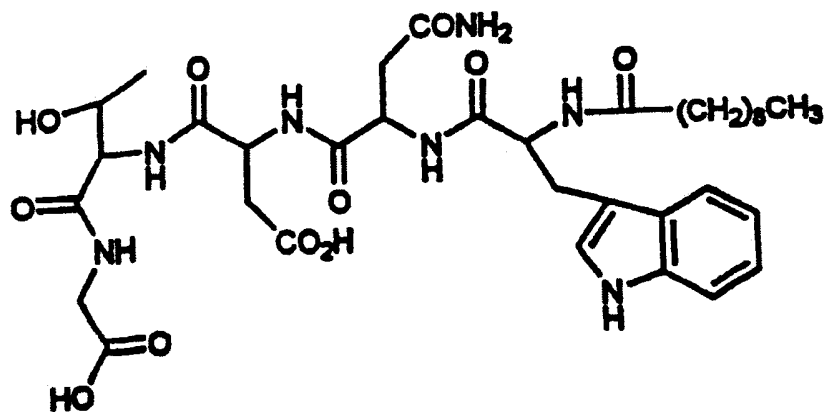
Obr. 1



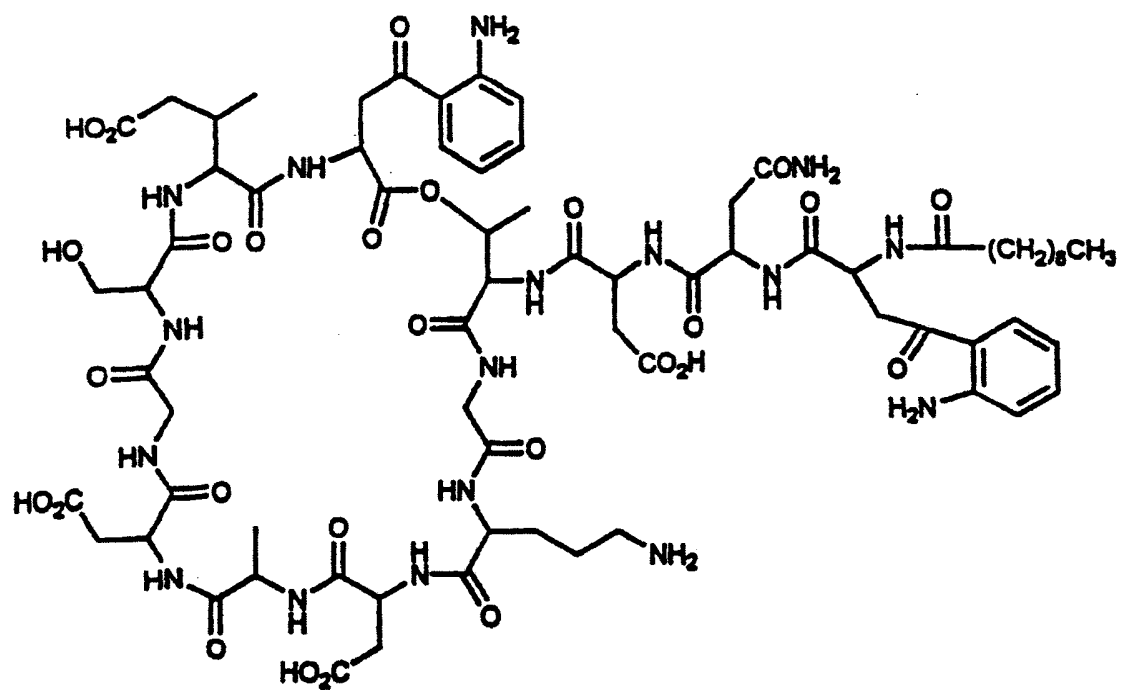
Obr. 2



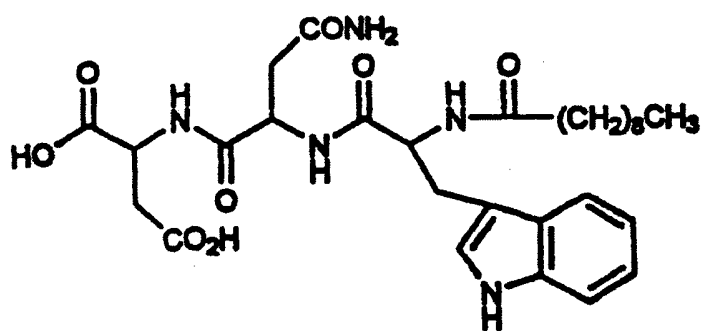
Obr. 5



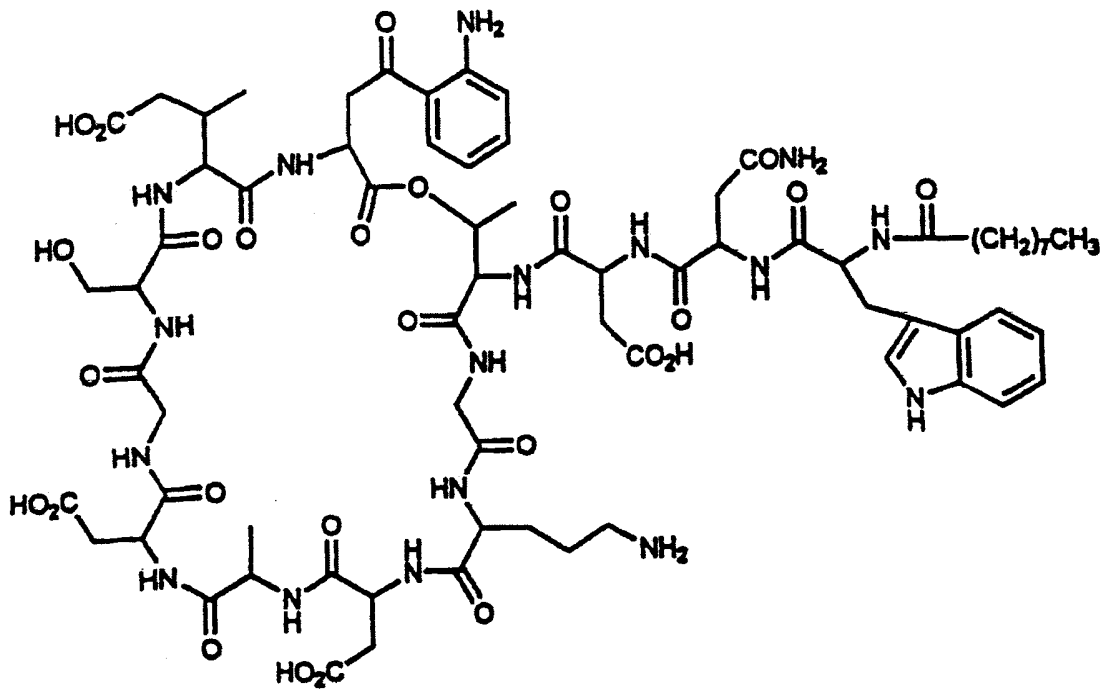
Obr. 6



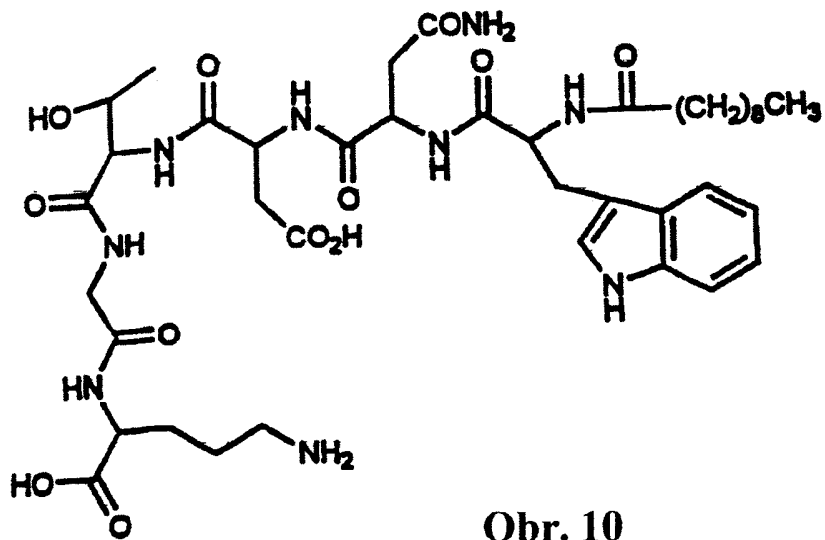
Obr. 7



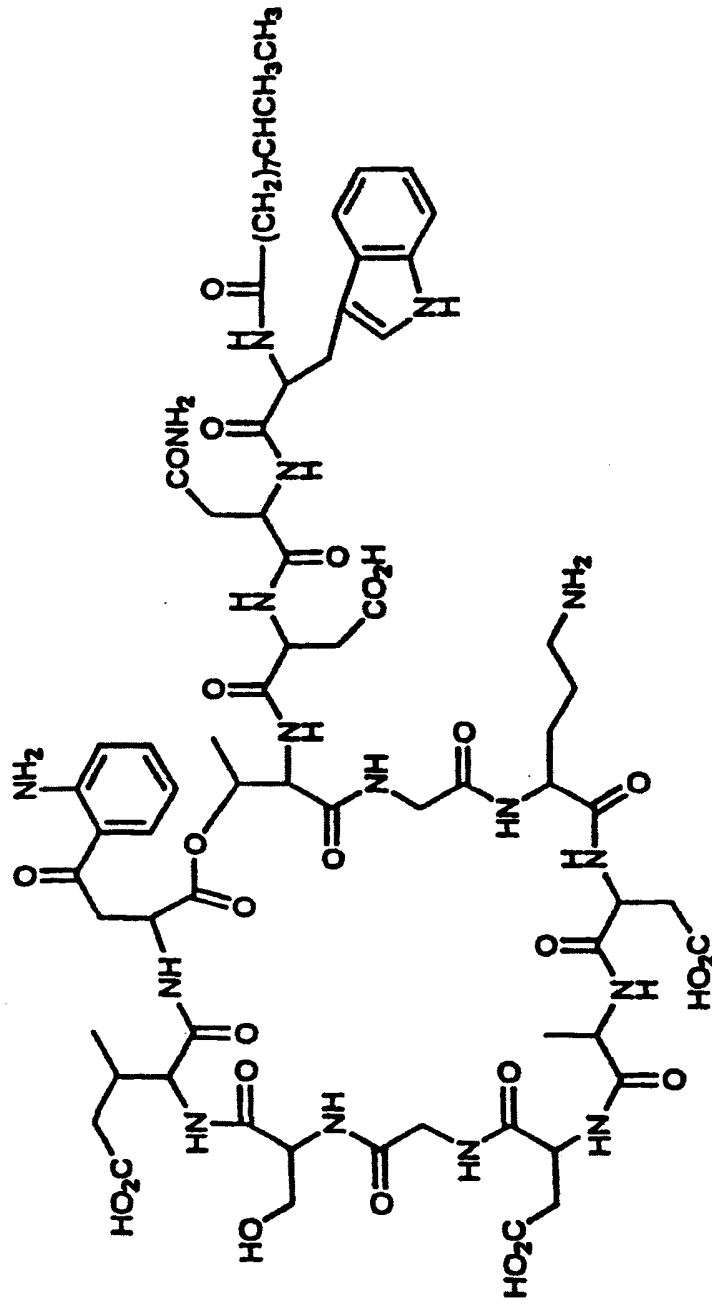
Obr. 8



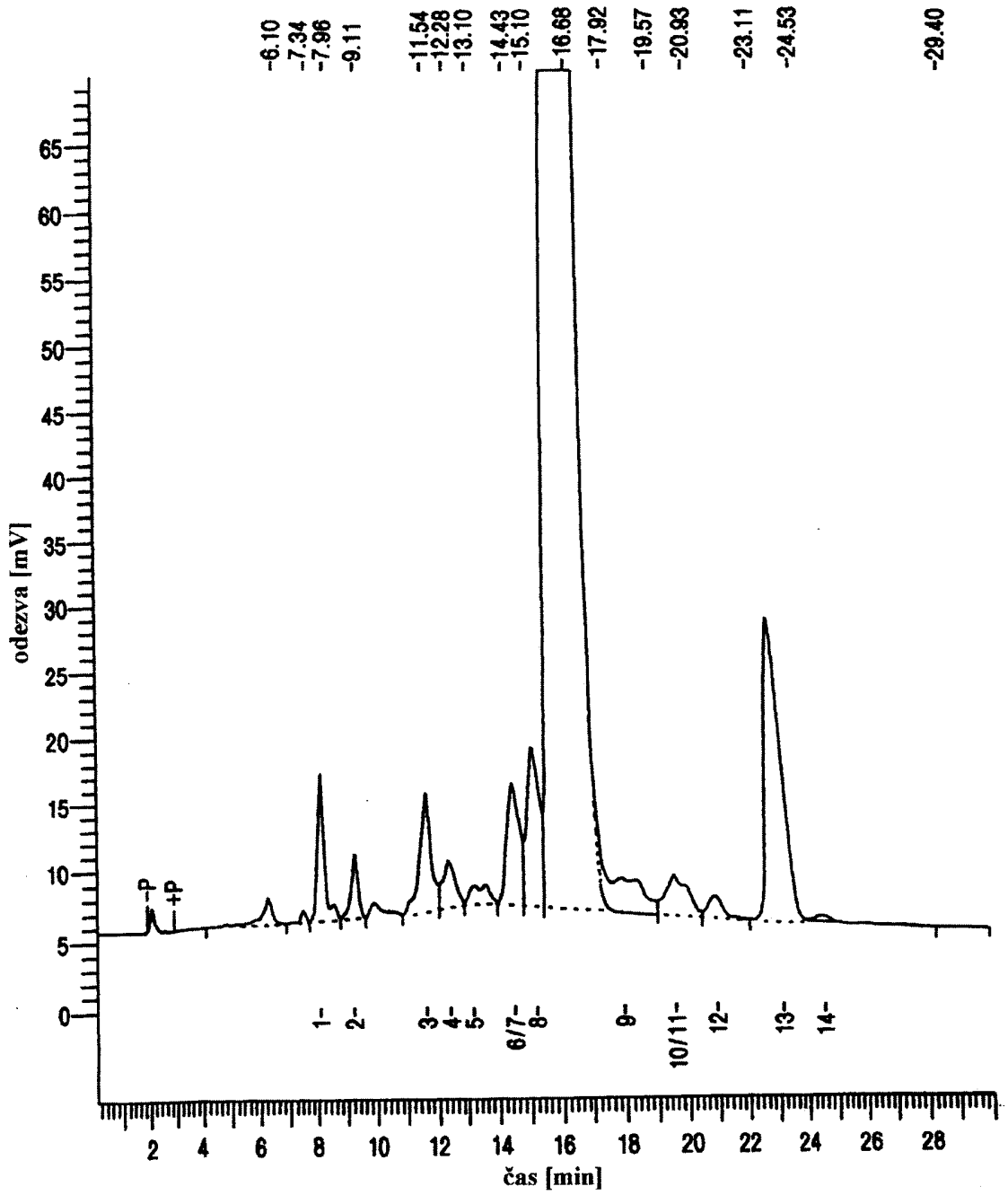
Obr. 9



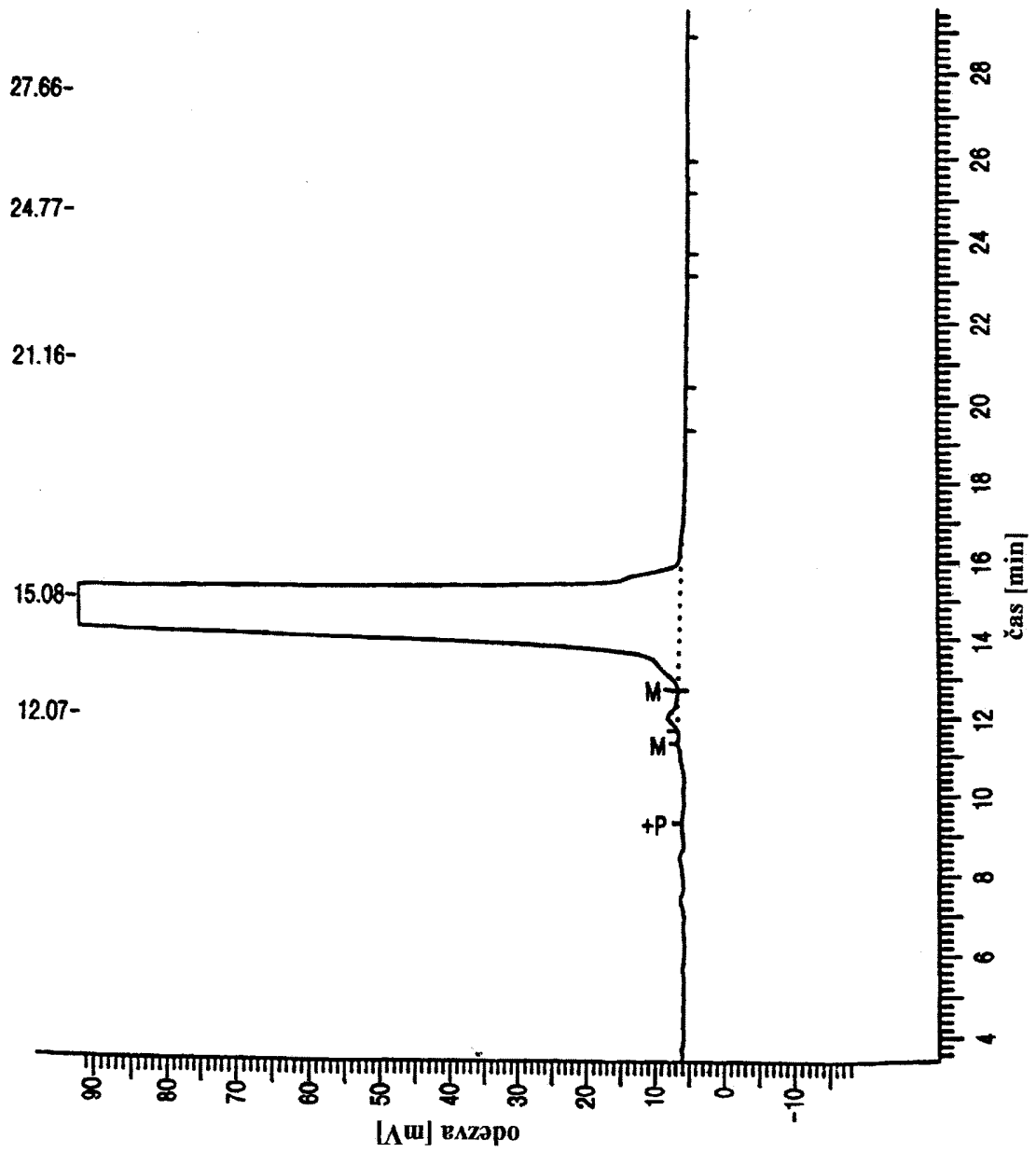
Obr. 10



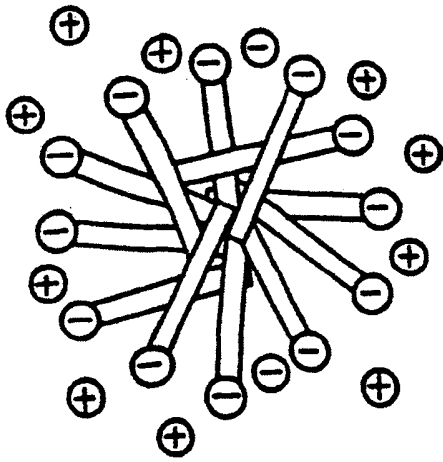
Obr. 11



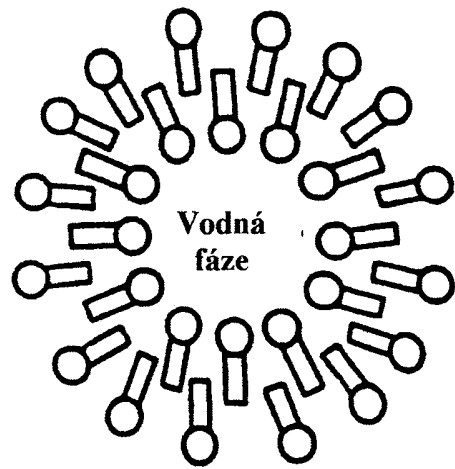
Obr. 12



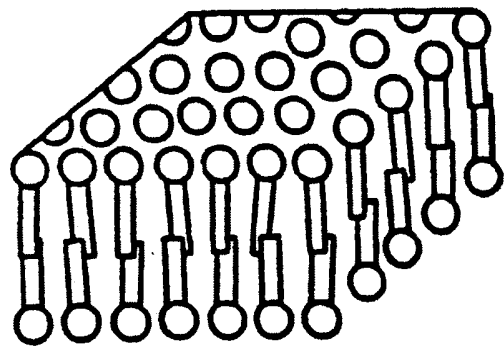
Obr. 13



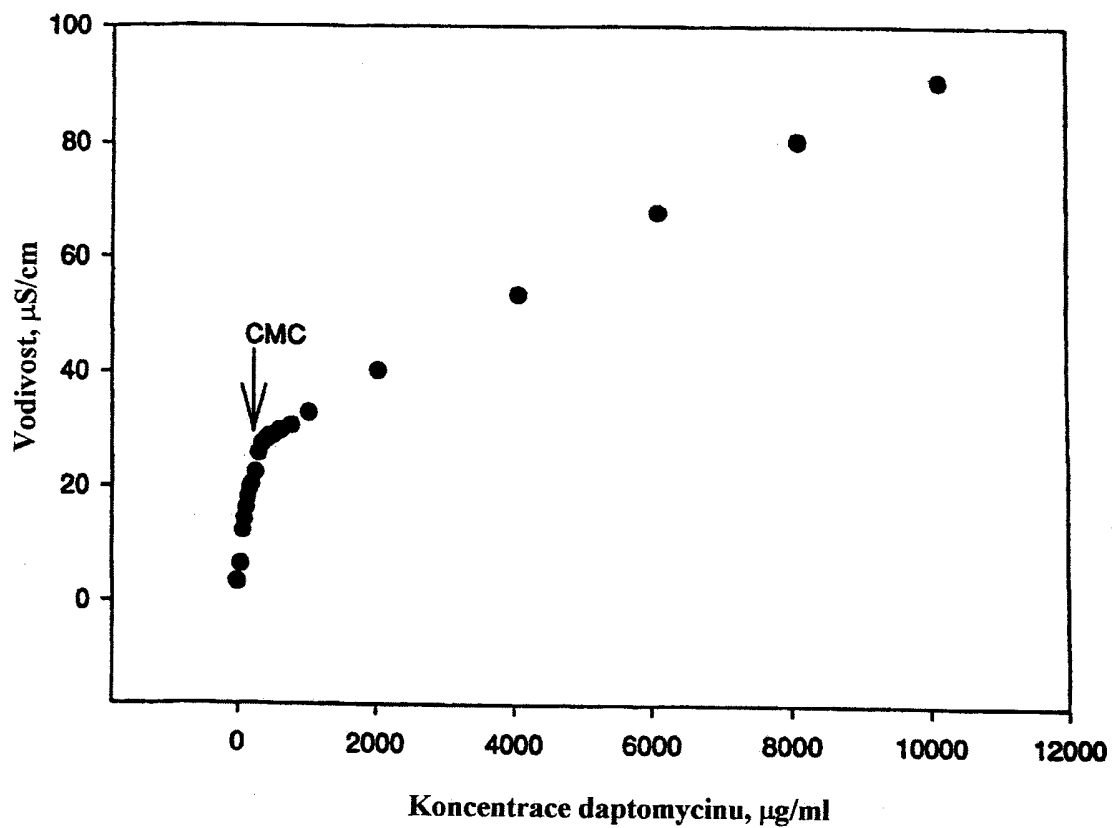
Obr. 14(a)



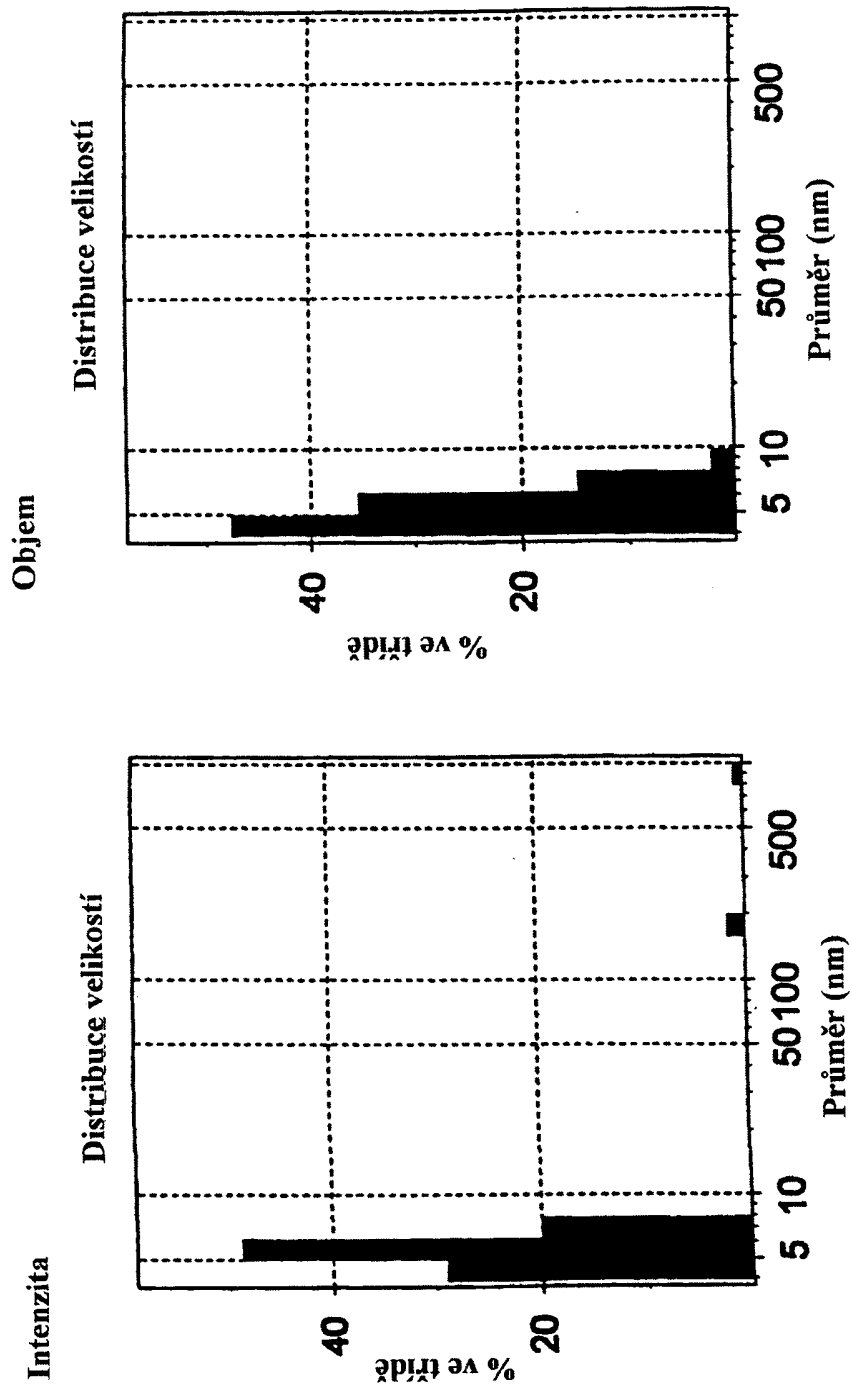
Obr. 14(c)



Obr. 14(b)



Obr. 15



Obr. 16

Konec dokumentu