



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-32753

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO USO DE TIGECICLINA SOLA O
EN COMBINACION CON RIFAMPICINA
PARA TRATAR LA OSTEOMIELITIS Y/O
LA ARTRITIS SÉPTICA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

1- WYETH

71. SOLICITANTES 2- BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY
OF TEXAS SYSTEMS

DOMICILIO MADISON, NT, EEUU; AUSTIN, TEXAS, EEUU

74. APODERADO CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

22. BOGOTÁ, D. C., 04 ABRIL de 2006

FN 05-04-2006

CONTINUA

(FORMA P-10)

SS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-082753-00000-0000 Fax: 2008-04-04 13:58:35
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEMI Eje 378 FASENACIONAL
Asi 411 PRESENTACION Folios: 282

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

05-04-06

1. SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

2. SOLICITANTE (71)	Nombre: 1.- WYETH 2.- BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEMS Dirección: 1.- Five Giralda Farms, Madison, Nueva Jersey 2.- 201 West 7 th Street, Austin, Texas Nacionalidad o Domicilio: 1.- Nueva Jersey 07940, EE.UU. 2.- Austin, Texas, 78701, EE.UU. Lugar de Constitución: 1.- DELAWARE, EE.UU. 2.- AUSTIN, TEXAS. Teléfono: _____ Fax: _____ E-mail: _____	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cuel _____ Número: _____
-----------------------------------	---	--

3. REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ Dirección: Cr. 13 A No 28-38, Mz 2 Bufete 245. Parque Central Bavaria Teléfono 3418841 Fax: 3368592 E-mail: tncarlos@etb.net.co	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cuel _____ Número: 17.117.818 TP: 17.402
--	---	--

4. INVENTOR(ES) (72)	Nombres: 1.- TESTA, Raymond Thomas 2.- CALHOUN, Jason 3.- MADER, Jon T. (Fallecido) Dirección: 1.- 55 Rockledge Place, Cedar Grove, NJ 07009, EE.UU. 2.- One Hospital Drive, Suite MC213, Columbia, MO 65212, EE.UU. 3.- (Fallecido) Nacionalidad o Domicilio: CIUDADANOS DE EE.UU.
------------------------------------	---

5. PCT (86)

Solicitud internacional No. PCT/US2004/028980 Fecha: 07 de sept. 2004

Publicación internacional No. WO 2005/023263 A1 Fecha: 17 de Marzo 2005

6. Título (54)

USO DE TIGECICLINA SOLA O EN COMBINACION CON RIFAMPICINA
PARA TRATAR LA OSTEOMIELITIS Y/O LA ARTRITIS SEPTICA

7. Clasificación Internacional (51) A61K 31/496 31/65 A61P 17/02, 31/04

8. Prioridad SI ☒ No ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	EE.UU	Sept. 05/2003	80/500.474
	EE.UU	Sept. 03/2004	10/833.455

9. Comprobante de pago No. 08-25,742 Fecha Abril 03 de 2006

FIRMA:

C.C. 17.117.818 TP 17.402

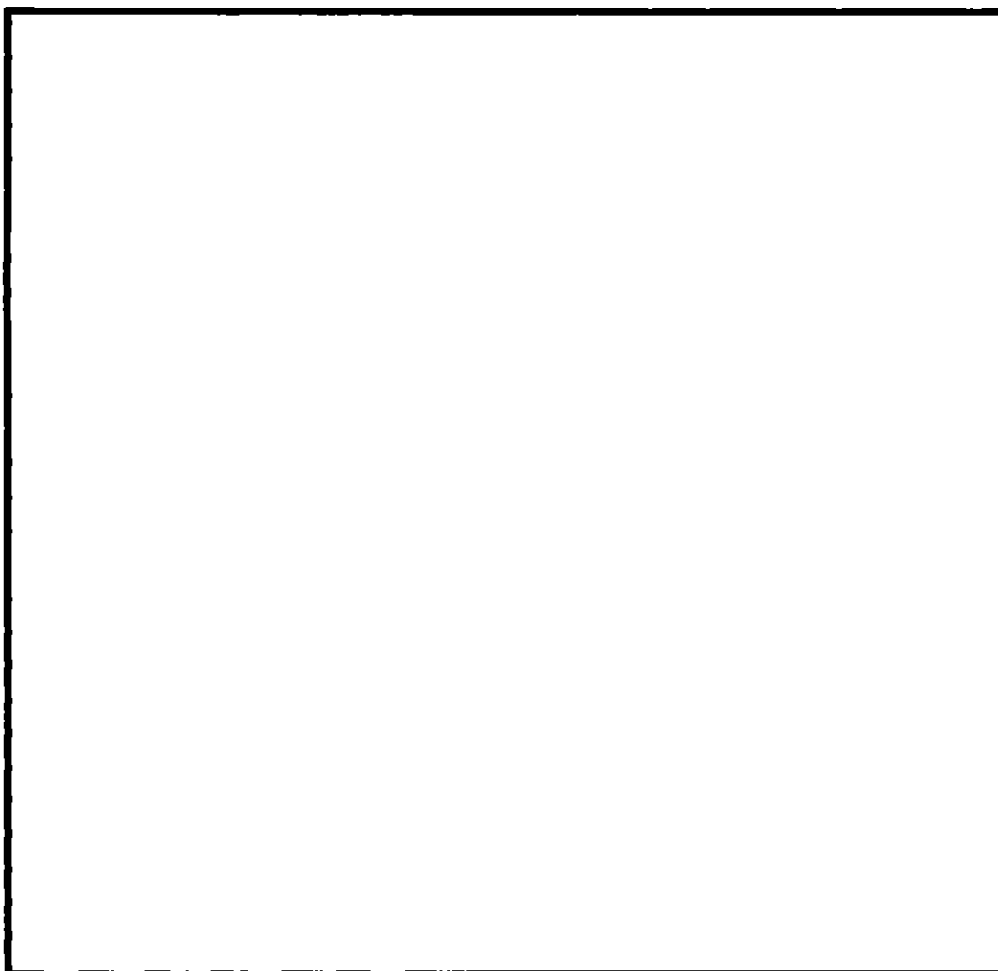
72

10.

Anaxos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros (FOTOCOPIA DE LA PUBLICACION INTERNACIONAL)

11. FIGURA CARACTERISTICA



12. Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

FIRMA:

C.C. 17.117.818 TP 17.402

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT													
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: 03-04-2008 <table border="0"> <tr> <td>(30) Prioridad</td> <td>(31) No. Prioridad</td> <td>(32) Fecha</td> <td>(33) País</td> </tr> <tr> <td>SI</td> <td>00/500.474</td> <td>05/08/2003</td> <td>E.U</td> </tr> <tr> <td></td> <td>10/933.455</td> <td>03/08/2004</td> <td></td> </tr> </table>		(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	SI	00/500.474	05/08/2003	E.U		10/933.455	03/08/2004		(51) Int Cl: (71) Solicitante(s) 1.- WYETH 2.- BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEMS (72) Inventor(es) 1.- TESTA, Raymond Thomas 2.- CALHOUN, Jason 3.- MADER, Jon T. (Fallecido) (74) Apoderado: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País												
SI	00/500.474	05/08/2003	E.U												
	10/933.455	03/08/2004													
(85) Fecha límite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: Fecha 07/09/2004 No. de solicitud PCT/US2004/028880		(87) Publicación internacional Fecha: Fecha 17/03/2005 N° publicación: WO 2005/023263 A1													
(54) Título: USO DE TIGECICLINA SOLA O EN COMBINACION CON RIFAMPICINA PARA TRATAR LA OSTEOMIELITIS Y/O LA ARTRITIS SEPTICA															

Reivindicación(es):

1. Un método para el tratamiento de una infección en hueso o médula ósea en un mamífero, que comprende la administración al mamífero de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina.

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 25,742
FECHA : ABRIL 3 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-032763-00000-0000 Fee: 2006-04-04 13:58:35
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tm: 11 PATENTENY Eps 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 268

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CARLOS TAMAYO Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	27497254	03/04/2006	1,773,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SOM: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

14172
45

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country : United States Of America
2. This public document has been signed by JUDITH A JOHNSTON
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp JUDITH A JOHNSTON, NOTARY PUBLIC, MONTGOMERY COUNTY, COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA

Certified

at Harrisburg, Pennsylvania

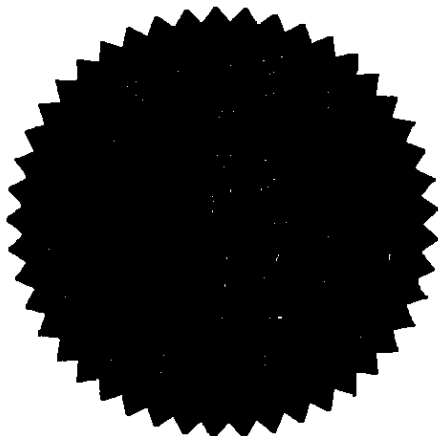
6. The 1st day of March, 2005

7. by Pedro A. Cortés, Secretary of the Commonwealth of Pennsylvania

8. No : 200508728

9. Seal/Stamp

10. Signature

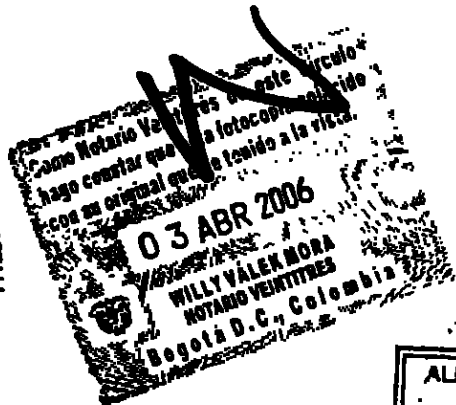


Pedro A. Cortés

Pedro A. Cortés

LEGALIZATION
050316091498

11:28:16
16/03/2005



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula: 3637
EJECIBANO-PUBLICO

DANIEL G YTIA - PATENTS & TRADEMARKS**Power of Attorney**

The undersigned (1)
WYETH

Residing at (2)

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940-0874, US

hereby grants to DANIEL GOYTIA

residing in Buenos Aires, Argentina
 full and ample power of attorney to represent him (it) and
 to apply to the proper national authorities, either
 administrative or judiciary for

Patents, Trademarks, Models, Designs and their
 Renewals

and to carry out all the necessary steps to protect our rights,
 to which effect they are empowered to take all necessary
 steps before the said national authorities, either
 administrative and/or judicial, for the aforementioned
 purposes, including to file petitions, arguments oppositions,
 protests, appeals and claims, to waive, settle and
 compromise; to accept assignments and transfers; to apply
 for certified copy; to receive documents and other valuable
 things; to prove workings; to collect monies; to sign public
 and private instruments and deeds; to either waive or not at
 their discretion the right of resorting to court proceedings;
 to do all and whatever shall be necessary before any
 national judicial and/or administrative authorities to protect
 the constituent's interests, either as plaintiff or defendant,
 with power to substitute this instrument and to revoke such
 substitution. It being understood that the above powers
 enumerated in this mandate are merely exemplifying and
 not limitative of other powers and therefore the attorneys-
 in-fact are authorized to exercise without any restriction
 whatsoever, all the rights granted by Law or emerging from
 it or which, may be a consequence of the objects of this
 mandate and whether this be under legislation at present in
 force or legislation which may be promulgated in the
 future.

Dated (3)
 Day 15 Of February 2005

Wyeth

(4)
 William T. King, Assistant Secretary

(1) Applicant's name - (2) Applicant's address - (3) Date - (4) Applicant's Signature

This document is effective as of January 26, 2004

Poder

El abajo firmante (1)
WYETH

Domiciliado en (2)

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940-0874, EEUU

por el presente otorga a DANIEL GOYTIA

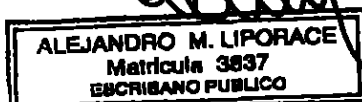
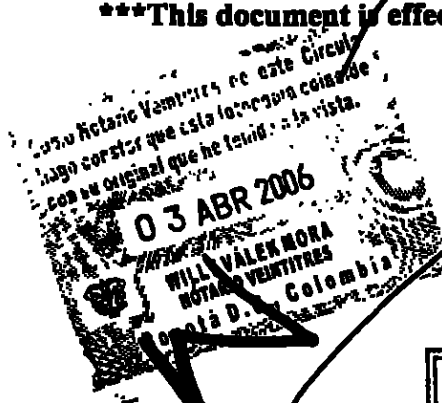
domiciliado en Buenos Aires, Argentina
 poder amplio y suficiente para recabar de las autoridades
 nacionales que corresponda, sean éstas administrativas y/o
 judiciales, la obtención de

Patentes, Marcas, Modelos, Diseños y sus renovaciones

y realizar todos los tramites conducentes para proteger los
 derechos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para
 efectuar ante dichas autoridades nacionales,
 administrativas y/o judiciales, todos los tramites
 necesarios a los objetos indicados; presentar solicitudes,
 alegatos, oposiciones, protestas, apelaciones y demandas;
 desistir, arreglar y transigir; aceptar cesiones y
 transferencias, solicitar testimonios, recibir documentos y
 otros valores; justificar explotaciones, cobrar y percibir;
 firmar instrumentos públicos, privados y escrituras
 publicas; para renunciar o no a las gestiones judiciales; y
 hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades
 nacionales, judiciales y/o administrativas, sea como
 demandante o como demandado, para proteger los
 intereses del mandante, con facultad de substituir este
 instrumento y revocar tal substitución. Se deja constancia
 que las facultades enumeradas en este mandato, son
 meramente ejemplificativas y no limitativas de otras
 facultades implícitas, por cuyo motivo, los mandatarios
 quedan autorizados para ejercer sin restricción alguna
 todos los derechos que acuerde la ley que se relacionen
 y/o emerjan y/o que sean consecuencia del objeto del
 presente poder y ya sea ello en razón de la legislación
 vigente y/o de la legislación que en el futuro se
 promulgue.

(3) Fechado el
 de

de 20



67

CERTIFICADO NOTARIAL (CORPORACIÓN)

Hoy 15 de Febrero de 2005
compareció William T. King quien conozco, quien luego de
prestar juramento debidamente, declaró y dijo que él es Secretario
Adjunto de Wyeth
la compañía nombrada en el documento
que antecede, una corporación organizada conforme a las leyes
del Estado de Delaware, DUS
domiciliada en la ciudad de Madison
Estado de Nueva Jersey, EUS
Legalmente constituida para un período de duración que aún no
ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha
compañía para conferir este poder y que personalmente ha
firmado y estampado el sello de la compañía al pie de dicho poder
en nombre y representación de la compañía mencionada.
El suscrito Notario ha visto los estatutos de incorporación
firmados en Nueva York

Estado de Nueva York
Con fecha 4 de Feb, 1926 certifica que de conformidad con la
legislación de dicho Estado la anterior declaración jurada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son
ciertos o verdaderos de lo cual da fe como asimismo de que el
compareciente firmó este instrumento en su presencia.

Notary Public (Notario Público)

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUAL)

A los 20 días del mes de
compareció
personalmente ante mí, Notario Público en y por el condado antes
citado,

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) descrita(s) y firmante(s) del documento que precede,
declarando ante mí que otorga(n) el mismo para los fines y
propósitos que en él se expresan.

Notary Public (Notario Público)

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUAL)

A los 20 días del mes de
compareció
personalmente ante mí, Notario Público en y por el condado antes
citado,

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) descrita(s) y firmante(s) del documento que precede,
declarando ante mí que otorga(n) el mismo para los fines y
propósitos que en él se expresan.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 15th day of February 2005
personally came William T. King
known to me, who being by me duly sworn did depose and say
that he is the Assistant Secretary
of Wyeth
the Company herein named, a Corporation
organized under the laws of the State of Delaware, USA,
domiciled in the City of Madison,
State of New Jersey,
United States of America
and legally constituted for a period of tenure not yet expired,
furthermore that the deponent is authorized by said Company to
confer this Power of Attorney, and that he personally has signed
and affixed the seal of the Corporation at the foot of such power
of attorney in the name and on behalf of the Corporation
mentioned.

The undersigned Notary Public has seen the Articles of
Incorporation of said Corporation executed in New York,
State of New York,
on (date) February 4, 1926,
And hereby certifies that under the laws of said State the
foregoing acknowledgement is a sufficient proof that the facts
therein contained are true, which he attests, as also that the
appearer signed this instrument in his presence.



NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

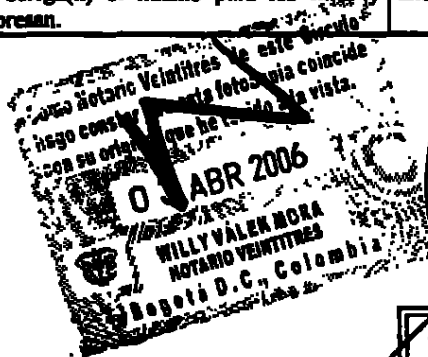
On this 20 day of
personally appeared before me, a Notary Public, in and
for the above mentioned county

to me known, and known to me to be the person(s) described
herein, who executed the foregoing document, and duly
acknowledged to me that he(they) executed the same for the uses
and purposes therein expressed.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 20 day of
personally appeared before me, a Notary Public, in and
for the above mentioned county

to me known, and known to me to be the person(s) described
herein, who executed the foregoing document, and duly
acknowledged to me that he(they) executed the same for the uses
and purposes therein expressed.



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

TRADUCCIÓN.-----

[Página 1].-----

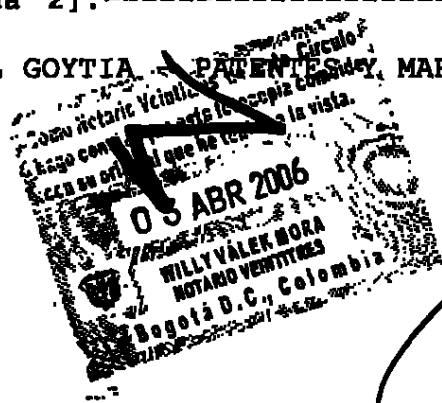
APOSTILLA.-----

(Convención de La Haya del 05 de octubre de 1961).-----

1. País: Estados Unidos de América.-----
2. El presente documento público ha sido firmado por **Judith A. Johnston**-----
3. en su carácter de NOTARIA PÚBLICA-----
4. lleva el sello / la estampilla de JUDITH A. JOHNSTON, NOTARIA PÚBLICA, CONDADO DE MONTGOMERY, COMUNIDAD DE ESTADOS DE PENNSYLVANIA [COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA]-----
- ha sido CERTIFICADO-----
5. en Harrisburg, Pennsylvania-----
6. el primero de marzo de 2005-----
7. por Pedro A. Cortés, Secretario de la Comunidad de Estados de Pennsylvania-----
8. con el número 200506728.-----
9. Sello / estampilla: [Aparece una estampilla dorada que reza:] SECRETARIA DE LA COMUNIDAD DE ESTADOS DE PENNSYLVANIA.
10. Firma: [Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:] Pedro A. Cortés.-----

[Página 2].-----

DANIEL GOYTIA, ~~PAQUETES~~ MARCAS.-----



[Handwritten signature]
ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PÚBLICO

[Aparece un Poder redactado en dos idiomas: inglés y español].-----

Fechado (3): el 15 de febrero de 2005.-----

Wyeth.-----

(4) [Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:]
William T. King, Secretario Asistente.-----

(1) Nombre del solicitante; (2) Domicilio del solicitante;
(3) Fecha; (4) Firma del solicitante.-----

***La vigencia del presente documento es retroactiva al 26 de
enero de 2004***.-----

[Página 3].-----

[Aparece una Certificación Notarial redactada en dos idiomas:
inglés y español].-----

[Al pie de la certificación notarial se lee:]-----

Notario Público [Aparece una firma ilegible y a su derecha un
sello que reza:] SELLO NOTARIAL - JUDITH A. JOHNSTON, Notaria
Pública - Upper Providence Twp., Condado de Montgomery. Mi
mandato concluye el 12 de septiembre de 2006.-----

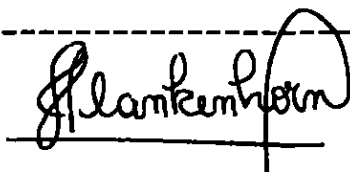
[Aparece debajo un sello en relieve que reza:] JUDITH A.
JOHNSTON - NOTARIA PÚBLICA, COMUNIDAD DE ESTADOS DE
PENNSYLVANIA.-----

Es traducción fiel al idioma español de la parte pertinente
del documento original redactado en idioma inglés y otro, que



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

adjunto a la presente, y al cual me remito en la Ciudad de
Buenos Aires, a los diez días del mes de marzo del año dos
mil cinco.-----



Willy Valek Mora



ALEJANDRO M
Matrícula
Escribano

CERTIFICO EN BELLO DE ACTUA-
CION NOTARIAL N° 1993592567
BUENOS AIRES JA 13 105

ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
Escribano Público

Como Notario Veintitres de este Circulo
hago constar que esta fotocopia coincide
con el original que he tenido a la vista.
03 ABR 2006
WILLY VALENZUELA
NOTARIO VEINTITRES
Bogotá D.C., Colombia



CERT. CARPENTERIA DON CESAR



T 003582567

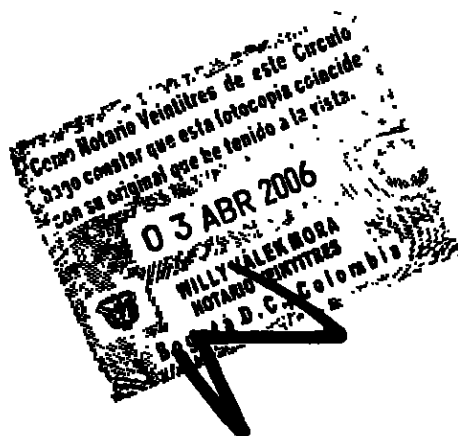
Buenos Aires, 11 de Marzo de 2005.-

En mi carácter de Escribano Titular del Registro 1331 de Capital Federal.-

CERTIFICO que la reproducción anexa, extendida en Seis.-

foja/s, que sello y firmo, es COPIA FIEL de su original, que tengo a la vista, doy fe.

El Autorizante deja constancia que el documento original cuyas fotocopias se certifican se encuentra redactado en idioma extranjero con su correspondiente traducción al español y consiste en un PODER.-



ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

LIPORACE
3837
PUBLICO



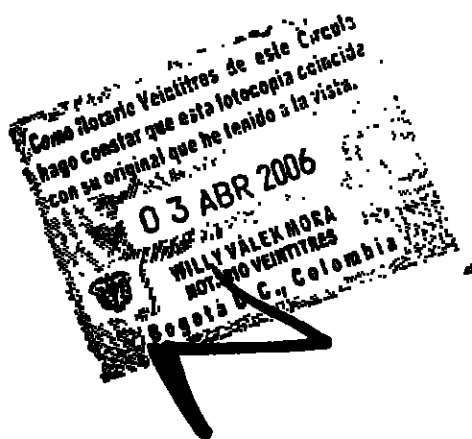
L 006417885

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, **LEGALIZA** la firma y sello del escribano ALEJANDRO MARIA LIPORACE obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 050316091498/C. La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, Miércoles 16 de Mayo de 2005



ESC. ALBERTO IGNACIO PAZ
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO



APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. PAIS _____ ARGENTINA _____

El presente documento público

2. Ha sido firmado por ROBERTO L. PEREZ

3. Quien actúa en calidad de CONSEJERO

4. Lleva el sello/timbre de CONSEJO DE ESCRIBANOS

CONS. - BS. AS.

5. En BUENOS AIRES 6. El día 17 MAR 2005

7. Por UNIDAD DE COORDINACION LEGALIZACIONES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO

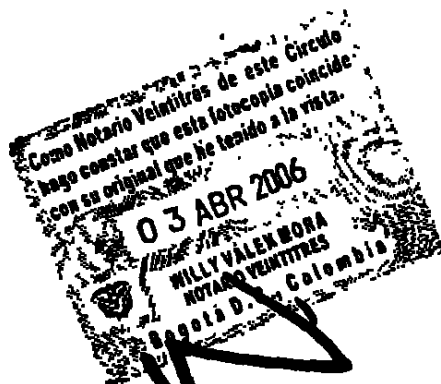
INTERNACIONAL Y CULTO

8. Bajo el Número: 52082

9. Sello y timbre: 334

Dr. ROBERTO DANIEL PEREZ
Unidad de Coordinación Legalizaciones
Ministerio de Relaciones Exteriores
Comercio Internacional y Culto

10. Firma





117-12
C.O.I.

13

N 004563812

CCBA - LUY/04 02/01

LEGALIZACION

050316091497



16/03/2006 11:25:16 \$28.00

1 FOLIO 281.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NUMERO CIENTO TREINTA
2 Y SIETE.- En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina,
3 a once de marzo de dos mil cinco, ante mí, Escribano Autorizante, COMPA-
4 RECE el Doctor Daniel GOYTIA, argentino, mayor de edad, casado, Libreta
5 de Enrolamiento número 4.526.965, domiciliado en Avenida Leandro N. Alem
6 449, 3° piso, de esta Ciudad.- El compareciente es persona hábil y de mi
7 conocimiento, doy fe, así como que DICE: I.- Que por escritura del día de la
8 fecha pasada ante mí, al folio 276 del Protocolo de este mismo Registro, se
9 protocolizó un Poder otorgado por WYETH, con domicilio en Five Giralda
10 Farms, Madison, NJ 07940-0874, EEUU, a su favor.- II.- Que viene por la
11 presente a SUSTITUIR el citado mandato, reservándose para sí las faculta-
12 des, a favor de "CARLOS TAMAYO & ASOCIADOS" y/o Carlos Orlando
13 Maya Rodriguez y/o Gustavo Calderon Rosero y/o Carmen Graciela Flo-
14 rez y/o Clara Cortes Charry y/o Mayerling Rocío Castelblanco S., con
15 domicilio en Carrera 13A N° 28-38, Buffette 245, Manzana 02, Parque Cen-
16 tral Bavaria, Bogotá, COLOMBIA, para actuar en dicho país con las siguien-
17 tes facultades: "... poder amplio y suficiente para recabar de las autoridades
18 nacionales que corresponda, sean estas administrativas y/o judiciales, la
19 obtención de "PATENTES, MARCAS, MODELOS, DISEÑOS Y SUS REN-
20 VACIONES", y realizar todos los trámites conducentes para proteger los de-
21 rechos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para efectuar ante dichas
22 autoridades nacionales, administrativas y/o judiciales todos los trámites ne-
23 cesarios a los objetos indicados; presentar solicitudes, alegatos, oposicio-
24 nes, protestas, apelaciones y demandas; desistir, arreglar y transigir; aceptar
25 cesiones y transferencias; señalar testimonios; recibir documentos y otros

Como Notario Velando este Circulo
con su firma he tenido a la vista
3 ABR 2006
WILLY VALERIE
NOTARIO VENTITRES
Bogotá D.C. Colombia



N 00456381

COLEGIO
ESCRIBAN
de la CIUDA
BOGOTÁ A.

valores; justificar explotaciones; cobrar y percibir; firmar instrumentos públicos, privados y escrituras públicas; para renunciar o no a las gestiones judiciales; y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades nacionales, judiciales y/o administrativas, sea como demandante o como demandado, para proteger los intereses del mandante, con facultad de substituir este instrumento y revocar tal substitución. Se deja constancia que las facultades enumeradas en este mandato, son meramente ejemplificativas y no limitativas de otras facultades implícitas, por cuyo motivo, los mandatarios quedan autorizados para ejercer sin restricción alguna todos los derechos que acuerde la ley que se relacionen y/o emerjan y/o que sean consecuencia del objeto del presente poder y ya sea ello en razón de la legislación vigente y/o de la legislación que en el futuro se promulgue...- LO TRANSCRIPTO ES COPIA FIEL, doy fe, de las partes pertinentes del mandato relacionado.- LEIDA y ratificada, así lo expresé, otorgó, aceptó y firmó, por ante mí, doy fe.- "SIGUE UNA FIRMA".- Esta mi sello.- Ante mí: ALEJANDRO M. LIPORACE.- CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 281 del Protocolo del Registro 1331, a mi cargo. PARA LOS APODERADOS expido esta PRIMERA COPIA en UNA FOJA de Actuación Notarial número N 00456381 que sello y firmo en el mismo lugar y fecha de su otorgamiento, doy fe.-

ALEJANDRO M. LIPORACE
Matrícula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

Como Notario Veintitres de este Circulo
Chago constar que esta fotocopia coincide
con su original que he tenido a la vista
UPR ABR 2006
WILLY VALEN MORA
NOTARIO VEINTITRES
Bogotá D.C., Colombia

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

DE
OS
3 de
RES



14. B

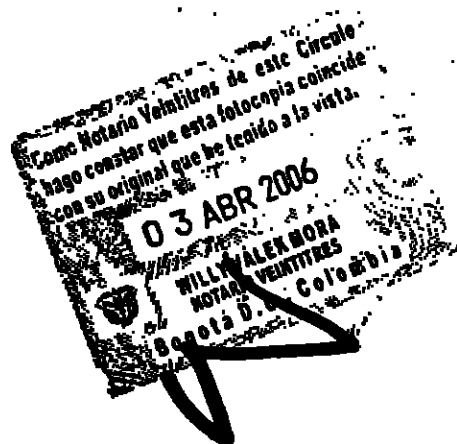
L 006417786

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, **LEGALIZA** la firma y sello del escribano ALEJANDRO MARIA LIPORACE obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 050316091497/C La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Miércoles 16 de Marzo de 2005

ESC. ALBERTO IGNACIO PAZ
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO



APOSTILLE

(Convention de la Haye de 5 octobre 1961)

1. PAIS _____ ARGENTINA _____

El presente documento público

2. Ha sido firmado por: ALBERTO I. PAS

3. Quien actúa en calidad de CONSES.

4. Lleva el sello/timbre de COLEGIO DE DOCTORES
COAD. BS-AS.

5. En BUENOS AIRES 6. El día 17 MAR 2005

7. Por UNIDAD DE COORDINACION LEGALIZACIONES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO

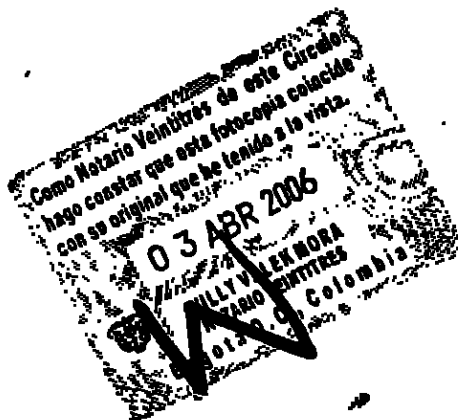
INTERNACIONAL Y CULTO

8. Bajo el Número: 5207P.

9. Sello / Timbre: \$ 33

Dr. ROBERTO DANIEL PEREZ
Unidad de Coordinación Legalizaciones
Ministerio de Relaciones Exteriores
Carretera Internacional y Gales

10. Firmado





ACTUACION NOTARIAL



N 000547175

FOLIO 2642.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NUMERO MIL CUATROCIENTOS

SESENTA Y TRES.- En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Ar-

gentina, a veintiséis de diciembre de dos mil uno, ante mi, Escribano Autorizante,

titular del Registro Notarial número 1331, **COMPARECE** el Doctor **Daniel GOYTIA**,

argentino, mayor de edad, casado, L.E. número 4.526.965, domiciliado en Avenida

Leandro N. Alem 449, 3º piso, de esta Ciudad.- El compareciente es persona hábil

y de mi conocimiento, doy fe, así como que DICE: I.- Que por escritura de fecha 12

de noviembre de 1998, pasada ante mi al folio 1893, del Protocolo de este mismo

Registro, a mi cargo, al que me remito doy fe, se protocolizó un Poder otorgado por

Board of Regents of The University of Texas System, con domicilio en 201

West 7 th Street, Austin, Texas 78701, EE. UU., a su favor. - II.- Que viene por la

presente a **SUSTITUIR** el citado mandato, reservándose para si las facultades, a

favor de **"CARLOS TAMAYO & ASOCIADOS"** y/o **Carlos Orlando Maya Rodri-**

guez y/o Gustavo Calderon Rosero y/o Carmen Graciela Florez, con domicilio

en Calle 100 No. 41-40, Oficina 301, Edificio Master Center, Bogotá, Colombia

S.A., para actuar en dicho país con las siguientes facultades: "...con poder amplio y

suficiente para recabar de las autoridades nacionales que corresponda, sean estas

administrativas y/o judiciales, la obtención de **"PATENTES, MARCAS, MODEL S,**

DISEÑOS Y SUS RENOVACIONES" y realizar todos los trámites conducentes

para proteger los derechos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para efectuar

ante dichas autoridades nacionales, administrativas y/o judiciales, todos los trámi-

tes necesarios a los objetos indicados, presentar solicitudes, alegatos, oposiciones,

protestas, apelaciones y demandas; desistir arreglar y transigir, aceptar cesiones y

transferencias; solicitar testimonios; recibir documentos y otros valores; justificar

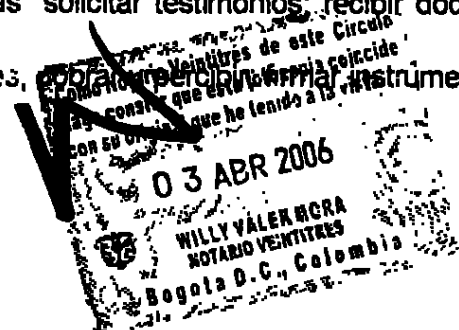
explotaciones, **firmar** instrumentos públicos, privados y escrituras

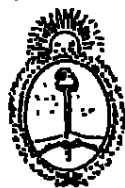
NÚMERO 0004 - 00017876

30,00

AFU-11114 COL-ESC.

27/12/2001





CECF- Legajo 1331 a Nro. 2001122786130/2

N 000547175



públicas; para renunciar o no a las gestiones judiciales; y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades nacionales, judiciales y/o administrativas, sea como demandante o como demandado, para proteger los intereses del mandante, con facultad de substituir este instrumento y revocar tal substitución. Se deja constancia que las facultades enumeradas en este mandato son meramente ejemplificativas y no limitativas de otras facultades implícitas, por cuyo motivo los mandatarios quedan autorizados para ejercer sin restricción alguna todos los derechos que acuerde la ley que se relacionen y/o emerjan y/o que sean consecuencia del objeto del presente poder y ya sea ello en razón de la legislación vigente y/o de la legislación que en el futuro se promulgue...".- LO TRANSCRIPTO ES COPIA FIEL, doy fe, de las partes pertinentes del mandalo relacionado.- LEIDA y ratificada, así lo expresó, otorgó, aceptó y firmó, por ante mí, doy fe.- "SIGUE UNA FIRMA".- Esta mi sello.- Ante mí: ALEJANDRO M. LIPORACE.- CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 2642 del Protocolo del Registro 1331, a mi cargo. PARA LOS APODERADOS expido esta PRIMERA COPIA en UNA FOJA de Actuación Notarial número N 000547175 que sello y firmo en el mismo lugar y fecha de su otorgamiento, doy fe.-




ALEJANDRO M. LIPORACE
MATRICULA 3837
ESCRIBANO PUBLICO



LEGALIZACION



L 005096476

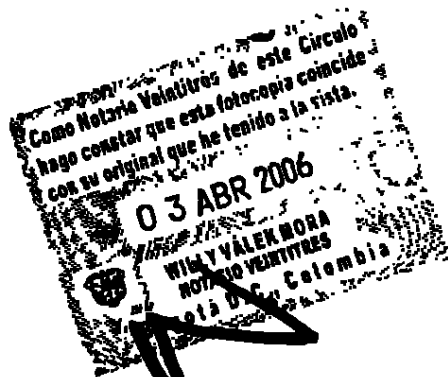
EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano **ALEJANDRO MARIA LIPORACE**

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° **200112270660/B**. La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Jueves 27 de diciembre de 2001

ESC. JUAN CARLOS LUIS SAVORITI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZADOR



APOSTILLE

Convention de La Haye du 5 octobre 1961

1. PAIS: *República Argentina* -----
- El presente documento público
2. Ha sido firmado por: JUAN CARLOS LUIS SAPORITI
3. Quién actúa en calidad de: LEGALIZADOR
4. y está revestido del sello/timbre del *COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES*. -----
- Certificado:
- 5 en *LA CIUDAD AUTONOMA DE BUENOS AIRES*
- 6 el día 27.12.01
- 7 por *MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO*.
- 8 bajo el número: 4-17676
- 9 sello:

10. firma



[Handwritten signature]
ESC. ALICIA S. NAPOLI (ESTADISTA)
COLEGIO DE ESCRIBANOS

Convenio firmado el 2/7/97 entre el Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto y los Colegios Notariales de la República Argentina sobre delegación de funciones de legalización. (Apostilla)



ALEJANDRO M. LIPORACE
ALTRICUO 1839
ESCRIBANO PUBLICO

Power of Attorney

The undersigned (1) Board of Regents of
The University of Texas
System

Residing at (2) 201 West 7th Street,
Austin, Texas 78701

hereby grants to DANIEL GOYTIA
AND/OR GOYTIA & CIA

residing in BUENOS AIRES, ARGENTINA
full and ample power of attorney to represent him (it) and
to apply to the proper national authorities, either adminis-
trative or judiciary for (3) PATENTS, TRADEMARKS, MODELS
DESIGNS, AND THEIR RENEWALS

and to carry out all the necessary steps to protect our rights,
to which effect they are empowered to take all necessary
steps before the said national authorities, either adminis-
trative and/or judicial, for the aforementioned purposes;
including to file petitions, arguments, oppositions, pro-
tests, appeals and claims, to waive, settle and compromise;
to accept assignments and transfers; to apply for certified
copies; to receive documents and other valuable things;
to prove workings; to collect monies; to sign public and
private instruments and deeds; to either waive or not at
their discretion the right of resorting to court proceedings;
to do all and whatever shall be necessary before any na-
tional judicial and/or administrative authorities to protect
the constituent's interests, either as plaintiff or defendant;
with power to substitute this instrument and to revoke such
substitution. It being understood that the above powers
enumerated in this mandate are merely exemplifying and
not limitative of other powers, and therefore the attorneys-
in-fact are authorized to exercise without any restriction
whatsoever, all the rights granted by law or emerging from
it or which may be a consequence of the objects of this man-
date and whether this be under legislation at present in force
or legislation which may be promulgated in the future.

Date (4) day 30th of September 1998

(5)

Poder

abajo firmante (1) Board of Regents
of The University of Texas System

Domiciliado en (2) 201 West 7th Street,
Austin, Texas 78701, E.E.U.U.

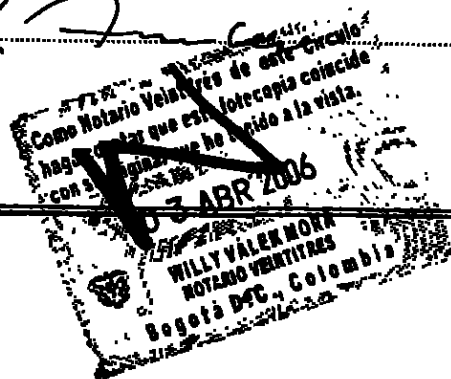
por el presente otorga a Daniel Goytia
y/o Goytia & Cia.

domiciliado en Buenos Aires, ARGENTINA
poder amplio y suficiente para recabar de las autoridades
nacionales que corresponda, sean administrativas y/
o judiciales, la obtención de (3) PATENTES, MARCAS
Modelos, Diseños y sus renovaciones

y realizar todos los trámites conducentes para proteger los
derechos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para
efectuar ante dichas autoridades nacionales, administrativas
y/o judiciales, todos los trámites necesarios a los objetos
indicados; presentar solicitudes, alegatos, oposiciones,
protestas, apelaciones y demandas; desistir, arreglar y
transigir; aceptar cesiones y transferencias; solicitar
testimonios; recibir documentos y otros valores; justificar
explotaciones; cobrar y percibir; firmar instrumentos
públicos, privados y escrituras públicas; para renunciar o
no a las gestiones judiciales; y hacer cuanto fuere necesario
ante las autoridades nacionales, judiciales y/o
administrativas, sea como demandante o como demandado,
para proteger los intereses del mandante, con facultad de
substituir este instrumento y revocar tal sustitución. Se
deja constancia que las facultades enumeradas en este
mandato, son meramente ejemplificativas y no limitativas
de otras facultades implícitas, por cuyo motivo, los
mandatarios quedan autorizados para ejercer sin restricción
alguna todos los derechos que acuerde la ley que se
relacionen y/o emerjan y/o que sean consecuencia del objeto
del presente poder y ya sea ello en razón de la legislación
vigente y/o de la legislación que en el futuro se promulgue.

(4) day 30th of September 1998

MARIA VICT
TRADUCTORA I
M. N. No. 3183



NOTARIAL CERTIFICATE

CERTIFICACION NOTARIAL

CERTIFICADO NOTARIAL

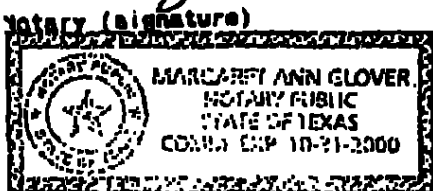
State of Texas
 On this 30th day of September
 1998 personally came Ray
Farabee... know to me,
 who being by me duly sworn did
 depose and say that he is the
 Vice-Chancellor & General Counsel
 herein named, a University or-
 ganized under the laws of the
 State of Texas... domiciled
 in the City of Austin...
 State of Texas... and
 legally constituted for a period
 of tenure not yet expired,
 furthermore that the deponent is
 authorized by said University to
 confer this Power of Attorney,
 and that he personally has
 signed and affixed the seal of
 the University.. at the foot of
 such power of attorney in the
 name and on behalf of the
 University mentioned.

The Undersigned Notary Public
 has seen the Articles.....
of said University...
 executed in Austin... State
 of Texas... under date of
and hereby certifies
 that under the laws of said
 State the foregoing acknow-
 ledgement is a sufficient proof
 that the facts therein contained
 are true, which he attests, as
 also that the appearer signed
 this instrument in his presence.

Hoy 30 de Septiembre de 1998.
 comparecio Ray Farabee, a
 quien conozco, quien luego de
 prestar juramento debidamente,
 declaró y dijo:
 que el es Vice rector y consejero general
UNIVERSIDAD
 brada en el documento que an-
 tecede, una corporación orga-
 nizada conforme a las leyes
 Estado de Texas...
Austin... Estado de Texas..
 legalmente constituida para un
 periodo de duración que aún no
 ha terminado; que el declarante
 está autorizado por dicha UNIVERSIDAD
 para conferir este poder
 y que personalmente ha firmado
 y estampado el sello de la
UNIVERSIDAD
 compaña el pie de dicho poder
 en nombre y representación de
 la UNIVERSIDAD mencionada.
 El suscrito Notario ha visto
 los estatutos de incorporación
 firmados en Austin... Estado de
Texas... con fecha.....
 y certifica que de conformidad
 con la legislación de dicho Es-
 tado la anterior declaración
 jurada es prueba suficiente de
 que los hechos sobre que ella
 versa son ciertos e verdaderos,
 de lo cual da fe, como asimismo
 de que el compareciente firmó
 este instrumento en su presen-
 cia.

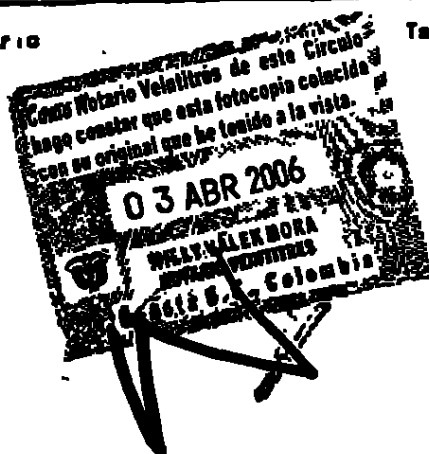
Hoje, dia....., do mês de.....
 de ano de 199... compareceu perante
 mim o Sr.....
 portador do documento de identidade
 Nº..... a quem conheço e
 que prestou devido juramento, DE-
 CLAROU QUE é o
 (occupation) da.....
 (company name), uma empresa exis-
 tente e organizada de acordo com as
 Leis do estado de.....
 país de..... e que tem
 sede na cidade de.....
 na.....
 constituída por prazo de duração
 indeterminado e se dedica a.....
 e ainda,
 que tem suficientes poderes na ci-
 tada empresa para fazer a presente
 declaração e assinar procurações
 para que terceiros a representem.
 O Notário Público abaixo assina-
 do examinou "os estatutos" / "o
 contrato social" assinado(s) em
 estado de....
 data de.....
 e certifica que de conformidade com
 a legislação vigente no mencionado
 estado a declaração jurada acima é
 prova suficiente de que seu conteú-
 do é certo e verdadeiro, do qual
 dá fé, assim como de que a pessoa
 declarante assinou este documento em
 sua presença.

Margaret Ann Glover



Notario

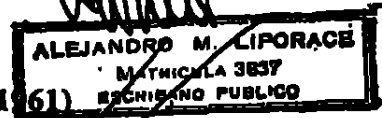
Notario





The State of Texas
Secretary of State

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)



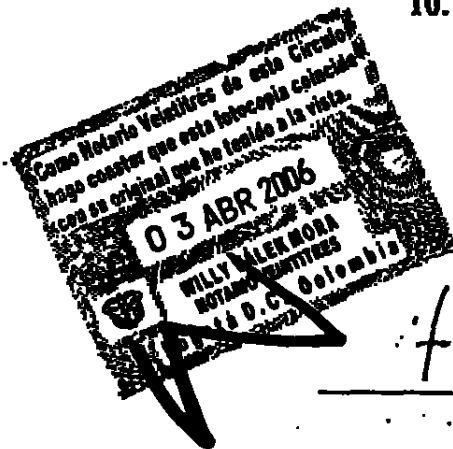
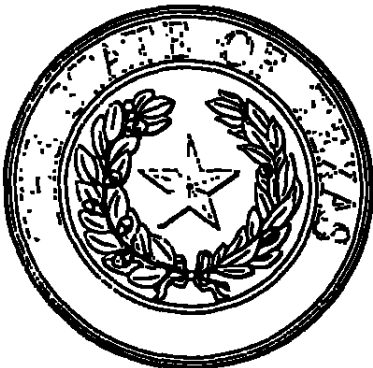
MARIA VIC
TRADUCTORA
M. N. No. 3183

1. **Country:** United States of America
This Public document
2. **has been signed by** MARGARET ANN GLOVER
3. **acting in the capacity of** Notary Public, State of Texas
4. **bears the seal/stamp of** MARGARET ANN GLOVER, Notary Public, State of Texas, Commission Expires: 10-31-00

ORIA ARAUZ
PUBLICA INGLES
-Te. XI - Fe. 007

CERTIFIED

5. **at Austin, Texas**
6. **on October 23, 1998**
7. **by the Secretary of State of Texas**
8. **Certificate No. N-164252**
9. **Seal**
10. **Signature:**



Alberto R. Gonzales

Alberto R. Gonzales
Secretary of State

sis

1
ANDRÉ M. LIPORACE
MATRICULA 3837
ESCRIBANO PÚBLICO

19
DORIA ARAUZ
PÚBLICA INGLÉS
XI-F.007

TRADUCCION-----

[Al pie del documento, un Poder impreso en dos columnas escritas en idiomas inglés y español, reza:] Lugar y Fecha:

Fecha: 30 de septiembre de 1998. Firma del Solicitante:

5 [aparece una firma ilegible]-----

[Adjunto aparece una Certificación Notarial impresa en tres columnas redactadas en idiomas inglés y español y en un tercer idioma; al pie de ella aparece una firma y sello que rezan:]

Margaret Ann Glover, Escribana (firma). Escribano Público,

10 Estado de Texas; Margaret Ann Glover, Escribana Pública,
Estado de Texas, Vencimiento de Mandato: 31/10/2000.-----

[Aparece un sello ilegible]-----

[Aparece un sello que reza:] EL ESTADO DE TEXAS-----

EL ESTADO DE TEXAS, Secretaría de Estado-----

15 APOSTILLA (Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961.)---

1. País: Estados Unidos de América-----

Este documento público-----

2. ha sido firmado por MARGARET ANN GLOVER-----

3. actuando en su carácter de Escribana Pública, Estado de

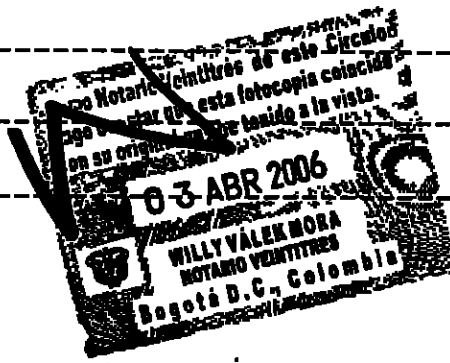
20 Texas-----

4. lleva el sell/timbre de MARGARET ANN GLOVER, Escribana Pública, Estado de Texas. Mi Mandato vence el 31/10/00-----

CERTIFICADO-----

5. en Austin, Texas-----

25 6. el 23 de octubre de 1998-----



7. por el Secretario de Estado de Texas-----

8. Certificación N° N-164252-----

9. Sello: EL ESTADO DE TEXAS-----

10. Firma: [aparece una firma ilegible con una aclaración que
5 reza:] Alberto Gonzales, Secretario de Estado. sjs-----

CERTIFICO QUE LA QUE ANTECEDE ES TRADUCCION FIEL AL ESPAÑOL
DEL DOCUMENTO ORIGINAL REDACTADO EN IDIOMA INGLES QUE TUVE A
MI VISTA Y AL CUAL ME REMITO EN BUENOS AIRES A LOS ONCE DIAS
DEL MES DE NOVIEMBRE DE MIL NOVECIENTOS NOVENTA Y OCHO.-----

10

MARIA VICTORIA ARAUZ
TRADUCTORA PUBLICA INGLES
M. N. No. 3183 - T. XI - F. 007

CERTIFICO EN SELLO DE ACTUA-
CION NOTARIAL N° F.O.O. 9298425
BUENOS AIRES 21/3/01



ALEJANDRO M. LIPORACE
MATRICULA 3837
ESCRIBANO PUBLICO

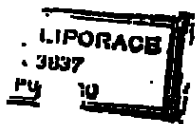


ACTUACION NOTARIAL
LEY 13.330

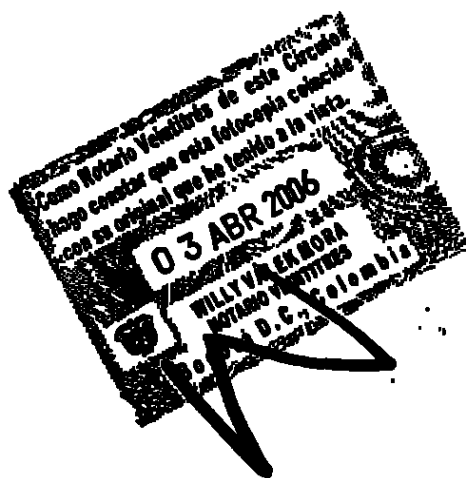


F 009898425

En mi carácter de Escribano TITULAR DEL REGISTRO 1331
CERTIFICO que el documento adjunto, extendido en CUATRO foja/s, que sello
y rubrico, es/son COPIA/S FIEL de su original, que tengo a la vista, doy fe.
Buenos Aires, 21 de MARZO de 2001.-



ALEJANDRO M. LIPORACE
MATRICULA 3837
ESCRIBANO PUBLICO





LEGALIZACION



L 004760776

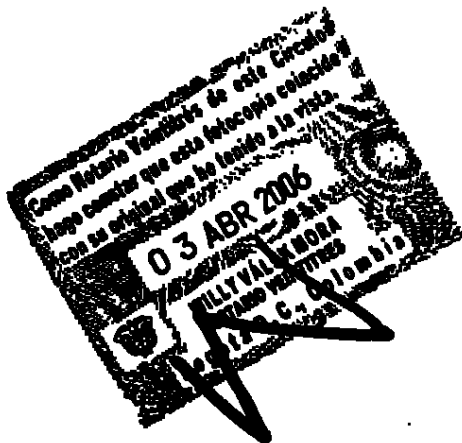


EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Capital Federal, República Argentina,
en virtud de las facultades que le confieren las Leyes vigentes, LEGALIZA la firma
y el sello del escribano **ALEJANDRO MARIA LIPORACE**
obranten en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo
el N° **200103230758/C** La presente legalización no juzga sobre
el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, **Viernes 23 de marzo de 2001**

SUSANA MARTA MORELLO NADALE
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA



APOSTILLE

Convención de La Haya du 5 octobre 1961

1. PAIS: *República Argentina*
- El presente documento público
2. Ha sido firmado por: SUSANA M. MORELLO NADALE
3. Quién actúa en calidad de: CONSEJERA
4. y está revestido del sello/timbre del *COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CAPITAL FEDERAL.*

Certificado:

5. en *LA CIUDAD AUTONOMA DE BUENOS AIRES*
6. el día *23.03.01*
7. por *EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CAPITAL FEDERAL*
8. bajo el número: 4-13129
9. sello:



10. firma

MARIA CRISTINA SOLER
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

Convenio firmado el 2/7/97 entre el Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto y los Colegios Notariales de la República Argentina sobre delegación de funciones de legalización. (Apostilla)



(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 March 2005 (17.03.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/023263 A1

(51) International Patent Classification: A61K 31/496
A61P 19/02, 31/04, A61K 31/65

(21) International Application Number:
PCT/US2004/028980

(22) International Filing Date:
7 September 2004 (07.09.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/500,174 5 September 2003 (05.09.2003) US
Not furnished 3 September 2004 (03.09.2004) US

(71) Applicants (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Chivald Farms, Madison, New Jersey 07940
(US); BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin,
Texas 78701 (US).

(72) Inventors: TESTA, Raymond, Thomas; 55 Rockledge
Place, Cedar Grove, New Jersey 07009 (US); CALHOUN,
Jason, Department of Orthopaedic Surgery, University of
Missouri, One Hospital Drive, Suite MC213, Columbia,
Missouri 65212 (US); MAIDER, Jon, T. (deceased).

(74) Agents: LAVENUE, Teresa, A. et al.; KINYON &
KINYON, 1500 K Street, N.W., Suite 700, Washington,
DC 20005-1257 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GR, GU, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: USE OF TIGECYCLINE, ALONE, OR IN COMBINATION WITH RIFAMPIN TO TREAT OSTEOMYELITIS
AND/OR SEPTIC ARTHRITIS

(57) Abstract: The present invention is directed to a method for treating bone or bone marrow infections, joint infection or infection
of the tissues surrounding the joint by administration of the antibiotic tigecycline alone or in combination with a rifamycin antibiotic.
In a preferred embodiment the bone or bone marrow infection causes osteomyelitis. In another embodiment the joint infection or
infection of the tissues surrounding the joint causes septic arthritis. The invention is also directed to manufacture of a medicament for
treatment of bone and/or bone marrow infections, or joint infections and/or infections in tissues surrounding the joint with tigecycline
alone or in combination with rifampin.

23
24

USE OF TIGECYCLINE, ALONE, OR IN COMBINATION WITH RIFAMPIN TO
TREAT OSTEOMYELITIS AND/OR SEPTIC ARTHRITIS

5 This application claims priority to U.S. Provisional application 60/500,474, filed
on September 5, 2003, which is herein incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

10 The present invention relates to a novel method of treating osteomyelitis and septic
arthritis caused by or as a result of bacterial infections. The present invention also relates
to treatment of bacterial infections of the bone, bone marrow, joint, and synovial fluid.
The present invention further relates to treatment of antibiotic resistant bacterial infections
in these diseases and tissues.

BACKGROUND OF INVENTION

15 The last half of the 20th century saw significant progress in the development of
antibacterial agents. This success fostered the perception that bacterial diseases were more
readily cured than any other major disorder, but the emergence of multidrug-resistant
organisms in the 1990s resulted in serious public health implications. Resistance has
spread to previously susceptible organisms, and some organisms are essentially resistant to
20 all approved antibacterial agents.

Tigecycline, which belongs to the glycylcycline class of antibiotics, circumvents
existing mechanisms of microbial resistance. It demonstrates a broad spectrum of
antibacterial activity, inhibiting multiple resistant gram-positive, gram-negative, and
anaerobic bacteria. Tigecycline is active against most common pathogens. Tigecycline is
25 active against pathogens such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA),
vancomycin-resistant enterococci (including *Enterococcus faecalis*), penicillin-
resistant/macrolide-resistant pneumococci, *Prevotella* spp., peptostreptococci,
mycobacteria, and minocycline-resistant organisms (Boucher *et al.*, *Antimicrob Agents
Chemother.* 2000; 44(8): 2225-2229, Galcs *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;
30 46: 19-36, Goldstein *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(10): 2747-2751).
Tigecycline is useful in the treatment of respiratory pathogens such as *Streptococcus
pneumoniae* (penicillin sensitive and penicillin resistant), *Haemophilus influenzae*,
Chlamydia pneumoniae, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (methicillin-

24
25

susceptible and methicillin-resistant), aerobic gram-negative rods, and enterococci (vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant enterococci). The *in vivo* results have been very encouraging and better than would be predicted based on time above minimum inhibitory concentration (MIC) in serum. Tigecycline is observed to be a safe antibacterial agent.

Methicillin-resistant staphylococci are the most common organisms in infections of the bone and joint (Waldvogel, *Infectious Diseases* 1988: 1339-1344). The options for treatment of infections due to these microorganisms are limited: the sensitivity of clinical strains to quinolones, clindamycin, cotrimoxazole, and rifampin is variable, and the sensitivity is often limited to glycopeptides, which must be administered by the parenteral route. Resistance of staphylococci to glycopeptides has already been described and represents a major concern, since those drugs are considered the gold standard for the treatment of serious infections due to methicillin-resistant staphylococci (Smith, *et al.*, *N Engl J Med* 1999; 340: 493-501).

Novel drugs for the treatment of methicillin-resistant staphylococcal infections, such as quinupristin-dalfopristin and linezolid have recently been introduced in clinical practice (Johnson, *et al.*, *Lancet* 1999; 354: 2012-2013, Livermore, *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 347-350). However, none have been fully investigated in clinical studies on the treatment of osteomyelitis.

The treatment of acute and chronic orthopedic infections is difficult, due in part to the fact that many of the infections result from antibiotic resistant pathogens but also in part due to the location of the infection. Often the therapy requires a prolonged antibiotic therapy and surgical treatment (Lazzarini *et al.*, *Curr Infect Dis Rep* 2002; 4: 439-445). Several studies have been performed using various animal model of osteomyelitis (Rissing, *Infect Dis Clin North Am* 1990; 4: 377-390). Despite a prolonged antibiotic treatment, viable bacteria may be still found in the bone. Eradication of more bacteria from the bone has been associated with a prolonged duration of antibiotic treatment (Norden, *Rev Infect Dis* 1988; 10: 103-110). After four weeks of antibiotic treatment, the majority of antibiotic regimens were unable to eradicate staphylococci from the bone.

Antibiotic treatment for osteomyelitis is traditionally administered by the intravenous route. However, oral regimens for osteomyelitis have been successfully tested in human trials (Bell, *Lancet* 1968; 10: 295-297, Feigin *et al.*, *Pediatr* 1975; 55: 213-223, Sluma *et al.*, *Am J Med* 1987; 82 (Suppl 4A): 259-261). Unfortunately, the choice of oral

antimicrobials is restricted when dealing with multi-drug resistant organisms and treatment of these multi-drug resistant organisms may require the use of parenteral drugs (Tice, *Infect Dis Clin North Am* 1998; 12: 903-919).

There thus remains a need for a method of treating osteomyelitis and/or septic arthritis caused by bacterial infections, especially those caused by antibiotic resistant bacterial strains. The present invention fulfills this long-standing need.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a method of treating bone or bone marrow infections (often referred to as osteomyelitis) and/or joint infections and infections of the surrounding tissues (often referred to as septic arthritis) in a mammal, preferably a human. The method comprises administering to the mammal a pharmacologically effective amount of tigecycline and/or an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin to treat the infection. Preferably the antimicrobial is rifampin.

The infection may be caused by a pathogen selected from the group consisting of gram negative bacteria, gram positive bacteria, anaerobic bacteria, and aerobic bacteria. Exemplary bacteria include *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Rickettsia*, *Pneumococci*, *Prevotella*, *Peptostreptococci*, *Bacteroides*, *Legionella*, beta-haemolytic streptococci, group B streptococcus and *Spirochetes*. Preferably, the infection is comprised of *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* and *Haemophilus* and more preferably *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, or *Mycobacterium leprae*.

In preferred embodiments the infection is comprised of a pathogen exhibiting antibiotic resistance. Exemplary antibiotic resistance includes methicillin resistance, glycopeptide resistance, tetracycline resistance, oxytetracycline resistance, doxycycline resistance; chlortetracycline resistance, minocycline resistance, glycylcycline resistance, cephalosporin resistance, ciprofloxacin resistance, nitrofurantoin resistance, trimethoprim-sulfa resistance, piperacillin/tazobactam resistance, moxifloxacin resistance, vancomycin resistance, teicoplanin resistance, penicillin resistance, and macrolide resistance.

26
27

A preferred glycopeptide resistance is vancomycin resistance. In another preferred embodiment, the infection is comprised of *S. aureus* exhibiting a resistance selected from the group consisting of glycopeptide resistance, tetracycline resistance, minocycline resistance, methicillin resistance, vancomycin resistance and resistance to glycylcycline antibiotics other than tigecycline.

In another embodiment the infection is comprised of *Acinetobacter baumannii*, which may or may not exhibit antibiotic resistance selected from the group consisting of cephalosporin resistance, ciprofloxacin resistance, nitrofurantoin resistance, trimethoprim-sulfa resistance, and piperacillin/tazobactam resistance.

In another embodiment, the infection is comprised of *Mycobacterium abscessus* that may or may not exhibit moxifloxacin resistance. In other embodiments the infection is comprised of *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, or *Rickettsia rickettsii*.

The present invention also provides a use of a pharmacologically effective amount of tigecycline for treating osteomyelitis and/or septic arthritis in a mammal. In another embodiment, the present invention provides a use of a pharmacologically effective amount of tigecycline and an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin to treat osteomyelitis and/or septic arthritis. In another embodiment, the invention provides a use of a pharmacologically effective amount of tigecycline for manufacture of a medicament for treatment of osteomyelitis and/or septic arthritis in a mammal. In another embodiment, there is provided a use of a pharmacologically effective amount of tigecycline and an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin for manufacture of a medicament for treatment of osteomyelitis and/or septic arthritis in a mammal.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The drawings illustrate certain embodiments of the present invention and in no way are meant to limit the scope of the invention.

Figure 1 shows the pharmacokinetics of tigecycline in normal new Zealand white rabbits, which establishes serum levels above the minimum inhibitory concentration over twelve hours after treatment with 14 mg/kg of tigecycline.

Figure 2 shows the investigators' grading of extent of bone infection as seen in x-

27
28

ray images. The data demonstrate the effective treatment of osteomyelitis by tigecycline and tigecycline in combination with rifampin over controls.

Figure 3 shows the colony-forming units per gram of marrow and bone in each of the treatments, which demonstrates that tigecycline and tigecycline in combination with rifampin were an effective treatment for infection of the bone and infection of the marrow with respect to controls.

Figure 4A provides a graphic depiction of the weights of rabbits throughout the time course of administration of various antibacterials.

Figure 4B provides a graphic depiction of weight variances of rabbits throughout the time course of administration of various antibacterials.

Figures 5A and 5B show the peaks and troughs of tigecycline (14 mg/kg twice daily) and vancomycin (30 mg/kg twice daily) in the serum of infected rabbits after administration of the respective drugs. The data demonstrate that the antibiotic serum levels were above minimum inhibitory concentrations throughout treatment.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is directed to methods of treating bone and bone marrow infections in a mammal. Preferably the mammal is human. In a preferred embodiment, the bone or bone marrow infection causes osteomyelitis. Osteomyelitis is an acute or chronic infection of the bone and/or bone marrow, and includes the related inflammatory process of the bone and its structures due to infection with pyogenic organisms. The infection associated with osteomyelitis may be localized or it may spread through the periosteum, cortex, marrow, and cancellous tissue. Common bacterial pathogens causing osteomyelitis vary on the basis of the patient's age and the mechanism of infection. Acute osteomyelitis includes two primary categories: hematogenous osteomyelitis and direct or contiguous inoculation osteomyelitis.

Hematogenous osteomyelitis is an infection caused by bacterial seeding from the blood. Acute hematogenous osteomyelitis is characterized by an acute infection of the bone caused by the seeding of the bacteria within the bone from a remote source. Hematogenous osteomyelitis occurs primarily in children. The most common site is the rapidly growing and highly vascular metaphysis of growing bones. The apparent slowing or sludging of blood flow as the vessels make sharp angles at the distal metaphysis predisposes the vessels to thrombosis and the bone itself to localized necrosis and bacterial

28
29

seeding. These changes in bone structure may be seen in x-ray images. Acute haematogenous osteomyelitis, despite its name, may have a slow clinical development and insidious onset.

5 Direct or contiguous inoculation osteomyelitis is caused by direct contact of the tissue and bacteria during trauma or surgery. Direct inoculation (contiguous-focus) osteomyelitis is an infection in the bone secondary to the inoculation of organisms from direct trauma, spread from a contiguous focus of infection, or sepsis after a surgical procedure. Clinical manifestations of direct inoculation osteomyelitis are more localized than those of haematogenous osteomyelitis and tend to involve multiple
10 organisms/pathogens.

Additional categories include chronic osteomyelitis and osteomyelitis secondary to peripheral vascular disease. Chronic osteomyelitis persists or recurs, regardless of its initial cause and/or mechanism and despite aggressive intervention. Although listed as an etiology, peripheral vascular disease is actually a predisposing factor rather than a true
15 cause of infection.

Symptoms of osteomyelitis often include high fever, fatigue, irritability and malaise. Often movement may be restricted in an infected limb or joint. Local edema, erythema, and tenderness generally accompany the infection and warmth may be present around the affected area. Sinus tract drainage may also be present at later stages of
20 infection. Hematogenous osteomyelitis usually presents with a slow insidious progression of symptoms, while chronic osteomyelitis may include a non-healing ulcer, sinus tract drainage, chronic fatigue and malaise. Direct osteomyelitis generally presents with prominent signs and symptoms in a more localized area.

Certain disease states are known to predispose patients to osteomyelitis. These
25 include diabetes mellitus, sickle cell disease, acquired immune deficiency syndrome (AIDS), IV drug abuse, alcoholism, chronic steroid use, immunosuppression, and chronic joint disease. In addition, the presence of a prosthetic orthopedic device is an independent risk factor as is any recent orthopedic surgery or open fracture.

Several bacterial pathogens are commonly known to cause acute and direct
30 osteomyelitis. For example, acute haematogenous osteomyelitis in newborns (younger than 4 months) is frequently caused by *S. aureus*, *Enterobacter* species, and group A and B *Streptococcus* species. In children aged 4 months to 4 years, acute haematogenous osteomyelitis is commonly caused by *S. aureus*, group A *Streptococcus* species,

29
30

Haemophilus influenzae, and *Enterobacter* species. In children and adolescents aged 4 years to adult, acute haematogenous osteomyelitis is commonly caused by *S. aureus* (80%), group A *Streptococcus* species, *Haemophilus influenzae*, and *Enterobacter* species. In adults, acute haematogenous osteomyelitis is commonly caused by *S. aureus* and occasionally *Enterobacter* or *Streptococcus* species. Primary treatment has in the past included a combination of penicillinase-resistant synthetic penicillin and a third-generation cephalosporin. Alternate therapy includes vancomycin or clindamycin and a third-generation cephalosporin. In addition to these above-mentioned antibacterials, ciprofloxacin and rifampin have been used in a combination therapy for adult patients. In instances where there is evidence of infection with gram-negative bacilli, a third-generation cephalosporin is often administered.

Direct osteomyelitis is commonly caused generally by *S. aureus*, *Enterobacter* species, and *Pseudomonas* species. Often times direct osteomyelitis is caused by a puncture wound through an athletic shoe. In these cases, direct osteomyelitis is commonly caused by *S. aureus* and *Pseudomonas* species. The primary antibiotics in this scenario include ceftazidime or cefepime. Ciprofloxacin is often used as an alternative treatment. In patients with sickle cell disease, direct osteomyelitis is commonly caused by *S. aureus* and *Salmonella* species, and the primary choice for treatment is a fluoroquinolone antibiotic (not in children). A third-generation cephalosporin (e.g., ceftriaxone) is an alternative choice.

For patients with osteomyelitis due to trauma, the infecting agents usually include *S. aureus*, coliform bacilli, and *Pseudomonas aeruginosa*. Primary antibiotics are nafcillin and ciprofloxacin. Alternatives include vancomycin and a third-generation cephalosporin with antipseudomonal activity.

Accordingly, as used herein and in the claims, the term "osteomyelitis" includes haematogenous osteomyelitis, direct or contiguous inoculation osteomyelitis, chronic osteomyelitis and osteomyelitis secondary to peripheral vascular disease. Osteomyelitis may be the result of infections caused by any of the above described pathogens, but also includes other pathogens having the ability to infect the bone, bone marrow, joint, or surrounding tissues.

The term "treating osteomyelitis" includes eradication of the pathogens/bacteria causing the underlying infection associated with osteomyelitis, inhibition of bacterial growth, reduction in bacterial concentration, reduction in recovery time from infection,

30
31

improvement, elimination, or reduction of symptoms of infection such as swelling, necrosis, fever, pain, weakness, and or other indicators as are selected as appropriate measures by those skilled in the art.

Currently, the primary treatment for osteomyelitis is parenteral antibiotics that
5 penetrate bone and joint cavities. Treatment is required for at least four to six weeks. After intravenous antibiotics are initiated on an inpatient basis, therapy may be continued with intravenous or oral antibiotics, depending on the type and location of the infection, on an outpatient basis.

For example, osteomyelitis caused by *S. aureus* infection is generally treated with
10 2 grams of cloxacillin administered intravenously or parenterally every six hours for at least the initial 14 days or for the entire treatment course of up to six weeks. Other treatments are cefazolin administered at 1 to 2 grams every eight hours for six weeks or 600 mg of clindamycin every eight hours for six weeks.

Osteomyelitis caused by beta-haemolytic streptococci is generally treated
15 intravenously or parenterally with benzylpenicillin at two million IU every four to six hours for two to four weeks. Infections by *Salmonella* spp. are treated with ciprofloxacin at 750 mg orally every 12 hours for six weeks.

Treatment of osteomyelitis caused by *Haemophilus influenzae* in children is generally with intravenous or parenteral administration of 25-50 mg cloxacillin every four
20 to six hours for four to six days plus ceftriaxone at 50-75 mg/kg every 24 hours for four to six days. This treatment is followed by amoxicillin at 15 mg/kg plus oral clavulanic acid (maximum 500mg) every eight hours for four weeks.

In neonates, treatment is accomplished with intravenous or parenteral cloxacillin at 25-50 mg/kg every four to six hours for four to six days plus intravenous or parenteral
25 cefotaxime at 50-75 mg/kg every eight hours for four to six days. Treatment is followed by amoxicillin at 15 mg/kg plus oral clavulanic acid (maximum 500mg) every eight hours for four weeks.

Infection in children with *S. aureus* is generally treated with intravenous or parenteral administration of 25-50 mg cloxacillin every four to six hours for four to six
30 days plus ceftriaxone at 50-75 mg/kg every 24 hours for four to six days. This treatment is followed by cloxacillin at 12.5 mg/kg orally every six hours for three to four weeks.

Treatment of infection in children with *Salmonella* spp. depends upon the susceptibility of the pathogen. Treatment choices include cloxacillin plus ceftriaxone

followed by either sulfamethoxazole at 20 mg/kg and trimethoprim at 4 mg/kg orally every 12 hours for six weeks, or amoxicillin at 7.5-15 mg/kg orally every 12 hours for six weeks, or ciprofloxacin at 10-15 mg/kg every four to six hours for four to six days plus cefotaxime at 50-75 mg/kg intravenously every eight hours for four to six days, followed
5 by sulfamethoxazole and trimethoprim or amoxicillin or ciprofloxacin.

Another embodiment of the present invention provides methods of treating joint infections and/or surrounding tissue infections in a mammal. Preferably the mammal is human. In a preferred embodiment, the joint infection and/or surrounding tissue infection causes septic arthritis.

10 Septic arthritis is an infection of the joint and surrounding tissues and results in joint inflammation caused by the presence of live intra-articular micro-organisms. Septic arthritis most commonly occurs secondary to osteomyelitis, especially in childhood, and arises as a result of bacterial infection.

Infection of the joint can occur by several routes. Most commonly, the spread of
15 the infecting pathogen is haematogenous. Frequently septic arthritis arises from infections or abscesses in the skin. Sepsis in the mouth and teeth or after dental procedures or in association with infection of the respiratory or urogenital tract can also lead to septic arthritis. Direct penetrating trauma to the joint with sharp objects or from major traumatic injury can lead to joint infection as well. Joint aspiration or injection and surgical
20 procedures such as joint replacement may also result in joint infection. Additionally, osteomyelitis often spreads to involve the joint. This is especially common in young children. Finally, infection of the soft tissues adjacent to the joint, such as inflamed bursae or tendon sheaths, can spread to involve the joint space. Spread of infection by the haematogenous route is still the most frequent cause of joint sepsis.

25 Symptoms of septic arthritis include malaise and fever, acute hot joint or joints together with acute inflammation: swelling and joint effusion, redness, pain and loss of function.

The most common causative organism of septic arthritis is *Staphylococcus aureus*. In neonatal septic arthritis, *Escherichia coli* and *Haemophilus influenzae* are also common
30 pathogens. In children up to 5 years *Haemophilus influenzae* is the most common cause of haematogenous joint sepsis. Gram-negative intestinal bacteria are also common pathogens in the elderly and those with diabetes mellitus or prosthetic joints. In cases of penetrating injury, and in intravenous drug abusers, infection with *Pseudomonas aeruginosa* or

32
33

Staphylococcus epidermidis are often found. In healthy young adults *Neisseria gonorrhoeae* or meningococcal infection are sometimes the cause of septic arthritis. Chronic low grade septic arthritis, especially in the spine, can be the result of infection with micro-organisms such as *Mycobacteria* or *Brucella abortus*. Furthermore, within
5 acquired immune deficiency syndrome sufferers the range of joint pathogens is diverse.

Some of the most common septic arthritis pathogens include, but are not limited to, (1) Gram positive: *Staphylococcus aureus* (80% cases), *Streptococcus pyogenes/pneumoniae*; (2) Gram negative: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae/meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Brucella*
10 species, *Salmonella* species, fusiform bacteria; (3) acid-fast bacilli: *Mycobacterium tuberculosis*, atypical mycobacteria; and (4) Spirochaetes: *Leptospira icterohaemorrhagica*.

Accordingly, the term "septic arthritis" as used herein and in the claims includes infections of the joint and surrounding tissues caused by the above listed pathogens as well
15 as any other pathogens having the ability to infect the joint and surrounding tissues. Surrounding tissues include, but are not limited to, surrounding muscle, related tendons, connecting bones, bursae, tendon sheaths, synovium, synovial fluid, and related cartilage.

The term "treating septic arthritis" includes eradication of the pathogens/bacteria causing the underlying infection associated with septic arthritis, inhibition of bacterial
20 growth, reduction in bacterial concentration, reduction in recovery time from infection, improvement, elimination, or reduction of symptoms of infection such as swelling, necrosis, fever, pain, weakness, and or other indicators as are selected as appropriate measures by those skilled in the art.

Septic joints are usually treated for four to six weeks while infected arthroplasties
25 are treated for four to six weeks or more. (Calhoun *et al.*, *Am. J. of Surgery* 1989; 157: 443-449, Calhoun *et al.*, *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 1988; 114: 1157-1162, Gordon *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(10): 2747-2751, Mader *et al.*, *West J Med* 1988; 148: (5)568, Mader *et al.*, *Orthopaedic Review* 1989; 18: 581-585, Mader *et al.* *Drugs & Aging* 2000; 16(1): 67-80). These lengthy antibiotic
30 treatments become even more problematic when drug resistant bacteria, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, is present.

Prior to characterization of the pathogen, treatment of septic arthritis in adults usually begins with 2 gm cloxacillin given intravenously or intramuscularly every six

hours in combination with 1-2 gm ceftriaxone every 24 hours. In children over two months, treatment includes cloxacillin intravenously or intramuscularly at 25-50 mg/kg up to a maximum of 2 gm every six hours in combination with ceftriaxone 25-50 mg/kg up to a maximum of 2 gm every 24 hours. In neonates, treatment includes cloxacillin
5 intravenously or intramuscularly at 50-75 mg/kg up to a maximum of 2 gm intravenously every eight hours. Other antibiotic treatments include cefotaxime, flucloxacillin, benzyl and penicillin.

Once the pathogen has been identified, the common course of treatment is based on the infecting pathogens present. For example, when it is determined that the infection
10 comprises *Staphylococcus aureus*, septic arthritis is often treated with cloxacillin intravenously every six hours, or cefazolin every eight hours, or clindamycin every eight hours, the chosen treatment lasting for two to three weeks. Methicillin-resistant *S. aureus* is treated with parenterally administered vancomycin.

Antibiotic treatment of osteomyelitis and septic arthritis is still a challenge for the
15 physician. Many orthopedic infections are acquired in the nosocomial environment (Holtom *et al.*, *Clin Orthop* 2002; 403: 38-44). Further, the causative agents of such infections are often multi-drug resistant. Staphylococci are the most common nosocomial and drug resistant organisms, but gram negative pathogens may be involved as well (Cunha, *Clin Infect Dis* 2002; 35: 287-293).

20 Infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, compared with those due to methicillin-susceptible *S. aureus*, are more difficult to treat and may have a poorer prognosis (Cosgrove *et al.*, *Clin Infect Dis* 2003; 36: 53-59). Therapeutic options for these infections are limited. The only drugs with a constant efficacy against all the staphylococcal strains, and which have been extensively studied in the treatment of bone
25 infections, are glycopeptides. Unfortunately, resistance to these antibiotics has been already recognized as a major problem in the treatment of gram positive pathogens. Enterococci resistant to vancomycin are diffused worldwide and such a resistance has been demonstrated as potentially transmittable to other gram positive organisms *in vitro* (Noble, *et al.*, *FEMS Microbiology Letters* 1992; 72:195-198). Moreover, sporadic strains
30 of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* have been isolated in several countries (Hiramatsu, *Am J Med* 1998; 104:7S-10S, Hamilton-Miller, *Infection* 2002; 30: 118-124). Therefore, the availability of alternative antimicrobial agents for the treatment of multi-drug resistant pathogens is of paramount importance.

34
35

Tigecycline (formerly and often still referred to as "GAR-936") is a 9-t-butylglycylamido synthetic derivative of a new class of antibiotics called glycylcyclines. This new class of tetracycline derivatives has demonstrated excellent *in vitro* activity against a large number of gram positive and gram negative, aerobic and anaerobic organisms, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant enterococci (including *Enterococcus faecalis*), penicillin-resistant/macrolide-resistant pneumococci, *Prevotella* spp., peptostreptococci, and *Mycobacterium* spp. (Boucher *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(8): 2225-2229, Gales *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 46: 19-36, Goldstein *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(10): 2747-2751). Tetracyclines are bacteriostatic agents, which act to inhibit bacterial protein synthesis. The glycylcyclines have been developed to overcome the bacterial mechanisms of resistance to tetracyclines, even though their exact mechanism of action has not yet been determined (Rasmussen *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 38: 1658-1660).

15 Tigecycline concentrates in bone, bone marrow, joint, and synovial fluid as well as many other organs and tissues of interest. Furthermore, it has been discovered that tigecycline concentrates in infected portions of the above described tissues. Studies of the pharmacokinetics of intravenous tigecycline in humans have shown that there is a rapid distribution phase, with a prolonged half-life (40 to 60 hours) and a high volume of distribution at steady state (7 to 14 L/kg). Animal studies with radiolabeled tigecycline suggest that this rapid distribution phase and high volume distribution at steady state represent penetration of tigecycline into tissues including lung and bone.

For example, the distribution of tigecycline in rat tissues has been shown in Sprague-Dawley rats when given [^{14} C] tigecycline at a dosage of 3 mg/kg by 30-minute IV infusion. In general, radioactivity was well distributed to most tissues, with the highest overall exposure observed in bone. Exposure in tissues showing the highest concentrations were as follows: bone>bone marrow>salivary gland, thyroid, spleen, and kidney. In each of these tissues, the ratio of area under the concentration-time curve (AUC) in tissue to AUC in plasma was greater than 10. In this study, the ratio of AUC in the rat lung to AUC in the plasma was 4.4. Additionally, it has been demonstrated that intravenously administered tigecycline penetrates bone tissue in humans and intravenous administration extends concentration of tigecycline in synovial fluid in human over time.

The inventors have discovered that tigecycline is a useful treatment of osteomyelitis and septic arthritis. The antimicrobial spectrum is broad, including all the pathogens found in nosocomial bone and joint infections. The pharmacokinetic properties are favorable, since the drug may be administered twice daily. Moreover, bone penetration and drug levels above the minimum inhibitory concentration (MIC) were found in almost every sample collected. Minimum inhibitory concentration is a method of determining the efficacy of a compound in inhibiting bacterial growth. It is the lowest concentration of an antimicrobial agent that inhibits growth of a micro-organism and should correspond to concentrations required in sera of the mammal for the most minimal treatment. Additionally, tigecycline provided a good safety profile in humans, demonstrating that the antimicrobial should be suitable for clinical studies on orthopedic infections.

Accordingly, one aspect of the invention provides a method for treating infections of the bone, bone marrow, joint and surrounding tissue, and a method for treating osteomyelitis and/or septic arthritis in a mammal by administering to the mammal a pharmacologically effective amount of tigecycline. The bone, bone marrow, joint and surrounding tissue infections and osteomyelitis and/or septic arthritis and maybe caused by any of the commonly found pathogens, such as the pathogens discussed above, which include gram negative bacteria, gram positive bacteria, anaerobic bacteria and aerobic bacteria. For example, the infection may be comprised of, but not limited to, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Rickettsia*, *Pneumococci*, *Prevotella*, *Peptostreptococci*, *Bacteroides*, *Legionella*, beta-haemolytic streptococci, and group B streptococcus. In preferred embodiments, the infection is comprised of *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, and *Haemophilus*. In more preferred embodiments the infection is comprised of *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus Influenzae*, *Enterococcus faecium*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia rickettsii*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium abscessus*, or *Mycoplasma pneumoniae*.

In one embodiment of the present invention there is provided a method of treating infections of the bone, bone marrow, joint and surrounding tissue, and a method for

36
3X

treating osteomyelitis and/or septic arthritis caused by the bacterial strains (such as those described above) that demonstrate antibiotic-resistance by administering a pharmaceutically effective amount of tigecycline. For example, the exhibited resistance may be, but is not limited to, methicillin resistance, glycopeptide resistance, tetracycline resistance, oxytetracycline resistance, doxycycline resistance; chlortetracycline resistance, minocycline resistance, glycylcycline resistance, cephalosporin resistance, ciprofloxacin resistance, nitrofurantoin resistance, trimethoprim-sulfa resistance, piperacillin/tazobactam resistance, moxifloxacin, vancomycin resistance, teicoplanin resistance, penicillin resistance, and macrolide resistance.

10 In a preferred embodiment, the glycopeptide resistance is vancomycin resistance. In another preferred embodiment, the infection is comprised of *S. aureus* exhibiting resistance from either glycopeptide resistance, tetracycline resistance, minocycline resistance, methicillin resistance, vancomycin resistance or resistance to a glycylcycline antibiotic other than tigecycline.

15 In another preferred embodiment, the infection comprises *Acinetobacter baumannii* that may or may not exhibit antibiotic resistance such as cephalosporin resistance, ciprofloxacin resistance, nitrofurantoin resistance, trimethoprim-sulfa resistance, and piperacillin/tazobactam resistance. In another embodiment, the infection is comprised of *Mycobacterium abscessus* that may or may not exhibit moxifloxacin resistance.

20 In treatment of humans and other mammals, tigecycline is most commonly administered intravenously, although other administration paths are available to one of skill in the art. Doses of up to 100 mg administered during a one-hour infusion can be tolerated in human subjects. Twice-daily administrations over nine days of 75 mg or more in 200 ml infusions over one hour to subjects having been fed 30 minutes before infusion resulted in gastrointestinal intolerance in all subjects including nausea and vomiting. Twice-daily administration of 25-50 mg in 200 ml infusions over one hour was tolerated. A single infusion of 100 mg was also tolerated resulting in mean peak serum concentrations of 0.9 to 1.1 micrograms/ml.

30 Administration of 14 mg/kg twice daily to New Zealand White Rabbits resulted in steady levels higher than the minimum inhibitory concentration. See Figure 1. The minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) for tigecycline for the MRSA strain used in this study were less than 0.2 µg/ml and

77
38

0.2 µg/ml, respectively. Measuring the MBC provides a method of determining the efficacy of a compound in killing bacteria. The MBC technique establishes the lowest level of a bactericidal agent that will kill at least 99.9% of the organisms in a standard inoculum.

- 5 MIC and MBC were determined by Mercier *et al.* for tigecycline against vancomycin resistant *E. faecium* to be 0.125 µg/ml and between 16 and 32 µg/ml, respectively. For *S. aureus*, minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations were between 0.25 and 1 µg/ml and 16 and 64 µg/ml, respectively. In a compassionate use study, the inventors found the minimum inhibitory concentration of tigecycline against *M.*
- 10 *abscessus* in a human patient to be 0.25 µg/ml.

In mammals, methicillin-resistant *S. aureus* may be treated with tigecycline in the range of 5 mg/kg to 60 mg/kg twice daily, more preferably 10 mg/kg to 40 mg/kg, more preferably 12 mg/kg to 20 mg/kg. Appropriate dosages for treatment of other pathogens will be apparent to one of skill in the art.

- 15 In a compassionate use study, one human patient suffered from spina bifida with resultant paraplegia. The patient was severely allergic to sulfa drugs and presented with methicillin-resistant bacteremia from infected heel decubitis. The patient also had skin breakdown over the right ischium. The ulcer was debrided, but it did not heal. An MRI revealed osteomyelitis and a section of the bone was positive for infection from
- 20 *Acinetobacter baumannii*.

- The *A. baumannii* was resistant to cephalosporins, ciprofloxacin, nitrofurantoin, and demonstrated intermediate resistance to trimethoprim-sulfa and piperacillin/tazobactam. The organism was susceptible to imipenem, gentamicin, and tobramycin. The patient was treated with meropenem and tobramycin. Meropenem was later replaced with aztreonam
- 25 due to eosinophilia. Aztreonam was later discontinued because of persistent eosinophilia. Tobramycin was also discontinued because of increased creatinine. The patient was then treated with tigecycline for two months with either 50 mg every 12 hours or 50 mg every 24 hours. Within one month of receiving treatment with tigecycline, an MRI showed resolution of the osteomyelitis and marked improvement was seen in fluid collected from
- 30 right ischial area. The patient was reported doing well ten weeks post treatment with tigecycline.

In another compassionate use study, a patient with anhydrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency had a three and one-half year history of vertebral osteomyelitis

28
51

with a *Mycobacterium abscessus* infection. Debridement was accomplished after one year of infection with placement of hardware. The patient showed some improvement with cefoxitan, clarithromycin, and amikacin. The amikacin was later stopped due to renal damage. Linezolid and azithromycin were later added to the treatment regimen. The
5 organism was determined to be resistant to moxifloxacin.

The patient presented later with a new vertebral osteomyelitis just above the site of the old infection. A biopsy was performed and it was determined that no additional debridement was needed. The organism was found to be sensitive only to cefoxitin. It was determined that an additional antimicrobial agent would be helpful and the organism
10 was found to be susceptible to tigecycline. Tigecycline was administered up to MIC 0.25 micrograms/ml. The patient's white blood cell count was normal while hypogammaglobulinemia was present and lymphocytic function decreased. The patient had also been under treatment with IL-12, but IL-12 was held during antibiotic treatment. The patient was reported to be doing well a year after the treatment.

15 Another embodiment of the present invention provides a method of treating infections of the bone, bone marrow, joint and surrounding tissue, and a method for treating osteomyelitis and/or septic arthritis in a mammal, preferably a human, comprising administering to the mammal a pharmacologically effective amount of tigecycline and an
20 antimicrobial agent from the ansamycin family, which includes the rifamycin and the streptovaricin groups of antibiotics. The rifamycin family includes rifampin, rifapentine, rifaximin, and preferably, rifampin. These macrocyclic antibiotics have bactericidal activity because of their propensity for binding to RNA polymerase. These antibiotics are useful in combination with tigecycline because they effect different steps in bacterial
25 production of messenger RNA, tigecycline effects the activity of ribosomes and the production of proteins from the messenger RNA. The mode of action of tigecycline appears to be related to inactivation of the 70S ribosomes through binding to a tetracycline-binding site in the 30S ribosomal subunit with a somewhat different orientation than does tetracycline. (Bauers *et al.*, *J. Antimicrob Chemother.* 2004; 53(4):
30 592-599).

The present inventors have discovered that tigecycline in combination with an antibiotic of the rifamycin class of antimicrobials provides additive antimicrobial effect in infected tissue. In an investigation with rabbits inoculated at the tibia with methicillin-

resistant *S. aureus*, treatment of osteomyelitis with tigecycline in combination with rifampin demonstrated no infection in bone in 10 rabbits while controls showed infection in 11 of 15 rabbits. Treatment in bone marrow also demonstrated no infection in 10 rabbits while controls showed 5 infected rabbits of 15 rabbits tested. Furthermore, treatment of osteomyelitis in rabbits with tigecycline alone demonstrated infection in the bone of one rabbit of 10 and no infection in the marrow.

In mammals, rifampin treatment may be in the range of 10 mg/kg to 100 mg/kg twice daily, more preferable it may be in the range of 20 mg/kg to 70 mg/kg twice daily, more preferably it may be in the range of 30 mg/kg to 50 mg/kg twice daily. In New Zealand White rabbits infected with MRSA, treatment of 40 mg/kg resulted in bactericidal activity. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration levels for rifampin against the MRSA strain were 0.78 µg/ml and 1.56 µg/ml, respectively, yielding a ratio of 0.5.

Human oral administration of rifampin is available with capsules of 150 and 300 mg. Following a single 600 mg dose in healthy human adults, peak serum concentrations averaged 7 micrograms/ml but with wide variance from 4 to 32 micrograms/ml. Administration of 600 mg intravenously to healthy human adults over 30 minutes resulted in mean peak serum concentrations of about 17 micrograms/ml.

Administration of tigecycline is preferably administered intravenously or intramuscularly, while rifampin may be administered intravenously, intramuscularly, orally or by other means of administration known to the art such as transbuccal, intrapulmonary or transdermal delivery systems. Co-administration may include a combination of any of these methods. For example, tigecycline may be administered intravenously while rifampin may be administered orally. Co-administration includes simultaneous or sequential administration, in any order and does not necessarily imply administration at the same time or same day or same time course schedule. Preferably, concentrations of both tigecycline and rifampin are concurrently maintained well above the minimum inhibitory concentration.

In a trial by the inventors, a group of rabbits infected with methicillin-resistant *S. aureus* and treated with tigecycline showed lower colony forming units in bone and marrow than the infected, untreated control group or the group treated with vancomycin at the end of the treatment period. The MIC and MBC for tigecycline (0.2 µg/ml) were lower than that of vancomycin (0.39 µg/ml and 0.78 µg/ml), which is more conducive to

the resolution of osteomyelitic infections. The association of tigecycline and rifampin allowed the complete eradication of bacteria from the bone and marrow, whereas in the vancomycin plus rifampin group a sample was still positive. See Figure 3. Treatment was successful with subcutaneous administration of 14 mg/kg of tigecycline twice daily and oral administration of 40 mg/kg of rifampin twice daily. These data demonstrate that osteomyelitis in rabbits with methicillin-resistant *S. aureus* infection is effectively treated with a combination of tigecycline and rifampin.

Accordingly, given the disclosure presented herein, such as the dose and treatment regimens (i.e. length and mode of administration, and time course of therapy) used in the above described compassionate use studies, typical dose and treatment regimens of common antibiotics administered to patients to treat infections with the listed pathogens, and dose and treatment regimens used in the rabbit study, one skilled in the art would appreciate the appropriate dose and treatment regimen to administer to a mammal to achieve a pharmacologically effective amount of tigecycline and/or additional antimicrobials such as rifampin, to treat osteomyelitis and/or septic arthritis. One skilled in the art would appreciate that factors such as the extent of the infection, overall health, weight, and age of the patient would effect the desired dose and treatment regimen.

The term "pharmacologically effective amount" means, consistent with considerations known in the art, the amount of antimicrobial agent effective to achieve a pharmacologic effect or therapeutic improvement without undue adverse side effects, including but not limited to, inhibition of bacterial growth, reduction in bacterial concentration, reduction in recovery time from infection, improvement, elimination, or reduction of symptoms of infection or other disease such as swelling, necrosis, fever, pain, weakness, and or other indicators as are selected as appropriate measures by those skilled in the art.

Another embodiment of the present invention provides the use of tigecycline with or without an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin (preferably rifampin) for the manufacture of a medicament for treatment infections of the bone, bone marrow, joint and surrounding tissue, and osteomyelitis and/or septic arthritis in a mammal, preferably a human.

Another embodiment provides a pharmaceutical composition for the treatment of infections of the bone, bone marrow, joint and surrounding tissue, and osteomyelitis

and/or septic arthritis in a mammal, preferably a human, comprising tigecycline, with or without an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin (preferably rifampin), and pharmaceutically acceptable diluents, preservatives, solubilizers, emulsifiers, adjuvants and/or carriers conventionally used in pharmaceutical and veterinary formulations. The present pharmaceutical formulations may be adapted for administration to humans and/or animals.

Another embodiment of the present invention provides the use of tigecycline with or without an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin (preferably rifampin) for manufacture of a medicament for treatment of infections of the bone, bone marrow, joint and surrounding tissue, and osteomyelitis and/or septic arthritis in a mammal, preferably a human.

It is to be understood that in the various embodiments of the present invention, tigecycline and/or rifampin or other antimicrobials may be present as pharmaceutically acceptable salts thereof. For example, such salts may include but are not limited to the hydrochloride, sulfate or phosphate salts. They may also include the acetate, citrate or lactate salts, for example.

The medicament or pharmaceutical composition is administered at a dose to achieve a pharmacologically effective amount of the tigecycline and a pharmacologically effective amount of an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin (preferably rifampin). The pharmaceutical composition and/or medicament further comprise pharmaceutically acceptable diluents, preservatives, solubilizers, emulsifiers, adjuvants and/or carriers. These may include but are not limited to, saccharose, mannitol, sorbitol, lecithins, polyvinylpyrrolidones, microcrystalline celluloses, methylcelluloses, carboxymethylcelluloses, hydroxyethylcelluloses, hydroxypropyl celluloses; starches, polyacrylates, ethylcelluloses, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropylmethylcellulose and their derivations, triacetin, dibutylphthalate, dibutylsebacate, citric acid esters, polyethyleneglycols, polypropyleneglycols, polyvinylpyrrolidone, lactose, sucrose, magnesium stearate, talc, or silicone oil.

For oral administration, the pharmaceutical formulations may be utilized as, for example, tablets, capsules, emulsions, solutions, syrups or suspensions. For parenteral administration, the formulations may be utilized as ampoules, or otherwise as suspensions, solutions or emulsions in aqueous or oily vehicles. The need for suspending, stabilizing

42
43

and/or dispersing agents will of course take into account the solubility of the active compounds in the vehicles which are used in particular embodiments. The formulations may additionally contain physiologically compatible preservatives and antioxidants.

The pharmaceutical formulations may also be utilized as suppositories with
5 conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides. Alternatively, the formulations may be made available in a depot form that will release the active composition slowly in the body, over a pre-selected time period.

The following examples are given for the purpose of illustrating various
embodiments of the invention and are not meant to limit the present invention in any
10 fashion.

EXAMPLES

EXAMPLE 1: Treatment of osteomyelitis in rabbits with tigecycline

This example shows the treatment of osteomyelitis in rabbits with tigecycline and
15 tigecycline in combination with rifampin. Comparison studies with vancomycin and the combination of vancomycin with rifampin were also performed. Data demonstrate improved antimicrobial efficacy with tigecycline over vancomycin, and with tigecycline in combination with rifampin over vancomycin in combination with rifampin. Additionally, tigecycline in combination with rifampin provided complete protection against methicillin-
20 resistant *S. aureus* within its test group.

Generation of Standard Curves for Diffusion Bioassays

Normal NZW rabbit serum (Fisher Scientific) and normal, uninfected rabbit tibia bone were used to generate standard curves for tigecycline (Wyeth-Ayerst Research, Pearl
25 River, New York), vancomycin (Abbott Laboratories, Chicago, Illinois), and rifampin (Merrell Pharmaceuticals Inc. Kansas, Missouri). Bioassays were performed with each drug to generate the standard curves for antibiotic concentration in serum and/or tibial bone.

The organism used for the bioassay was *Bacillus cereus* ATCC11778. Serum
30 standards were prepared using two-fold serial dilutions with either antibiotic to yield concentrations of 25 µg/ml to 0.20 µg/ml drug in Normal NZW rabbit serum. Bone eluate standards were prepared for tigecycline by thoroughly cleaning noninfected rabbit tibias with 70% ethanol in a sterilized fume hood. Each tibia was broken into small chips of

approximately 0.5 cm² using a grinder. The chips were placed into a sterile, 50 ml conical centrifuge tube and weighed. One milliliter of sterile, 0.9% normal saline was added for each gram of bone chips. The solution was thoroughly vortexed for two minutes. The resulting bone eluate was allowed to shake at 180 rpm in a cold room at 4°C, for 12 hours.

5 The samples were centrifuged at 4000 rpm for 3 minutes prior to assay, to pellet the chips.

The diameter of the zone of growth inhibition around each well was measured, in millimeters. A standard curve was generated for tigecycline concentration in both serum and bone eluate and for vancomycin in serum by plotting the known antibiotic concentration against its resulting zone of inhibition measurement.

10

Pharmacokinetics of Tigecycline

A baseline group of 6 uninfected rabbits were subcutaneously administered 14 mg/kg tigecycline, reconstituted in sterile water, every 12 hours, for a period of 8 days. Blood samples were drawn at the following approximate intervals, post-initial antibiotic treatment: 1 hour, 3 hours, 6 hours, 12 hours, 171 hours and 180 hours (time of sacrifice). One-half milliliter of blood was collected with standard techniques. Samples were immediately placed into sterile, 1.5 ml centrifuge tubes. Following euthanasia, both tibiae were thoroughly cleansed with 70% ethanol and then harvested, after removal of all soft tissue. Tibias were placed into separate, sterile 50 ml centrifuge tubes and stored at -70°C.

20

Serum samples were stored at -70°C until the bioassay was performed. Bone samples were prepared as previously described. Seeded agar plates were prepared and samples were loaded in triplicate, to the seeded plates and incubated at 30°C for 18 hours. The diameter of the zone of growth inhibition around each well was measured and concentrations of tigecycline were extrapolated from the standard curve.

25

Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration

Determinations

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of tigecycline, vancomycin and rifampin were determined using an antibiotic two-fold tube-dilution method. The minimum bactericidal concentrations were also determined. The limits of sensitivity of this method were 25 µg/ml to 0.20 µg/ml.

30

43
44

44
45

Induction of Tibial Osteomyelitis

A localized *S. aureus* osteomyelitis was percutaneously induced in the left lateral tibial metaphysis of all rabbits within all six study groups. The strain of methicillin-resistant *S. aureus* was obtained from a patient with osteomyelitis undergoing treatment.

5 **Preparation of the Infective Media:** *S. aureus* was incubated overnight in Mueller Hinton Broth (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) medium spiked with 40 µg/ml oxacillin, at 37°C. The bacterial concentration of the culture was adjusted to 10⁷ CFU's/ml.

10 **Rabbit Infection Procedure:** New Zealand white rabbits (Ray Nicholl's Rabbitry, Lumberton, Texas), eight to 12 weeks old and weighing 2.0 to 3.5 kg, were utilized for the study. After anesthesia was given, an 18-gauge needle was inserted percutaneously through the lateral aspect of the left tibial metaphysis into the intramedullary cavity. Next, 0.15 ml of 5% sodium morphuate (American Regent Laboratories, Inc., Shirley, New York), 0.1 ml of *S. aureus* (10⁷ CFU/ml), and 0.2 ml of sterile, normal saline, 0.9%, were
15 injected sequentially. The infection was allowed to progress for 2 weeks, at which time the severity of osteomyelitis was determined radiographically (Table 1).

Treatment Groups: At the end of two weeks, post infection, the rabbits with localized proximal tibial osteomyelitis (confirmed radiographically as Grades 2-4) were separated into six study groups. Group 1 (control group): infected but left untreated for the
20 duration of the study. Group 2: rabbits were treated for 4 weeks with subcutaneous vancomycin at 30 mg/kg twice daily. Group 3: rabbits were treated for 4 weeks with subcutaneous vancomycin at 30 mg/kg twice daily plus oral rifampin at 40 mg/kg twice daily in 0.5% methylcellulose. Group 4: rabbits were treated for 4 weeks with subcutaneous tigecycline at 14 mg/kg twice daily. Group 5: rabbits were treated for 4
25 weeks with subcutaneous tigecycline at the same dose as in the rabbits in Group 4, plus oral rifampin at 40 mg/kg twice daily in 0.5% methylcellulose. Rabbits receiving oral rifampin (Groups 3 and 5) were given an oral nutritional supplement (Ensure Plus®, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio) and a *Lactobacillus spp.* preparation (Kvvet Supply, 3190 N Road, David City, Nebraska) daily. Group 6: rabbits were treated for 1
30 week with subcutaneous tigecycline at the same dose as in Group 4, but were sacrificed 3 hours after administration of the last dose. At that time, blood and infected bone samples were collected and tigecycline concentration was determined. Groups 1 to 5 were left

45
4b

untreated for 2 weeks after treatment phase of the experiment and sacrificed at 8 weeks after infection.

Radiographic Assessment

5 Radiographs of bilateral tibias were taken at initiation of therapy (2 weeks after infection), at the end of antibiotic therapy (6 weeks after infection), and at sacrifice (8 weeks after infection). Radiographs were scored according to a visual scale (Table 1) by three investigators, each blinded to the treatment group, and the grades were averaged.

10 **TABLE 1**
Criteria for Radiographic Osteomyelitis Severity Grading in Rabbits

Grade*	Description of Changes
0	Normal, no change compared with right tibia
1+	Elevation or disruption of periosteum, or both; soft tissue swelling
2+	< 10% disruption of normal bone architecture
3+	10 - 40% disruption of normal bone architecture
4+	> 40% disruption of normal bone architecture

*Visually estimated percentage of disrupted bone.

15 **Determination of Serum Levels of Antibiotic**

Peak and trough levels of antibiotic were determined for Groups 2 and 4 at 1 hour (peak) and 12 hour (trough) after the initial antibiotic administration. See Figures 5A and 5B. Antibiotic concentrations were determined by means of a bioassay. Antibiotic diffusion assay was performed as described above. Concentrations of antibiotic were
20 extrapolated from the respective standard curves.

Determination of Bacterial Concentration per Gram of Bone and Bone Marrow

After sacrifice, gross cultures were performed for right and left tibias. Quantitative counts of *S. aureus*, in CFUs per gram, of left tibial bone and marrow were determined for
25 all study groups.

Culture Preparation: The bone marrow and the intramedullary canal of bilateral tibias were swabbed with sterile cotton tip applicators for gross cultures analysis of left tibias and quality assurance checks of right tibias. The inoculated applicator was streaked onto blood plates and then placed into 5 ml of sterile TSB. The plates and tubes were then
5 incubated at 37°C for 24 hours and growth and/or turbidity was recorded.

The bone marrow was placed into a sterile, 50 ml centrifuge tube and weighed. The bone fragments were broken into 0.5 cm² chips, placed into a sterile, 50 ml centrifuge tube, and the final product weighed. Normal sterile saline, 0.9%, was added in a 3 to 1 ratio (3 ml saline/gram of bone or marrow) and the suspensions were vortexed for 2
10 minutes. Six ten-fold dilutions of each suspension were prepared with sterile, normal saline, 0.9%. Twenty-microliter samples of each dilution, including the initial suspension, was plated, in triplicate, onto blood agar plates and incubated at 37°C for 24 hours. CFUs were counted at the greatest dilution for each tibia sample. The *S. aureus* concentration was calculated in CFUs per gram of bone or bone marrow. The calculated resultant was
15 multiplied by 3 for bone samples and by 4 for bone marrow, in order to account for their initial dilutions in saline and for the adsorption of marrow into the saline. The mean log of the *S. aureus* concentration for each was calculated.

Statistical Analysis of Experimental Data

20 The standard deviation and standard error of the mean were calculated for all raw data, including disc diffusion measurements, weight variances, radiograph grades, and bacterial counts. Linear regression analysis, least squares method, were performed for the antibiotic diffusion standard curves using the base ten log of the antibiotic concentrations to plot the concentration (in µg/ml) versus the zone of inhibition measured (in
25 millimeters). All subsequent diffusion measurements were extrapolated to micrograms/milliliter of antibiotic concentration from the standard curve utilizing the slope and y-intercept values derived from the least squares calculations.

Minimum Inhibitory Concentrations and Minimum Bactericidal Concentrations

30 For the strain of methicillin-resistant *S. aureus* (inoculum of 10⁶ CFU/ml) used in the study, the minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations for tigecycline were less than 0.2 µg/ml and 0.2 µg/ml, respectively. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration levels for

47
20

vancomycin were 0.39 µg/ml and 0.78 µg/ml, respectively, yielding MIC/MBC ratio of 0.5. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentrations levels for rifampin were 0.78 µg/ml and 1.56 µg/ml, respectively, yielding a ratio of 0.5.

5 Drug Kinetic Levels in Bone and Serum

All concentrations of antibiotic were derived from the respective standard curves. The logarithmic trends of the concentrations of tigecycline (14 mg/kg twice daily) in the sera of uninfected animals group are shown in Figure 1. The tigecycline, as depicted in Figure 1, eliminated slowly, maintaining a steady level higher than MIC (0.2 µg/ml) by 12
10 hour (trough). Peaks and troughs of tigecycline (14 mg/kg twice daily) and vancomycin (30 mg/kg twice daily) in the serum of infected rabbits after administration of the respective drugs are shown in Figures 5a and 5b. The bone concentrations of tigecycline (14 mg/kg, Bid) in the infected rabbits group were measured separately in the infected tibia at the end of treatment, in which they averaged 0.78 µg/ml +/- 0.01 µg/ml, and in the
15 uninfected tibia, in which they averaged 0.49 µg/ml +/- 0.01 µg/ml. The difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Radiographic Findings

A stage 2 to 4 osteomyelitis, according to Table 1, was induced in all the infected
20 animals. The initial radiographic grades were similar between the groups. The average grades for tigecycline, tigecycline + rifampin and vancomycin + rifampin groups at t=14 days were significantly greater than the average grades at t=56 days ($p < 0.05$). The control group showed the least amount of improvement radiographically (0.2 +/- 0.2 or 9.1%), when compared with vancomycin (0.5 +/- 0.2 or 25%), with tigecycline (0.9 +/- 0.1 or
25 40.9%), with vancomycin + rifampin (0.9 +/- 0.1 or 40.9%) or with tigecycline + rifampin (0.8 +/- 0.1 or 40.0%) groups.

Figure 2 depicts the average radiographic severity for each group at t=14 and t=56 days. At the end of the study (t=56 days), average radiographic grades were compared between different groups. The average grades for tigecycline group, tigecycline +
30 rifampin group and vancomycin + rifampin group at t=56 days were significantly lower than the average grades for the control group at t=56 days ($p < 0.05$). The key for figure 2 is as follows: Control = control group, no treatment; Vancomycin = subcutaneous vancomycin treated group; Van + Rifam = subcutaneous vancomycin with oral rifampin

treated group; Gar-936 = subcutaneous Gar-936 treated group; Gar + Rifam = subcutaneous Gar-936 with oral rifampin treated group.

Bone Cultures

- 5 A high percentage of tibias from untreated infected controls (n=15) revealed positive cultures (80%) for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a mean concentration of 9.21×10^4 CFU/g bone. When compared to untreated controls, the vancomycin group (n=11), tigecycline group and tigecycline + rifampin group all demonstrated a significantly lower percentage of positive methicillin-resistant
- 10 *Staphylococcus aureus* infection. In the vancomycin group, or 2 out of 11 samples (18.2%) were positive for MRSA, and the average bacterial concentration of the group was 1.4×10^2 CFU/ gram bone ($p < 0.05$). In the tigecycline group, 1 out of 10 samples was positive for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the average bacterial concentration in the group was 20 CFU/ gram bone, which is lower than either the controls
- 15 or the vancomycin group ($p < 0.05$). One rabbit in vancomycin + rifampin group showed higher bacteria concentration than the control. The rabbits receiving tigecycline + rifampin treatment group demonstrated complete eradication of bacteria from the tibia (0.0 CFU/ gram bone in all the samples). Figure 3 compares the CFU/gram marrow and bone between all groups. Figure 3 demonstrates that tigecycline and tigecycline in combination
- 20 with rifampin were an effective treatment for infection of the bone and infection of the marrow with respect to controls.

- The key for figure 3 is as follows: Control = control group, no treatment; Vancomycin = subcutaneous vancomycin treated group; Gar-936 = subcutaneous Gar-936 treated group; Vancomycin + Rifampin = subcutaneous vancomycin with oral rifampin
- 25 treated group; Gar-936 + Rifampin = subcutaneous Gar-936 with oral rifampin treated group.

Adverse Events

- Of the 66 infected rabbits, a total of 6 died before completion of treatment. Of the
- 30 5 rabbits that died in the tigecycline treatment group, one of them was euthanized at day 19 because of severe impairment of nutritional status. Another rabbit died at the day 17 of tigecycline treatment due to gastroenterocolitis. Three of the rabbits in this group died at day 28 due to gastroenterocolitis and intolerance to anesthesia. One rabbit in the

tigecycline + rifampin group died during treatment at day 15 due to gastroenterocolitis. The gastroenterocolitis was most likely caused by alteration of the normal flora of the large intestine. All rabbits were monitored weekly for weight variance. The control group showed the greatest mean gain (0.58 kg +/- 0.27), vancomycin the second greatest (0.39 kg +/- 0.26), vancomycin + rifampin group the third (0.21 kg +/- 0.32). Tigecycline group (-0.05 kg +/- 0.32) and tigecycline + rifampin (-0.39 +/- 0.31) group both lost weight after the antibiotic treatment. Nearly all rabbits in the tigecycline group and tigecycline + rifampin group presented with mild to severe symptoms of gastric dysfunction approximately 1.0-1.5 weeks post-antibiotic initiation, including decreased appetite, dehydration, diarrhea, and/or weight loss. Figure 4A and B show the weight variances between all the groups. The key for figures 4A and B is as follows: Control = control group, no treatment; Vancomycin = subcutaneous vancomycin treated group; Vanco + Rifampin = subcutaneous vancomycin with oral rifampin treated group; Gar-936 = subcutaneous Gar-936 treated group; Gar-936 + Rifampin = subcutaneous Gar-936 with oral Rifampin treated group.

As for the safety, a higher number of deaths and side effects were seen in the groups of rabbits treated with tigecycline. Enterocolitis due to tigecycline may be caused by an extensive destruction of the normal microbial flora of the bowel. The symptoms were attenuated by the administration of oral probiotics. The broad antimicrobial spectrum of tigecycline, in contrast with the narrower spectrum of vancomycin, may help explain the difference observed between the treatment groups.

Results

The count data for each animal in each tissue are listed in Table 2. The counts in the table are averages of triplicate measurements made on each tissue. Inspection of the data in Table 2 reveals that in treatment groups treated with test articles, the counts in most or all animals were 0. In the control group, non-zero counts were measured in marrow from 5 of 15 animals and in bone from 11 of 15 animals. There was considerable variation in the magnitude of the non-zero counts in the control groups, especially for bone.

The number of positive and negative cultures in each treatment group, and the p-values resulting from comparisons to control were as follows:

50
51

TABLE 2
Count of Colony Forming Units Per Gram of Bone and Marrow from Osteomyelitis Study In Rabbits

Treatment Group	Counts (CFU/gm)	Counts (CFU/gm)
	Marrow	Bone
Control 1	0	238
2	0	0
3	83,000,000	97
4	0	0
5	0	5000
6	0	2380
7	610,000	100000
8	22,000	1000
9	0	0
10	0	50
11	1700	1,100,000
12	0	0
13	4400	10,8000
14	0	72.9
15	0	106.3
Tigecycline 1	0	178.6
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

5/2

Treatment Group	Counts (CFU/gm) Marrow	Counts (CFU/gm) Bone
Tigecycline +	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
Vancomycin 1	1250	270.3
2	0	1315.8
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0

52
63

Treatment Group	Counts (CFU/gm) Marrow	Counts (CFU/gm) Bone
Vancomycin +	0	0
2	530,000,000	1,040,000
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

Data from Rabbit osteomyelitis comparison of tigecycline, vancomycin, and rifampin

5 In marrow, the proportion of positive cultures in the tigecycline and tigecycline +
rifampin treatment groups was 0, which in comparison to the proportion of 0.33 (5/15) in
the control group was almost statistically significant ($p=0.06$) at the conventional $p=0.05$
level. The proportions in the vancomycin and vancomycin + rifampin groups were not
statistically significantly different from the control group. In bone, the proportion of
10 positive cultures in each of the groups treated with test articles was statistically
significantly lower than the proportion in the control group.

 In an animal model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, endocarditis, 14
mg/kg bid tigecycline was shown to be more effective than 40 mg/kg vancomycin
(Murphy, *Antimicrob Agents Chemoth* 2000; 44(11): 3022-3027). In a rat model,
15 dosages as high as 80 mg/kg/day were administered. However, in the rabbit model used
herein, the administration of dosages higher than 14 mg/kg per day caused relevant
morbidity and mortality in the animals (data not shown). Therefore, the above cited
dosage was used in this study. Even though the goal was not to study the
pharmacokinetics of tigecycline in rabbits, some drug levels measurements were
20 performed in order to ensure that an adequate dosage was being used in the animal model.
The data confirm that drug levels in serum were still above the MIC of the staphylococcal

53
54

strain used 12 hours after the last administration. Moreover, the drug has displayed a relevant bone penetration, and therapeutic levels of tigecycline have been found in the infected and uninfected bone. The higher concentration of drug found in the infected bone is another relevant finding, which requires further study.

5

EXAMPLE 2: Distribution of Tigecycline in Human Tissue after One Intravenous Administration of 100 mg.

This example shows the penetration of selected tissues in human subjects after a single intravenous administration of tigecycline. The data demonstrate a rapid distribution phase, with a prolonged half-life and a high volume of distribution at steady state. They further establish the penetration of bone, synovial fluid, lung, gall bladder, and colon in human subjects. Penetration improves treatment of bone and joint infections.

Studies of the pharmacokinetics of intravenous tigecycline in humans have shown that there is a rapid distribution phase, with a prolonged half-life (40 to 60 hours) and a high volume of distribution at steady state. Animal studies with radiolabeled tigecycline suggest that this rapid distribution phase and high volume of distribution at steady state represent penetration of tigecycline into tissues including lung and bone. Sprague-Dawley rats (18 males) were given carbon-14 tigecycline at a dosage of 3 mg/kg by 30-minute infusion. Concentrations or radioactivity were determined in tissues of 3 rats/time point at the end of the infusion and at 1, 8, 24, 72, and 168 hours after the end of infusion. For all tissues, peak radioactivity concentration were observed at the end of infusion. In general, radioactivity was well distributed to most tissues, with the highest concentrations as follows: bone>bone marrow>salivary gland, thyroid, spleen, and kidney. In each of these tissues, the ratio of area under the concentration-time curve in tissue to area under the concentration-time curve in plasma was >10.

The objective of this study was to determine the tissue and corresponding serum concentration of tigecycline at selected time points in lung, colon, gallbladder tissues, bone, and synovial fluid. Samples were taken from subjects scheduled for lung, colon, gallbladder, or bone surgery, or a lumbar puncture who were given a single dose of tigecycline administered intravenously.

Pre-specified tissue/fluid sampling of either lung, colon, gallbladder, bone, and synovial fluid was performed on each subject during surgery at 4 hours, 8 hours, 12 hours, or 24 hours after the start of a single dose of 100 mg tigecycline administered over 30

54
55

minutes. Serum was collected from all subjects at hour 0 (before the first dose), approximately 30 minutes (end of infusion), and at the time corresponding to tissue/fluid collections. Tissue and serum concentration was determined according to the method set forth below.

5

Investigational Parameters for Serum Samples

Samples of human serum and tissue from study subjects who had received tigecycline were analyzed according to methods that had been previously validated. Serum samples and synovial fluid (0.2 ml) were mixed with 0.6 ml internal standard in acetonitrile, the supernatant evaporated to dryness and the residue reconstituted in 200 microliters mobile phase. Aliquots (10 microliters) of the reconstituted samples were injected into an LC/MS/MS.

10

The data was acquired by and analyzed on PE SCIEX "Analyst" version 1.3 software. Linear regression, with $1/x^2$ weighting was used to obtain the best fit of the data for the calibration curves. The lower limit of quantitation was 10 ng/ml for serum and synovial fluid samples, 10 ng/g for the colon and gall bladder samples, and 30 ng/g for the bone samples.

15

Quality control samples (2 sets) at low (25 ng/ml), medium (500 ng/ml) and high (1500 ng/ml), prepared in human serum, were analyzed with each set of serum samples. For colon, gall bladder and lung samples, two sets of quality control samples at 25, 500, and 1500 ng/g were analyzed with each set of tissue samples. For bone, two sets of quality control samples at 100, 500, and 1500 ng/g were analyzed with each set of tissue samples.

20

The curves were linear in the range from the 10 to 2000 ng/ml for serum and synovial fluid and from the lower limit of quantitation to 2000 ng/g for tissues. A run was considered successful if no more than two quality control samples were outside the range of 85-115% of target and no two quality control samples at the same concentration were outside that range. If two quality control samples at the same concentration were outside that range, only concentrations between the remaining quality control samples were reported.

25

30

85
50**Materials and Methods for Serum Samples**

Tigecycline was measured in human serum using an LC/MS/MS method. The primary stock solution of tigecycline was prepared at 1 mg/ml by dissolving in methanol. A secondary stock solution was prepared from the primary stock solution by diluting to a concentration of approximately 40,000 ng/ml with acetonitrile. The stock solutions were stored at -20 °C when not in use. A primary internal standard solution of tert-butyl-d9-tigecycline was prepared at a concentration of 1 mg/ml in methanol. A secondary internal standard stock solution was prepared by diluting the primary stock solution to a concentration of 100 micrograms/ml in acetonitrile with 0.1% trifluoroacetate added. The primary and secondary stock solutions were stored at -20 °C. The working internal standard was prepared by diluting to volume with acetonitrile/0.1% trifluoroacetate. The working internal standard was stored at 4 °C when not in use. On the day of analysis, the secondary stock solution was brought to room temperature before use to prepared the standard curve working solutions. The standard curve was prepared at approximately 2000, 1600, 1000, 500, 250, 100, 50, 20, and 10 ng/ml by serial dilution in blank human serum.

The extraction procedure was as follows: to 200 microliters of calibrator, quality control or sample was added 600 microliters of internal standard working solution and vortex mixed. The samples were centrifuged for 10 minutes at 13000 rpm to separate the layers and the supernatant was transferred to a culture tube. The samples were evaporated to dryness in a Speed Vac. The residues were reconstituted by sonicating in 200 microliters of mobile phase and 10 microliters was injected in the LC/MS/MS.

The LC/MS/MS was composed of HPLC (Agilent 1100), Mass Spectrometer (Applied Biosystems API3000), Column (Aquasil C18, 50 x 2.1 mm i.s., 5micron (ThermoKeystone) with mobile phase of 16% acetonitrile, 6% methanol, 78% water, and 0.1% tetrafluoroacetate, flow rate approximately 0.35 ml/min, injection volume 10 microliters, Detector Conditions: 119 scans in period, MRM scan type, positive polarity, turbo ion spray source, at low resolution, using nitrogen at 6 psi as a nebulizer gas, a curtain gas, and a collision gas, with ion energy at 4500 mv, and ionspray temperature at 450 °C. The detector monitored tigecycline and the internal standard.

Samples were analyzed over three analytical runs. On each day of sample analysis, a complete standard curve was run, along with quality control samples and study subject samples. Samples that had a measured concentration greater than the highest calibrator

56
57

were diluted by mixing 100 microliters sample with 900 microliters blank human serum and analyzing 200 microliters of the mixture as previously described. Quantification of tigecycline in serum was achieved by comparison to a standard curve prepared in the appropriate matrix and calculated using a $(1/\text{concentration})^2$ weighting factor.

5 The limit of quantitation for tigecycline was 10 ng/ml. No peaks interfering with the determination of any of the tigecycline isomers were detected in any of the pre-dose samples. All calibrators and quality control samples were within range (85-115% of target). Results of samples are presented in Table 1. Results of standard curves and calibrators are presented in Table 4.

10

Investigational Parameter for Tissue Samples

Stock solution and internal standard solution was prepared as per investigation parameters for serum samples above. The standard curve working solutions were prepared at approximately 10000, 8000, 5000, 2500, 500, 250, 100, and 50 mg/ml. On the day of
15 analysis, 40 microliters of the working solutions were added to 200 mg of tissue to produce calibrators at 2000, 1600, 1000, 500, 250, 100, 50, 20, and 10 ng/ml. Canine tissue was substituted for human tissue to prepare the calibrators and quality control samples. Because of the limited availability of canine gall bladder, canine colon was used to prepare the standard curve for the analysis of human gall bladder. Colon was shown to
20 be an appropriate substitute matrix for the analysis of gall bladder samples.

The extraction procedure was as follows: to 200 mg of calibrator, quality control or sample was added 3 ml of internal standard working solution and samples were homogenized using a hand homogenizer. The samples were centrifuged for 10 minutes at 14000 rpm to separate the layers and the supernatant was transferred to a centrifuge tube.
25 The samples were evaporated to dryness in a Speed Vac. The residues were reconstituted by sonicating in 200 microliters of mobile phase and 10 microliters was injected into the LC/MS/MS. LC/MS/MS conditions were the same as those used to analyze serum samples. Synovial fluid samples were extracted in the same manner as serum samples.

Samples were analyzed over several analytical runs. On each day of sample
30 analysis, a complete standard curve was run, along with quality control samples and tissues. The standard curve was prepared in the substitute matrix appropriate to the tissue samples being analyzed. Samples which had a measured concentration greater than the highest calibrator (200 ng/g) were homogenized with internal standard at 10 or 20 times

57
58

the concentration use for the standard curve. An aliquot (300 microliters) (10 fold dilution) was evaporated to dryness and the samples were reconstituted so that the peak area ratios and peak areas were within the range of the standard curve.

Quantification of tigecycline in tissues was achieved by comparison to a standard curve prepared in the appropriate matrix and calculated using a $(1/\text{concentration})^2$ weighting factor. For synovial fluid, the calibrators were prepared in phosphate-buffered saline. A second set of calibrators was prepared in an artificial synovial fluid composed of the following components: 100 mmol/L glucose, 2.03-2.26 g/L hyaluronate and approximately 8 g/L albumin adjusted to pH 7.4. The calibration curve prepared in PBS and the recovery, a correction factor was calculated by performing a linear regression of determined concentrations of artificial synovial fluid samples from the PBS curve versus the theoretical concentration of those samples using a power equation ($y=y_0+ax^b$). Because the determined concentration of study subject samples was in the low range of the calibration curve, only the calibrators from 20 to 500 ng/ml were used to calculate this regression. The results of this regression showed a strong correlation ($r^2 = 0.9996$) and back-calculated concentrations of the ASF calibrators were between 94 and 122% of their target values over the complete range of the standard curve (20-2000ng/ml). The regression equation was then applied to the concentrations of study subject samples from the PBS standard curve and the corrected concentration of tigecycline in synovial fluid samples was determined.

The limit of quantitation for tigecycline was 10 ng/ml. Measurable concentrations of tigecycline were found in all matrices analyzed. All calibrators and quality control samples at concentrations similar to the samples were within range (85-115% of target). Results of samples are presented in Table 4 (tissues) and Table 5 (synovial fluid).

Results

The data demonstrate a rapid distribution phase, with a prolonged half-life and a high volume of distribution at steady state. They further establish the penetration of bone, synovial fluid, lung, gall bladder, and colon in human subjects. Additionally, concentrations in synovial fluid show rapid distribution and prolonged retention of tigecycline as compared to data from serum at similar times.

TABLE 3

Results of Serum Analysis

Calculated			Calculated			Calculated		
Sample Concentration Time			Sample Concentration Time			Sample Concentration Time		
ID.	ng/ml	Hour	ID.	ng/ml	Hour	ID.	ng/ml	Hour
1A	BQL	0	22A	BQL	0	40A	BQL	0
1B	5450	0.5	22B	1510	0.5	40B	1450	0.5
1C	81.6	24	22C	251	4	40C	86.6	24
2A	BQL	0	23A	BQL	0	41A	BQL	0
2B	1080	0.5	23B	1530	0.5	41B	2580	0.5
2C	151	4	23C	74.4	24	41C	191	12
4A	BQL	0	24A	BQL	0	42A	BQL	0
4B	1490	0.5	24B	1650	0.5	42B	789	0.5
4C	175	4	24C	85.6	12	42C	198	8
5A	BQL	0	25A	BQL	0	43A	BQL	0
5B	1100	0.5	25B	3550	0.5	43B	1150	0.5
5C	116	12	25C	136	4	43C	77.4	24
6A	BQL	0	26A	BQL	0	44A	BQL	0
6B	1170	0.5	26B	878	0.5	44B	954	0.5
6C	113	12	26C	128	12	44C	144	4
7A	BQL	0	27A	BQL	0	45A	BQL	0
7B	1640	0.5	27B	847	0.5	45B	894	0.5
7C	97.2	12	27C	76.9	12	45C	299	4
8A	BQL	0	28A	BQL	0	46A	BQL	0
8B	1710	0.5	28B	922	0.5	46B	1420	0.5
8C	186	4	28C	120	12	46C	66.6	24
9A	BQL	0	29A	BQL	0	47A	BQL	0
9B	1860	0.5	29B	5190	0.5	47B	447	0.5
9C	221	4	29C	147	4	47C	252	4
10A	BQL	0	30A	BQL	0	48A	BQL	0
10B	27400	0.5	30B	1190	0.5	48B	976	0.5
10C	244	4	30C	50.8	24	48C	86.9	24
11A	BQL	0	31A	BQL	0	49A	BQL	0
11B	1320	0.5	31B	2320	0.5	49B	1200	0.5
11C	47.2	12	31C	166	4	49C	102	12
12A	BQL	0	32A	BQL	0	50A	BQL	0
12B	6950	0.5	32B	1550	0.5	50B	1430	0.5
12C	54.4	24	32C	42.1	24	50C	186	8
15A	BQL	0	33A	BQL	0	51A	BQL	0
15B	1960	0.5	33B	620	0.5	51B	726	0.5
15C	250	4	33C	43.7	24	51C	44.7	24
16A	BQL	0	34A	BQL	0	52A	BQL	0
16B	741	0.5	34B	4080	0.5	52B	821	0.5
16C	107	12	34C	92.7	12	52C	125	4
17A	BQL	0	35A	BQL	0	53A	BQL	0
17B	1110	0.5	35B	2430	0.5	53B	1060	0.5
17C	51	24	35C	53.6	24	53C	209	4
18A	BQL	0	36A	BQL	0	54A	BQL	0
18B	761	0.5	36B	2300	0.5	54B	1850	0.5
18C	133	8	36C	65.7	24	54C	206	8
19A	BQL	0	37A	BQL	0	55A	BQL	0
19B	1240	0.5	37B	2415	0.5	55B	628	0.5
19C	162	4	37C	95.7	12	55C	431	4
20A	BQL	0	38A	BQL	0			
20B	903	0.5	38B	4600	0.5			

89
60

20C	104	12	38C	106	12
21A	BQL	0	39A	BQL	0
21B	870	0.5	39B	5130	0.5
21C	778	4	39C	342	4

5

* BQL = below quantitative limits

80
61

TABLE 4

Results of Tissue Analysis Calculated			*BQL = below quantitative limits of the assay (<33.2 ng/ml)
	Sample	Concentration	
	I.D.	(n2/2)	Tissue
5	001	8210	Gall Bladder
	002	1560	Gall Bladder
	004	41.6	Bone
	005	20700	Gall Bladder
10	006	46.5	Bone
	007	13.3	Bone
	008	79.3	Bone
	009	1890	Lung
15	010	141	Bone
	011	7640	Gall Bladder
	012	BQL	Bone
	013	8480	Gall Bladder
20	014	524	Gall Bladder
	017	43.3	Bone
	018	3750	Gall Bladder
	019	18900	Gall Bladder
25	020	269	Bone
	021	86.6	Colon
	022	50.0	Bone
	023	1180	Gall Bladder
30	024	BQL	Bone
	025	1550	Gall Bladder
	026	91.2	Colon
	027	BQL	Bone
35	028	598	Colon
	029	3240	Gall Bladder
	030	BQL	Bone
	031	5960	Gall Bladder
40	032	938	Gall Bladder
	033	BQL	Bone
	034	3480	Gall Bladder
	035	778	Gall Bladder
45	037	3850	Gall Bladder
	038	BQL	Bone
	039	198	Colon
	040	1500	Gall Bladder
50	041	106	Colon
	042	238	Gall Bladder
	043	995	Colon
	044	725	Colon
55	045	814	Colon
	046	BQL	Bone
	047	453	Colon
	048	BQL	Bone
	050	618	Colon
	051	653	Lung
	052	35.5	Bone
	053	BQL	Bone
	054	36.1	Bone
	055	118	Colon

62 91

TABLE 5

Results of Synovial Fluid Analysis			
Calculated			
Sample Concentration Time I.D.			
5		(ng/ml)	(Hour)
	4	39.9	4
	6	62.8	12
	8	159	4
10	10	130	4
	12	46.4	24
	20	111	12
	22	181	4
15	24	65.0	12
	30	37.6	24
	33	25.9	24
	38	65.7	12
20	46	55.4	24
	48	45.0	24
	52	70.6	4
	54	70.9	8

EXAMPLE 3: Tissue Distribution in Rats Treated with Tigecycline

This study was conducted to quantitate [¹⁴C]-tigecycline-derived radioactivity in tissues by whole body autoradiography using phosphor imaging, following a single 30-minute 3 mg/kg intravenous infusion of [¹⁴C]-tigecycline to male Sprague-Dawley and Long-Evans rats.

Materials and Methods

Tigecycline was supplied by the Analytical Department, Wyeth-Ayerst Research, Montreal, Canada. [¹⁴C]-tigecycline was supplied by Amersham (Boston, MA). Radiochemical purity and specific activity of bulk [¹⁴C]-tigecycline was 98% and 93.6 microCi/mg, respectively.

Sterile water was used to make the intravenous dosing solution. The liquid scintillation cocktail used in counting the radioactivity in plasma and urine was Ultima Gold (Packard Instruments Co., Meriden, CT).

A Model 3078 Tri-Carb Sample Oxidizer equipped with an Oximate-80 Robotic Automatic Sampler (Canberra-Packard Co., Downers Grove, IL) was used for combustion of blood samples. Permafluor E liquid scintillation cocktail (Packard Instruments Co., Meriden, CT), Carbo-Sorb-E (Packard Instruments Co., Meriden CT) carbon dioxide absorber and de-ionized water were used to trap radioactive carbon dioxide generated by

62
63

combustion of the sample in the oxidizer. Blood aliquots were transferred to combustor cones and cover pads (Canberra-Packard Co., Downers Grove, IL) for combustion.

All radioactivity determinations (dose, blood and plasma) were made using a Tri-Carb Model 2700 TR liquid scintillation counter (Canberra-Packard Co., Downers Grove, IL) with an Ultima Gold or toluene standard curve. Counts per minute (CPM) were converted to disintegrations per minute (DPM) by use of external standards of known radioactivity. The quench of each standard was determined by the transformed spectral index of an external radioactive standard (TSIE). The lower limits of detection were defined as twice background.

Male Sprague-Dawley and Long-Evans rats were obtained from Charles River Breeding Laboratories, Raleigh, NC, and were quarantined for at least one week prior to the start of the study. The intravenous dosing solution (1.02 mg/ml) was prepared by dissolving 6.90 mg of unlabeled tigecycline and 5.30 mg of [^{14} C]-tigecycline in 12 ml sterile water. The dosing solution was diluted and radioassayed directly in Ultima Gold scintillation counting cocktail (Packard Inc.). All determinations of total radioactivity were made with a Packard 2700 TR liquid scintillation spectrometer (Canberra-Packard Co.).

The rat body weights ranged from 0.206 to 0.301 kg. All rats received a single 30 minute intravenous infusion dose of [^{14} C]-tigecycline via a jugular vein canula, (3 ml/kg, 3 mg/kg as active moiety, 40 microCi/kg) using a Harvard infusion pump 22 (Harvard Apparatus, Southnatick, MA). All pumps were calibrated prior to the administration of the compound. Rats were anesthetized with isoflurane prior to cardiac puncture exsanguination at the prescribed times after dosing. Sprague-Dawley and Long-Evans rats were sacrificed one per time point at 0.5, 8.5, 24, 72, 168 and 336 hr post-dose.

Control whole blood was collected from male Sprague-Dawley rats into tubes containing sodium heparin. Pooled blood was used to prepare the calibration standards and quality control samples. The standards were used to construct the standard curve for the quantification of radiolabeled drug distribution in tissues of whole blood cryosections. The quality controls, which were embedded in the same CMC block with each rat, were used for assessing intra- and inter-section variation in the thickness of rat whole-body cryosections.

A 200 microCi/ml stock solution of [^{14} C]-glucose (New England Nuclear, Boston, MA) was serially diluted with whole blood from male Sprague-Dawley rats to obtain

62
63

combustion of the sample in the oxidizer. Blood aliquots were transferred to combustor cones and cover pads (Canberra-Packard Co., Downers Grove, IL) for combustion.

All radioactivity determinations (dose, blood and plasma) were made using a Tri-Carb Model 2700 TR liquid scintillation counter (Canberra-Packard Co., Downers Grove, IL) with an Ultima Gold or toluene standard curve. Counts per minute (CPM) were converted to disintegrations per minute (DPM) by use of external standards of known radioactivity. The quench of each standard was determined by the transformed spectral index of an external radioactive standard (TSIE). The lower limits of detection were defined as twice background.

Male Sprague-Dawley and Long-Evans rats were obtained from Charles River Breeding Laboratories, Raleigh, NC, and were quarantined for at least one week prior to the start of the study. The intravenous dosing solution (1.02 mg/ml) was prepared by dissolving 6.90 mg of unlabeled tigecycline and 5.30 mg of [^{14} C]-tigecycline in 12 ml sterile water. The dosing solution was diluted and radioassayed directly in Ultima Gold scintillation counting cocktail (Packard Inc.). All determinations of total radioactivity were made with a Packard 2700 TR liquid scintillation spectrometer (Canberra-Packard Co.).

The rat body weights ranged from 0.206 to 0.301 kg. All rats received a single 30 minute intravenous infusion dose of [^{14} C]-tigecycline via a jugular vein canula. (3 ml/kg, 3 mg/kg as active moiety, 40 microCi/kg) using a Harvard infusion pump 22 (Harvard Apparatus, Southnatick, MA). All pumps were calibrated prior to the administration of the compound. Rats were anesthetized with isoflurane prior to cardiac puncture exsanguination at the prescribed times after dosing. Sprague-Dawley and Long-Evans rats were sacrificed one per time point at 0.5, 8.5, 24, 72, 168 and 336 hr post-dose.

Control whole blood was collected from male Sprague-Dawley rats into tubes containing sodium heparin. Pooled blood was used to prepare the calibration standards and quality control samples. The standards were used to construct the standard curve for the quantification of radiolabeled drug distribution in tissues of whole blood cryosections. The quality controls, which were embedded in the same CMC block with each rat, were used for assessing intra- and inter-section variation in the thickness of rat whole-body cryosections.

A 200 microCi/ml stock solution of [^{14} C]-glucose (New England Nuclear, Boston, MA) was serially diluted with whole blood from male Sprague-Dawley rats to obtain

fourteen standards at the following concentrations: 832, 485, 250, 122, 48.6, 24.3, 12.0, 4.72, 2.36, 0.853, 0.638, 0.405, 0.327, and 0.221 nCi equiv./ml. The low, mid and high GCs concentrations were 12.39, 25.9 and 508 nCi equiv./ml.

5 Immediately following euthanasia, each rat was totally immersed in a bath of hexane and dry ice (-75 °C) until frozen. Each carcass was dried and stored at -30 °C until embedded. Each animal was embedded in a mold (15 cm x 45 cm) by adding low viscosity, 10% carbosymethylcellulose (CMC) and frozen by placing the stage in a hexane-dry ice mixture.

10 Frozen blocks were transferred to the Jung Cryomacrocut 3000 (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) and allowed to equilibrate overnight to the cryotome internal temperature for at least 12 hours before sectioning.

15 Each frozen rat was sagittally sectioned at -20 °C. A sufficient number of sections were collected to ensure sampling of all tissues of interest. The sections were dehydrated overnight in a cryochamber and then rapidly transferred to a dessicator containing CaSO₄ to prevent condensation of atmospheric moisture while equilibrating to room temperature. The sections were mounted on cardboard and labeled with [¹⁴C]-labeled black ink with a unique identification number. Radioactive ink was prepared with equal volumes of India Ink and [¹⁴C]-CL-284846 (100 microCi/ml). A small piece of Scotch tape was placed over the dried radioactive ink to prevent the contamination of the storage phosphor screens.

20 Phosphor imaging plates, BAS-SR 2025 (Fuji Photo Film Co., Japan) were exposed to bright visible light for 20 minutes using an IP eraser (Raytest, USA Inc., New Castle, DE) to remove background radiation. Sections and calibration blood standards were concurrently placed in direct contact with IPs and exposed for 7 days. All sections were stored at room temperature in a lead shielding box to minimize background levels. 25 Phosphor images were generated using a Fujifilm BAS-5000 Bio-Imaging Analyzer and quantitated by MCID M2 Software, version 3.2 (Imaging Research Inc., St. Catharines, Ontario, Canada). The STDs and QCs were analyzed using the circular sampling tool in the MCID software program. Areas of interest in whole-body sections were manually outlined with the regional sampling tool to generate count data.

30 Radioactive concentrations in select tissues were determined by digital analysis of the resulting autoradiograms on the basis of a calibration curve. A calibration curve of stated concentrations (nCi/g) verses MCID response, photostimulated light/mm² (PSL/inm²-minus background converted to nCi/g) for each standard was generated by weighted

64
65

($1/x^2$) linear regression analysis. The linear regression curve was then used to determine the concentration of unknown radioactivity of study samples. The regions of interest (ROI) which visually exhibited levels of radioactivity were individually outlined or autoscanned with sampling tools to obtain radioactivity concentrations. To determine the limit of quantitation for QWBAR, coefficients of variation from blood standards tested were determined, and the limit of quantitation was defined as the lowest concentration at which the coefficients of variation did not exceed 15%.

Plasma aliquots were combined with 10 ml of Ultima Gold™ scintillation counting cocktail (Packard Inc.) and directly counted. Blood samples were combusted using a Model 307 sample oxidizer (Packard Instrument Company). The resulting [^{14}C]O₂ was trapped in Carbo-Sorb®, scintillation cocktail (PermaFlour®E+) was added, and the samples were quantitated by LSC.

Samples were counted in a Packard 2700 TR liquid scintillation spectrophotometer (Canberra-Packard Co.) for 10 minutes or 0.2 sigma. Counts per minute were converted to disintegrations per minute by use of a quench curve generated from external standards of known radioactivity. The quench of each standard and sample were determined by full spectral shift. Limit of quantitation (LOQ) for LSC was defined as two times background.

The pharmacokinetic parameters for [^{14}C]-GAR-936-derived radioactivity were calculated using the intravenous infusion (Model 202), Non-Compartment Analysis Module of WinNonlin. ver. 1.1, (Scientific Consultants, Inc. Research Triangle Park, NC), which applies a model-independent approach and standard procedures as described in Gibaldi and Perrier. Gibaldi, *Pharmacokinetics*, 1982. In determining the mean concentration, zero was substituted for any values that were below the limit of quantitation (5.10 ng equiv./g). For IV infusion dosing, C_{30 min} was the concentration at 30 minutes, the first sampling time point. The maximum plasma concentration (C_{max}) and the corresponding time of peak concentration following IV administration were obtained directly by numerical inspection from the individual concentration-time data. The terminal half-life was calculated by the ratio of $\ln 2/\lambda_z$ where λ_z is derived from the terminal slope of the concentration time curve. The area under the plasma concentration versus time curve from zero to infinity was calculated using the trapezoidal rule, where C_{last} is the last measurable plasma concentration. Tissue to plasma concentration ratios were calculated according to the following equation: $C_{\text{tissue}}/C_{\text{plasma}}$, where C_{tissue} equals the

68
66

drug concentration in tissue (ng equiv./g), and C_{plasma} equals the drug concentration in plasma (ng equiv./g).

The specific activity of [^{14}C]-tigecycline (base) was determined by gravimetric assay to be 43.94 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (Table 1). The concentration of the dosing solution was 1.02 mg/ml. Animals received an average dose of $3.09 \pm 0.11/\text{kg}$ compared to a target dose of 3 mg/kg.

Results

Individual concentrations (ng equiv./g) of total radioactivity in tissues of Sprague-Dawley rats following a 3 mg/kg IV infusion of [^{14}C]-tigecycline are represented in Table 6. Pharmacokinetic parameters in tissues are presented in Table 7. Tissue to plasma ratios are presented in Table 8.

Individual peak concentrations (C_{max}) of total radioactivity occurred at the end of infusion for virtually all of the tissues. Tissues with the highest concentrations of radioactivity were kidney (7601 ng equiv./g), liver (7300 ng equiv./g) and spleen (6627 ng equiv./g) (Table 7). The tissues with the lowest peak concentration of radioactivity were the brain (54 ng equiv./g) and eyes (108 ng equiv./g) (Table 7). C_{max} was greater than 2000 ng equiv./g for most (70%) tissues. Tigecycline-derived radioactivity at C_{max} was lower in plasma than in all tissues, except brain, eyes, fat and testes (Table 7). By 24 hrs, all tissues had higher concentrations of [^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity (Table 6) than plasma except eyes.

Individual tissues concentrations of radioactivity at 168 hours for most tissues declined to 1% or less, relative to their C_{max} , with the exception of bone, kidney, liver, skin, spleen and thyroid (Table 6). By 336 hours, most tissues had concentrations below the quantitation limit (5.10 ng. equiv./g) except bone, kidney, skin and thyroid. However, the concentrations in these tissues (bone, thyroid, kidney and skin) were greatly reduced from C_{max} . In general, tissue concentrations of [^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity in bone, kidney, skin and thyroid at 336 hours were 19%, 0.18%, 0/43% and 6% of C_{max} , respectively.

Using AUC as a measure of tissue burden, the bone and thyroid had a much greater burden than any other tissues. The highest AUC values were in the bone (794704 ng eq·hr/g), thyroid (330047 ng eq·hr/g), salivary gland (110979 ng eq·hr/g), kidney (70704 ng eq·hr/g), thyroid (33047 ng eq·hr/g), spleen (70522 ng eq·hr/g) and liver (53527 ng

eq·hr/g). The tissues with lowest burden were the brain (2865 ng eq·hr/g), fat (3500 ng eq·hr/g) and testes (10303 ng eq·hr/g). AUC exposure in bone was two-times higher than the next highest tissue (thyroid). Tissue:plasma AUC ratio values were greater than one for the majority of the tissues (Table 7).

5 The terminal half-life for [¹⁴C]-tigecycline-derived radioactivity ranged from a low of 5 hours in the fat to more than 200 hours in the bone and thyroid, compared with a plasma t_{1/2} of 24 hours (Table 7). Tissues with the longest elimination half-life were thyroid (804 hours), bone (217 hours), skin (182 hours) and kidney (118 hours) (Table 7).

The tissue:plasma concentration ratios (Table 8) were greater than one for the
10 majority of tissues, with the exception of brain, eyes, testes, and fat at the 0.5 and 8.5 hour time points. At 24 hours, all ratios were greater than one. The highest tissue to plasma ratios occurred for some tissues at 72 hours:bone (414), thyroid (56), skin (19.3), spleen (16.7), and kidney (11.1). The blood:plasma ratios were greater than one for all time
15 points, suggesting that there was substantial partitioning of [¹⁴C]-tigecycline-derived radioactivity into blood cells.

The distribution of [¹⁴C]-tigecycline-derived radioactivity to melanin-containing tissues (skin and uveal tract) in Long-Evans rats was also evaluated up to 336 hours post-dose. Blood and plasma concentrations of [¹⁴C]-tigecycline-derived radioactivity in Long-Evans rats were similar to Sprague-Dawley rats (Tables 2 and 5). Peak radioactivity
20 concentrations (C_{max}) were observed at the end of infusion (0.5 hour) for skin, uveal tract, plasma and blood (Table 9). The C_{max} of [¹⁴C]-tigecycline-derived radioactivity in skin and uveal tract was 1997 and 2502 ng equiv./g, respectively. The AUC of [¹⁴C]-tigecycline-derived radioactivity in skin and uveal tract were 109296 and 233288 ng equiv·hr/g, respectively. The terminal half-lives for skin and uveal tract were 473 and 20
25 hours, respectively (Table 10). The half-life values are of questionable meaning since the elimination phases in the concentration-time profile could not be identified with certainty. This is also reflected in the extrapolation of AUC data for uveal tract and skin.

The tissue:plasma concentration ratios were greater than one for skin and uveal tract at all time points (Table 7). The overall highest tissue to plasma ratios occurred at 72
30 hours in skin (179) and uveal tract (393). The tissue:plasma AUC ratios were 8.45 and 18.0 for skin and uveal tract, respectively, and indicate that these tissues selectively retain significant concentrations of [¹⁴C]-tigecycline-derived radioactivity. The data suggest that radioactivity selectively partitioned in the melanin-containing region of the rat eye. Mean

tissue concentrations of radioactivity at 336 hours for skin and uveal tract declined to 8 and 1% of C_{max} , respectively.

58
69

Table 6

Mean Concentrations of Total Radioactivity in Tissues Following a Single 30 Minute Infusion of [^{14} C]-Tigecycline in Male Sprague-Dawley Rats

Tissue Type	0.5 Hrs	8.5 Hrs.	24 Hrs.	72 Hrs.	168 Hrs.	336 Hrs.
Blood	1277	624	44.5	11.8	1.87	<1.03
Plasma	895	504	14.8	4.31	<1.03	<1.03
Adrenal Gland	3580	941	68.9	19.3	<5.10	<5.10
Bone	3312	3794	2711	1787	1526	720
Bone Marrow	4376	1562	291	22.5	<5.10	<5.10
Brain	35.8	54.3	35.8	13.3	<5.10	<5.10
Eyes	106	108	36.6	6.76	<5.10	<5.10
Fat	450	144	<5.1	<5.10	<5.10	<5.10
Heart	5657	1138	69.9	6.98	<5.10	<5.10
Kidney	7601	1725	140	47.9	41.3	13.9
Liver	7300	1192	160	22.7	13.3	<5.10
Lung	2981	496	73.1	13.5	<5.10	<5.10
Lymph Node	3473	1276	180	29.1	<5.10	<5.10
Muscle	2260	1863	85.8	6.24	<5.10	<5.10
Pancreas	4437	971	70.0	7.41	<5.10	<5.10
Pituitary	3693	2014	144	18.8	<5.10	<5.10
Salivary Gland	5771	6313	300	31.6	<5.10	<5.10
Skin	1929	577	249	83.1	7.32	8.34
Spleen	6627	1691	476	72.0	18.8	<5.10
Testes	347	361	119	16.4	<5.10	<5.10
Thymus	2528	1590	158	15.3	<5.10	<5.10
Thyroid	2992	1762	354	242	218	187

6A
70

Table 7
Pharmacokinetic Parameters of Total Radioactivity in Tissues Following a Single 30 Minute Infusion of [¹⁴C]-Tigecycline in Male Sprague-Dawley Rats

Tissue Type	Cmax Ng equiv/g	T _{1/2}	AUC Ng eq hr/g	AUC Ng eq hr/g	Tissue:Plasma AUC
Blood	1277	105	12063	1261	1.15
Plasma	895	24	10643	10652	1.00
Adrenal Gland	3580	13	29153	29515	2.77
Bone	3794	217	569498	794704	74.6
Bone Marrow	4376	11	47116	47468	4.46
Brain	54	32	2256	2865	0.269
Eyes	108	17	3060	3221	0.302
Fat	450	5	2489	3500	0.329
Heart	5657	9	40083	40179	3.77
Kidney	7601	118	68333	70704	6.64
Liver	7300	44	52676	53527	5.03
Lung	2981	13	21263	21523	2.02
Lymph Node	3473	13	36478	37010	3.47
Muscle	2260	8	34833	34910	3.28
Pancreas	4437	10	32908	33014	3.10
Pituitary	3693	10	44882	45164	4.24
Salivary Gland	6313	9	110558	110979	10.4
Skin	1929	182	31819	36471	3.42
Spleen	6627	33	69638	70522	6.62
Testes	361	15	9975	10323	0.97
Thymus	2528	10	35204	35430	3.33
Thyroid	2992	804	113022	330047	31.0

70
71

Table 8

Tissue:Plasma Ratio Following a Single 30 Minute Infusion of [¹⁴C]-Tigecycline in Male Sprague-Dawley Rats

Tissue Type	0.5 Hrs	8.5 Hrs.	24 Hrs.	72 Hrs.	168 Hrs.	336 Hrs.
Blood	1.43	1.24	3.01	2.74	NA	NA
Plasma	1.00	1.00	1.00	1.00	NA	NA
Adrenal Gland	4.00	1.87	4.67	4.47	NA	NA
Bone	3.70	7.53	184	414	NA	NA
Bone Marrow	4.89	3.10	19.7	5.21	NA	NA
Brain	0.040	0.108	2.42	3.10	NA	NA
Eyes	0.118	0.215	2.46	1.57	NA	NA
Fat	0.50	0.287	NA	NA	NA	NA
Heart	6.32	2.26	4.74	1.62	NA	NA
Kidney	8.49	3.42	9.49	11.1	NA	NA
Liver	8.16	2.37	10.8	5.26	NA	NA
Lung	3.33	0.984	4.96	3.13	NA	NA
Lymph Node	3.88	2.53	12.2	6.75	NA	NA
Muscle	2.52	3.70	5.801	1.45	NA	NA
Pancreas	4.96	1.93	4.75	1.72	NA	NA
Pituitary	4.13	4.00	9.79	4.36	NA	NA
Salivary Gland	6.45	12.53	20.3	7.32	NA	NA
Skin	2.15	1.14	16.9	19.3	NA	NA
Spleen	7.40	3.36	32.3	16.7	NA	NA
Testes	0.388	0.716	8.08	3.80	NA	NA
Thymus	2.82	3.16	10.7	3.55	NA	NA
Thyroid	3.34	3.50	24.0	56.0	NA	NA

71
72

Table 9

Mean Concentration (ng equiv./g) of Total Radioactivity in Tissues Following a Single 30 Minute Infusion of [¹⁴C]-Tigecycline in Male Long-Evans Rats

Tissue Type	0.5 Hrs	24 Hrs.	72 Hrs.	168 Hrs.	336 Hrs.
Blood	1296	340	11.8	2.72	1.24
Plasma	975	70.5	4.31	<1.03	<1.03
Uveal Tract	1997	124	96.5	74.8	19.3
Skin	2502	2363	1787	351	211

5

Table 10

Pharmacokinetic Parameters of Total Radioactivity in Tissues Following a Single 30 Minute Infusion of [¹⁴C]-Tigecycline in Male Long-Evans Rats

Tissue Type	Cmax Ng equiv/g	T _{1/2}	AUC Ng eq hr/g	AUC Ng eq hr/g	Tissue:Plasma AUC
Blood	1296	62	21843	21954	1.70
Plasma	975	19	12923	12938	1.00
Skin	1997	473	58287	109296	8.45
Uveal Tract	2502	201	131346	233288	18.0

Table 11

10 Tissue:Plasma Ratio Following a Single 30 Minute Infusion of [¹⁴C]-Tigecycline in Male Long-Evans Rats

Tissue Type	0.5 Hrs	24 Hrs.	72 Hrs.	168 Hrs.	336 Hrs.
Blood	1.33	4.81	5.05	5.05	NA
Plasma	1.00	1.00	1.00	1.00	NA
Skin	2.05	8.76	179	179	NA
Uveal Tract	2.57	25.7	393	393	NA

72
73

Discussion

The distribution of radioactivity to tissues was evaluated following a single thirty minute intravenous infusion (3 mg/kg) of [^{14}C]-tigecycline to Sprague-Dawley and Long-Evans rats. Radioactivity was distributed to tissues rapidly, with C_{max} , observed at the
5 end of infusion (0.5 hr) for most tissues. Tissue concentrations were similar to a study conducted previously by the tissue dissection method. The extensive distribution of tigecycline into a variety of tissues is suggestive of a very large volume of distribution. This finding confirms the previous observation of a high volume of distribution in rats and dogs. In general, the elimination of radioactivity from most of the tissues was slower than
10 the rate from plasma.

The concentrations of [^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity in tissues of Sprague-Dawley rats was higher than plasma at most of the time points. Tissue concentrations of radioactivity at 168 hours for most tissues decline to 1% or less, relative to their end of
15 infusion values. By 336 hours, concentrations in bone, thyroid, kidney and skin declined to 19%, 6.25%, 0.18% and 0.43% of C_{max} values, respectively.

Tissues with the highest levels of exposure in Sprague-Dawley rats, as indicated by the mean AUC values, were bone, thyroid, salivary glands, kidney and spleen. The elimination half-lives were quite long (5 to 217 hours), with bone, skin and thyroid having the longest elimination half-lives. The value of half-life for the thyroid tissue is
20 questionable since elimination phases in the concentration-time profile could not be identified with certainty. This is also reflected in the extrapolation of AUC data to AUC.

The tissue to plasma and blood to plasma ratios were greater than one for all time points, suggesting that there was substantial partitioning of [^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity into tissues and blood cells. The tissue to plasma ratio results from this study
25 are similar to tissue to plasma ratio results from the rat following IV dose of minocycline.

While not being bound by theory, the high radioactivity concentrations in the bone may be due to chelation of tigecycline to calcium. The ability of tetracyclines (minocycline, chlortetracyclines) to form chelation complexes with calcium or other metal ions and thereby adhere to bone has been described in the literature. In the current
30 study [^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity was significantly retained in bone, with an AUC of 794704 ng equiv-hr/g. This value is approximately 75-fold greater than plasma. An apparent elimination half-life of 217 hours was also observed in bone. The retention of radioactivity in bone may account for the somewhat incomplete recovery ($89.4 \pm$

73
74

2.50%) of [^{14}C]-tigecycline in a mass balance study in male Sprague-Dawley rats observed following a 5 mg/kg intravenous dose. Exposure (AUC) in bone was 2.5-fold higher than the next highest tissue (thyroid). [^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity also showed a strong affinity and long half-life for bone and thyroid tissues which is also similar to other
5 known tetracyclines.

[^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity concentrations were detectable up to 336 hours in the kidney and were higher than those of the other tissues except for the bone and thyroid. However, in the mass balance study as well as biliary and urinary excretion study, most of the [^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity was excreted in the first 48
10 hours, suggesting that some [^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity may be binding with high affinity to the kidney tissue. Binding to kidney tissue is also known with tetracyclines.

As determined by QWBAR, radioactivity present in rat ocular tissues was selectively partitioned only into the melanin-containing tissues of the uveal tract in
15 addition to the skin in the Long-Evans rats. The uveal tract had relatively high concentrations of radioactivity at all time points after 0.5 hours, suggesting a significant level of exposure and a long half-life. In a previously conducted study using the tissue dissection method, evaluation of intact eyeball revealed radioactivity was present in this organ; however, it was not possible to associate the location of this radioactivity to any
20 specific ocular tissues.

Concentrations of the 14 standards and 28 QCS determined by conventional liquid scintillation counting (LSC) was similar to that of QWBAR evaluations for these same standards. Exposure of these standards to 14 different storage phosphor screens resulted in a reliable MCID response that correlated with the LSC determined specific activities,
25 suggesting that intra-day and inter-day variability was very low. The CV and accuracy of the QWBAR method were within acceptable limits ($\leq 20\%$). The reproducibility of the MCID response and good correlation of the specific activities between conventional LSC and QWBAR demonstrated that the RBC standards were of uniform concentration of radioactivity. The variability observed in this study was considered to be related to
30 various aspects of cryosectioning, QWBAR technique and imaging analysis. QWBAR was shown to be reproducible with a sensitivity of 0.221 nCi/g (lower limit of quantitation). The dynamic range was linear across four orders of magnitude from 0.221 to 832 nCi/g.

34
25

In conclusion, tissue concentrations of [^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity were higher for most tissues compared to plasma concentrations. In general, the elimination of radioactivity from most of tissues was slower than the rate from plasma. AUC was higher for most tissues than plasma, suggesting that most of the tissues were slow in eliminating

5 [^{14}C]-tigecycline-derived radioactivity.

What is claimed is:

1. A method of treating an infection in bone or bone marrow in a mammal comprising administering to the mammal a pharmacologically effective amount of tigecycline.
2. The method of claim 1 further comprising administering an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin.
3. The method of claim 2 where the antimicrobial is rifampin.
4. The method of claim 1, 2 or 3 where the infection is comprised of a pathogen selected from the group consisting of gram negative bacteria, gram positive bacteria, anaerobic bacteria, and aerobic bacteria.
5. The method of claim 4 where the pathogen is selected from the group consisting of *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Rickettsia*, *Pneumococci*, *Prevotella*, *Peptostreptococci*, *Bacteroides*, *Legionella*, beta-haemolytic streptococci, group B streptococcus and *spirochaetes*.
6. The method of claim 5 wherein the infection is comprised of *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, and *Haemophilus*.
7. The method of claim 6 wherein the infection is comprised of *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, or *Haemophilus influenzae*.
8. The method of claim 4 where the pathogen exhibits antibiotic resistance.
9. The method of claim 8 where the antibiotic resistance is selected from the group consisting of methicillin resistance, glycopeptide resistance, tetracycline resistance, oxytetracycline resistance, doxycycline resistance, chlortetracycline resistance, minocycline resistance, minocycline resistance, glycylcycline resistance, cephalosporin resistance, ciprofloxacin resistance, nitrofurantoin resistance, trimethoprim-sulfa

76
77

resistance, piperacillin/tazobactam resistance, moxifloxacin resistance, vancomycin resistance, teicoplanin resistance, penicillin resistance, and macrolide resistance.

10. The method of claim 9 where the glycopeptide resistance is vancomycin resistance.

11. The method of claim 5 where the pathogen is selected from the group consisting of
5 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, or *Streptococcus pyogenes*.

12. The method of claim 11 where the infection is comprised of *Staphylococcus aureus*.

13. The method of claim 12 where the *Staphylococcus aureus* exhibits an antibiotic
10 resistance selected from the group consisting of glycopeptide resistance, tetracycline resistance, minocycline resistance, methicillin resistance, vancomycin resistance and resistance to a glycolycline antibiotic other than tigecycline.

14. The method of claim 5 where the infection is comprised of *Acinetobacter baumannii*.

15. The method of claim 14 where the *Acinetobacter baumannii* exhibits an antibiotic
15 resistance selected from the group consisting of cephalosporin resistance, ciprofloxacin resistance, nitrofurantoin resistance, trimethoprim-sulfa resistance, and piperacillin/tazobactam resistance.

16. The method of claim 5 where the infection is comprised of *Mycobacterium abscessus*.
20

17. The method of claim 16 where the *Mycobacterium abscessus* exhibits moxifloxacin resistance.

18. The method of claim 5 where the infection is comprised of *Haemophilus influenzae*.

19. The method of claim 5 where the infection is comprised of *Enterococcus faecium*.
25

20. The method of claim 5 where the infection is comprised of *Escherichia coli*.

77
78

21. The method of claim 5 where the infection is comprised of *Neisseria gonorrhoeae*.
22. The method of claim 5 where the infection is comprised of *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, or *Rickettsia rickettsii*.
23. The method of claim 4 wherein the infection causes osteomyelitis.
- 5 24. A method of treating a joint infection or an infection of surrounding tissues of the joint in a mammal comprising administering to the mammal a pharmacologically effective amount of tigecycline.
25. The method of claim 1 further comprising administering an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin.
- 10 26. The method of claim 25 where the antimicrobial is rifampin.
27. The method of claim 24, 25 or 26 where the infection is comprised of a pathogen selected from the group consisting of gram negative bacteria, gram positive bacteria, anaerobic bacteria, and aerobic bacteria.
- 15 28. The method of claim 27 where the pathogen is selected from the group consisting of *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Rickettsia*, *Pneumococci*, *Prevotella*, *Peptostreptococci*, *Bacteroides*, *Legionella*, beta-haemolytic streptococci, group B streptococcus and *spirochaetes*.
- 20 29. The method of claim 28 wherein the infection is comprised of *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, and *Haemophilus*.
30. The method of claim 29 wherein the infection is comprised of *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, or *Haemophilus influenzae*.
- 25 31. The method of claim 27 where the pathogen exhibits antibiotic resistance.

78
29

32. The method of claim 31 where the antibiotic resistance is selected from the group consisting of methicillin resistance, glycopeptide resistance, tetracycline resistance, oxytetracycline resistance, doxycycline resistance; chlortetracycline resistance, minocycline resistance minocycline resistance, glycylcycline resistance, cephalosporin resistance, ciprofloxacin resistance, nitrofurantoin resistance, trimethoprim-sulfa resistance, piperacillin/tazobactam resistance, moxifloxacin resistance, vancomycin resistance, teicoplanin resistance, penicillin resistance, and macrolide resistance.
33. The method of claim 32 where the glycopeptide resistance is vancomycin resistance.
34. The method of claim 28 where the pathogen is selected from the group consisting of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, or *Streptococcus pyogenes*.
35. The method of claim 34 where the infection is comprised of *Staphylococcus aureus*.
36. The method of claim 35 where the *Staphylococcus aureus* exhibits an antibiotic resistance selected from the group consisting of glycopeptide resistance, tetracycline resistance, minocycline resistance, methicillin resistance, vancomycin resistance and resistance to a glycylcycline antibiotic other than tigecycline.
37. The method of claim 28 where the infection is comprised of *Acinetobacter baumannii*.
38. The method of claim 37 where the *Acinetobacter baumannii* exhibits an antibiotic resistance selected from the group consisting of cephalosporin resistance, ciprofloxacin resistance, nitrofurantoin resistance, trimethoprim-sulfa resistance, and piperacillin/tazobactam resistance.
39. The method of claim 28 where the infection is comprised of *Mycobacterium abscessus*.
40. The method of claim 39 where the *Mycobacterium abscessus* exhibits moxifloxacin resistance.

79
80

41. The method of claim 28 where the infection is comprised of a pathogen selected from the group consisting of *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, or *Rickettsia rickettsii*.
- 5 42. The method of claim 27 wherein the joint infection or infection of the surrounding tissues of the joint cause septic arthritis.
43. Use of a pharmacologically effective amount of tigecycline for treating bone, bone marrow or joint infections in a mammal.
44. Use of a pharmacologically effective amount of tigecycline and an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin for treating bone, bone marrow or joint infections in a mammal.
- 10 45. Use of a pharmacologically effective amount of tigecycline for manufacture of a medicament for treatment of bone, bone marrow or joint infections in a mammal.
46. Use of a pharmacologically effective amount of tigecycline and an antimicrobial agent selected from the group consisting of rifamycin, rifampin, rifapentine, rifaximin, or streptovaricin for manufacture of a medicament for treatment of bone, bone marrow or joint infections in a mammal.
- 15 47. The use of claim 43 - 45, wherein the bone or bone marrow infection cause osteomyelitis.
- 20 48. The use of claim 43 - 45, wherein the joint infection or infection of the tissues surrounding the joint cause septic arthritis.

80
81

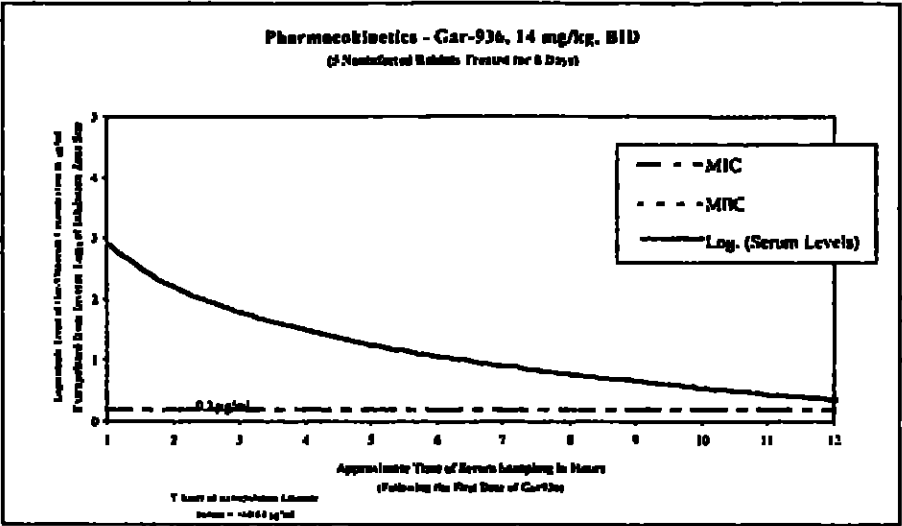


Fig 1. Pharmacokinetics in Normal New Zealand White Rabbits.

87
82

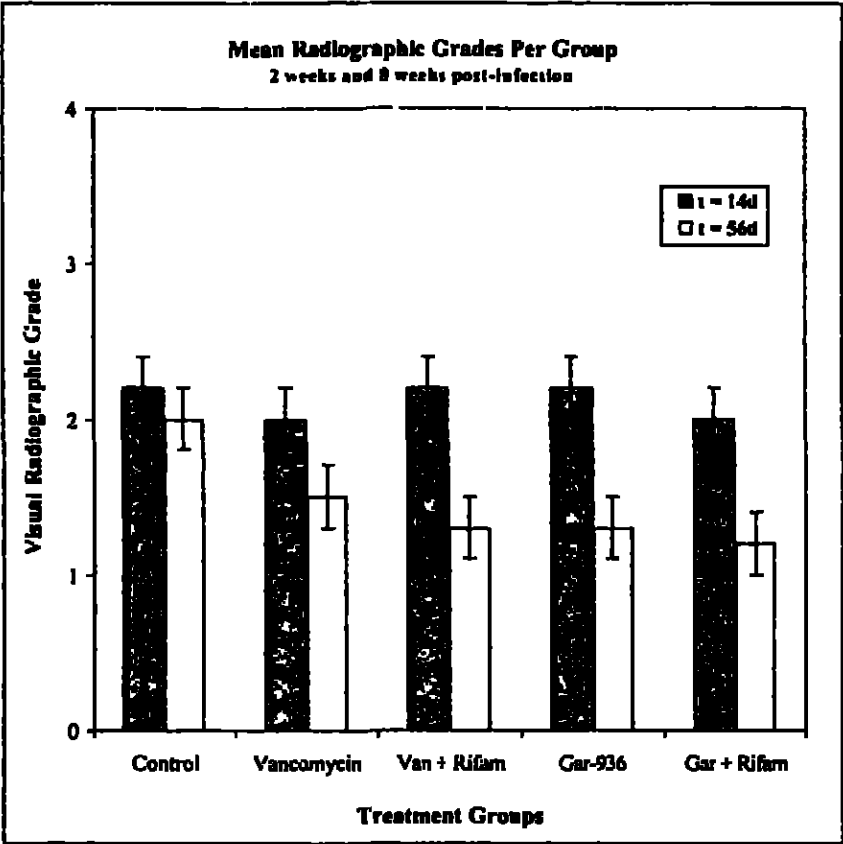
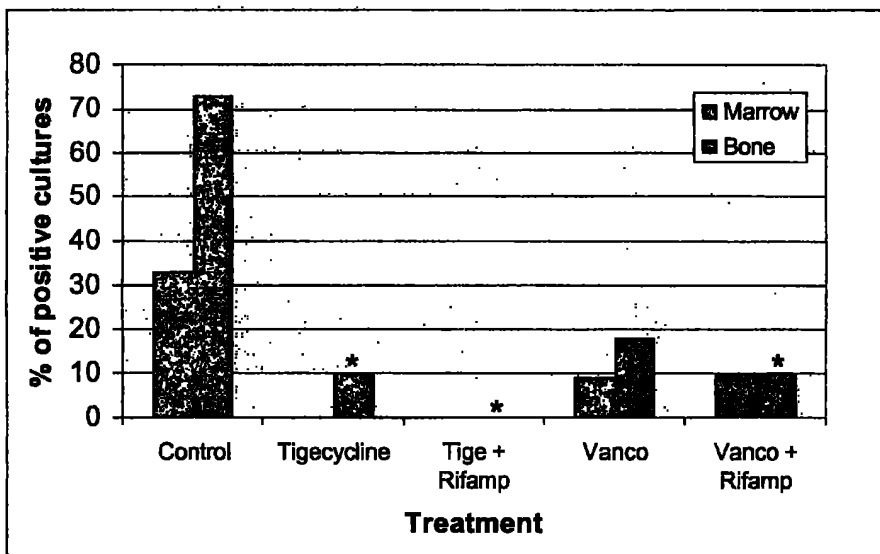


Fig 2. Mean radiographic grades at day 14 and day 56 in each group are shown.
Control = control group, no treatment; Vancomycin = subcutaneous vancomycin treated group;
Van + Rifam = subcutaneous vancomycin with oral rifampin treated group;
Gar-936 = subcutaneous Gar-936 treated group;
Gar + Rifam = subcutaneous Gar-936 with oral rifampin treated group.

28

Figure 3
Recovery of MRSA from Rabbit Osteomyelitis Study



* Indicates significant difference from contr | $p \leq 0.004$

82

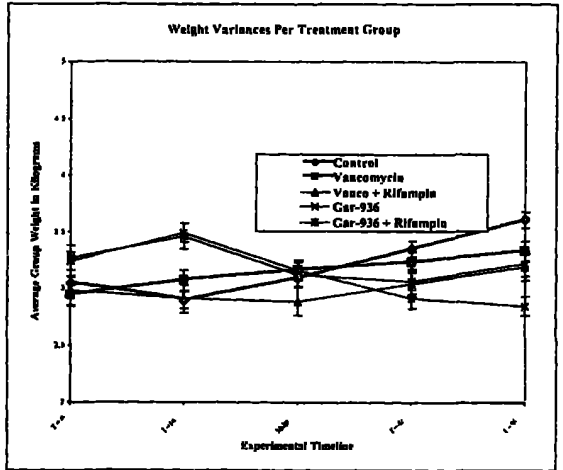


Fig 4a. Average group weight during the experiment are shown.

Control = control group, no treatment;
Vancomycin = subcutaneous vancomycin treated group;
Vanco + Rifampin = subcutaneous vancomycin with oral rifampin treated group;
Gar-936 = subcutaneous Gar-936 treated group;
Gar-936 + Rifampin = subcutaneous Gar-936 with oral Rifampin treated group.

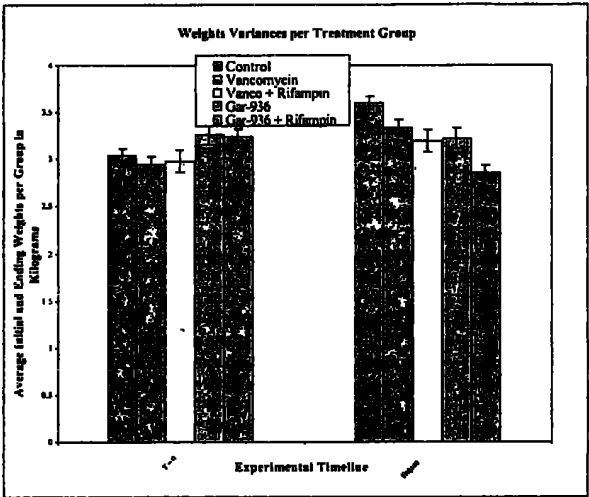


Fig 4b. Average initial and ending weight in each group are shown.

Control = control group, no treatment;
Vancomycin = subcutaneous vancomycin treated group;
Vanco + Rifampin = subcutaneous vancomycin with oral rifampin treatment group;
Gar-936 = subcutaneous Gar-936 treated group;
Gar-936 + Rifampin = subcutaneous Gar-936 with oral rifampin treated group.

Figure 5A **Peak and Trough Gar-938 concentration in Rabbit Serum**

Gar-938, 14 mg/kg BID, SC. Serum Samples were collected at 1 hour and 12 hour after the first dosage

Rabbit	Group	Diameter1(mm)	Diameter2(mm)	Diameter3(mm)	Mean of Diameter	Standard Deviation	Standard Error of Mean
117	2	16.5	16.5	16.5	16.50	0.0	0.00
119	2	18	18	18	18.00	0.0	0.00
120	2	16.5	16.5	16.5	16.50	0.0	0.00
125	2	17	17.2	17.5	17.23	0.2	0.12
126	2	16.5	16.5	16.5	16.50	0.0	0.00
128	2	16.5	16.5	16.5	16.50	0.0	0.00
Average		16.5	16.5	16.5	16.50	0.00	0.00
Standard Error of Mean		0.00	0.00	0.00	0.00	-2.60196	-2.60438
Standard Deviation		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00000	0.00000

Rabbit	Group	Diameter1(mm)	Diameter2(mm)	Diameter3(mm)	Mean of Diameter	Standard Deviation	Standard Error of Mean
117	2	14	14	14	14.00	0.0	0.00
119	2	14	14	14	14.00	0.0	0.00
120	2	14	13.2		13.60	0.4	0.23
125	2	13.2	14		13.60	0.4	0.23
126	2	14	13		13.50	0.5	0.29
128	2	14	13		13.50	0.5	0.29
					13.50	0.5	0.29
					13.50	0.5	0.29
					13.50	0.5	0.29

Figure 5B **Peak and Trough for Vancomycin in Rabbit serum**

Vancomycin: 30 mg/kg BID, SC. Serum Samples were collected at 1 hour and 12 hour after the first dosage.

Peak (1 hour)							
Rabbit	Group	Diameter1(mm)	Diameter2(mm)	Diameter3(mm)	Mean of Diameter	Standard Deviation	Standard Error of Mean
100	I	18.4	19		18.70	0.3	0.17
102	I	17.2	17.2	16	16.80	0.6	0.33
107	I	18.8	18.8	18.8	18.80	0.0	0.00
108	I	12.3	12.3		12.30	0.0	0.00
109	I	16.3			16.30	0.0	0.00
113	I	18.4	18.4	18.4	18.40	0.0	0.00

Rabbit	Group	Diameter1(mm)	Diameter2(mm)	Diameter3(mm)	Mean of Diameter	Standard Deviation	Standard Error of Mean
100	1	8	8	8	8.00	0.0	0.00
102	1	8	8	8	8.00	0.0	0.00
107	1	10.5	10.5	10.5	10.50	0.0	0.00
108	1	8	8	8	8.00	0.0	0.00
109	1	11.5	11.5	11.8	11.60	0.1	0.08
113	1	13.4	13.4	13.4	13.40	0.0	0.00
		Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean
		8.00	8.00	8.00	8.00	0.00	0.00
		10.50	10.50	10.50	10.50	0.00	0.00
		11.60	11.60	11.60	11.60	0.00	0.00
		13.40	13.40	13.40	13.40	0.00	0.00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2004/028980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/496 A61P19/02 A61P31/04 A61K31/65

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NORDEN C W ET AL: "Chronic staphylococcal osteomyelitis: treatment with regimens containing rifampin." REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES. 1983 JUL-AUG, vol. 5 Suppl 3, July 1983 (1983-07), pages S495-S501, XP009041854 ISSN: 0162-0886 table 1	1-23, 43-47
Y	WO 03/005971 A (PARATEK PHARMACEUTICALS INC) 23 January 2003 (2003-01-23) page 110; example DZ page 98, line 10 - line 31 example 24 claim 3 page 100; example A	1-23, 43-47
	----- -/- -----	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 2004

Date of mailing of the international search report

07/01/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Giacobbe, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/028980

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	MERCIER RENEE-CLAUDE ET AL: "Antimicrobial activity of tigecycline (GAR-936) against Enterococcus faecium and Staphylococcus aureus used alone and in combination." PHARMACOTHERAPY, vol. 22, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 1517-1523, XP009041884 ISSN: 0277-0008 table 1 table 2 page 1520, column 2, line 9 - line 11 page 1521, column 2, line 12 - line 14 page 1522, column 1, last paragraph	1-48
Y	WO 02/102384 A (GARDNER REBECCA ; ORTHOGENICS AS (NO); EL-GEWELY MOHAMED RAAFAT (NO)) 27 December 2002 (2002-12-27) claims 1-5	24-46, 48
Y	PATEL R ET AL: "In vitro activity of GAR-936 against vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant Staphylococcus aureus and penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae." DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE. NOV 2000, vol. 38, no. 3, November 2000 (2000-11), pages 177-179, XP002311637 ISSN: 0732-8893 the whole document	1-48
Y	ZIMMERLI W ET AL: "Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group." JAMA : THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. 20 MAY 1998, vol. 279, no. 19, 20 May 1998 (1998-05-20), pages 1537-1541, XP009041853 ISSN: 0098-7484 the whole document	1-48
Y	LEW D P ET AL: "Osteomyelitis." THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 3 APR 1997, vol. 336, no. 14, 3 April 1997 (1997-04-03), pages 999-1007, XP009041924 ISSN: 0028-4793 table 1 -/-	1-23, 43-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2004/028980

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VARIOUS: "The Merck Index, 7th Ed." 1999, MERCK RESEARCH LABORATORIES, WHITEHOUSE STATION, NJ, USA, XP002311638 page 455 - page 460 -----	1-48
P,Y	WO 03/099217 A (ACTIVBIOTICS INC) 4 December 2003 (2003-12-04) claims 1,8 page 6, line 20 - page 7, line 21 -----	1-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/028980

90
91

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-44, 47 and 48 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

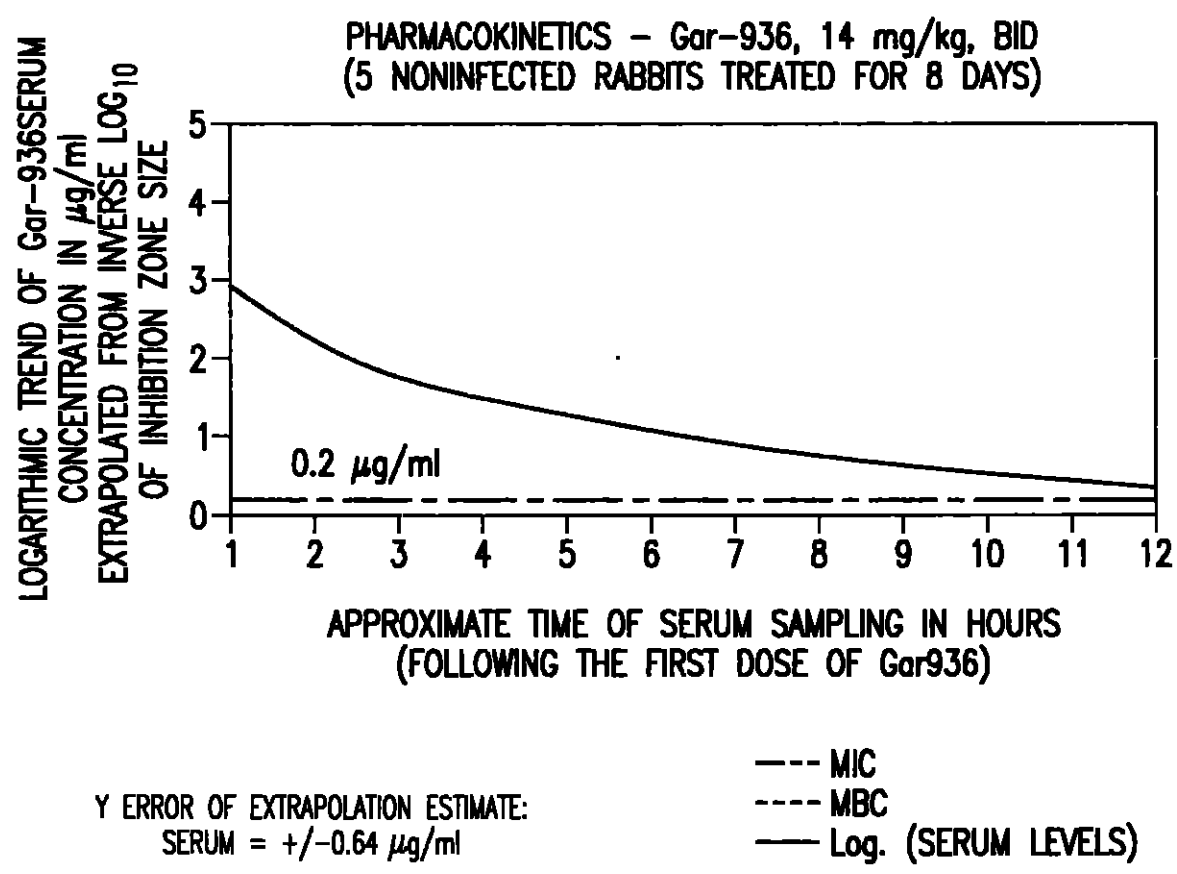
International Application No

PCT/US2004/028980

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03005971 A	23-01-2003	EP 1408987 A2	21-04-2004
		WO 03005971 A2	23-01-2003
		US 2004063674 A1	01-04-2004
WO 02102384 A	27-12-2002	CA 2456685 A1	27-12-2002
		EP 1401448 A1	31-03-2004
		WO 02102384 A1	27-12-2002
		US 2004236074 A1	25-11-2004
WO 03099217 A	04-12-2003	WO 03051299 A2	26-06-2003
		WO 03051300 A2	26-06-2003
		WO 03099217 A2	04-12-2003
		US 2004014749 A1	22-01-2004
		US 2004014750 A1	22-01-2004
		US 2003236265 A1	25-12-2003
		US 2004077533 A1	22-04-2004

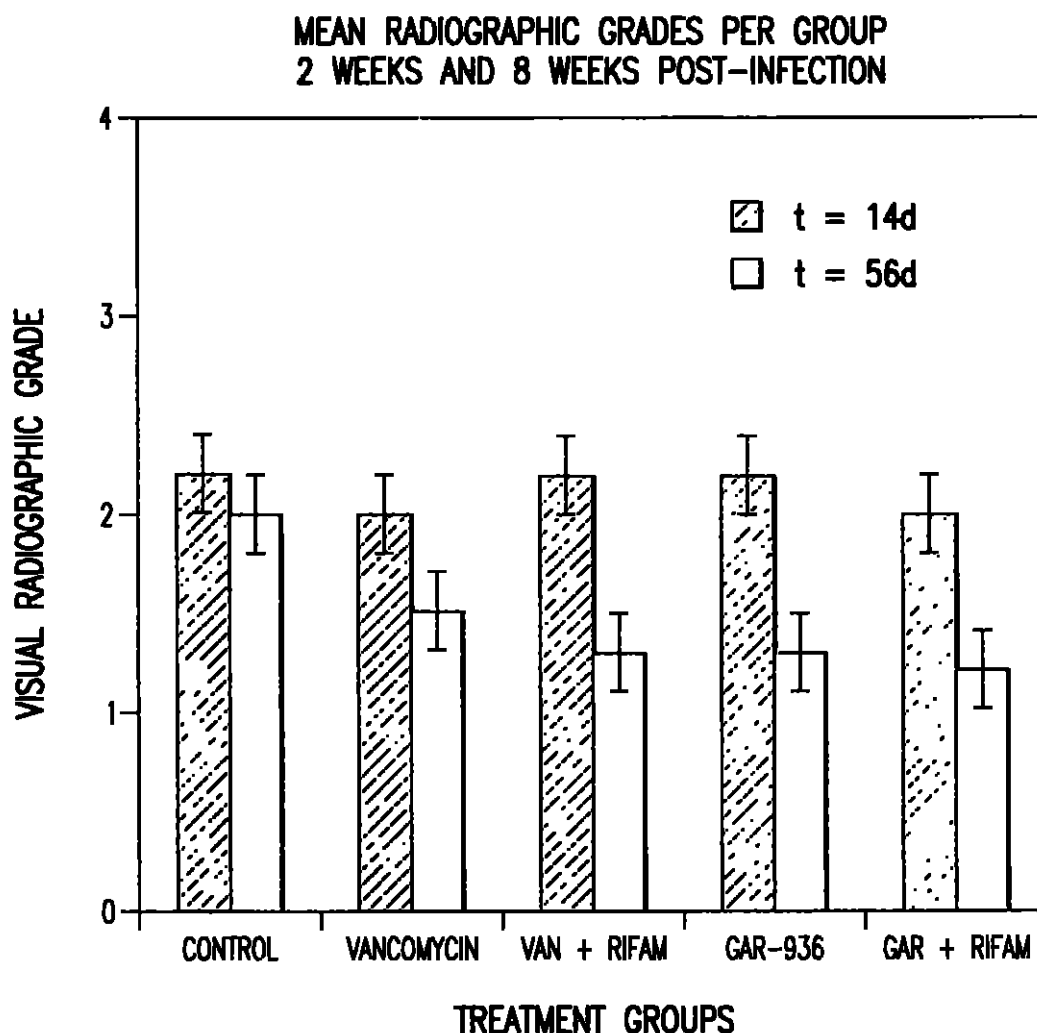
91
92

92
93



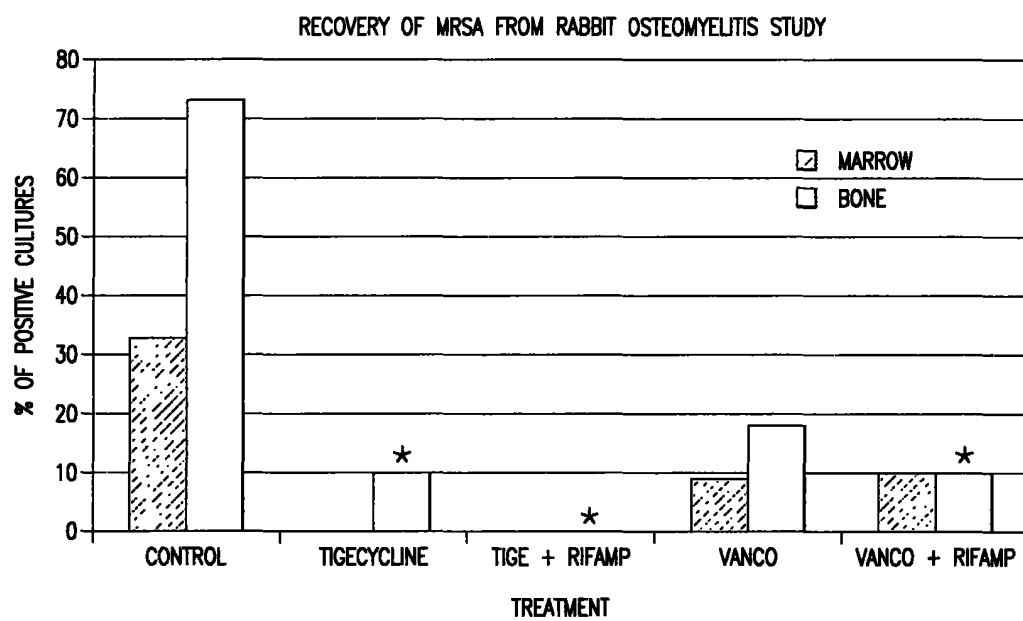
PHARMACOKINETICS IN NORMAL NEW ZEALAND WHITE RABBITS

FIG.1



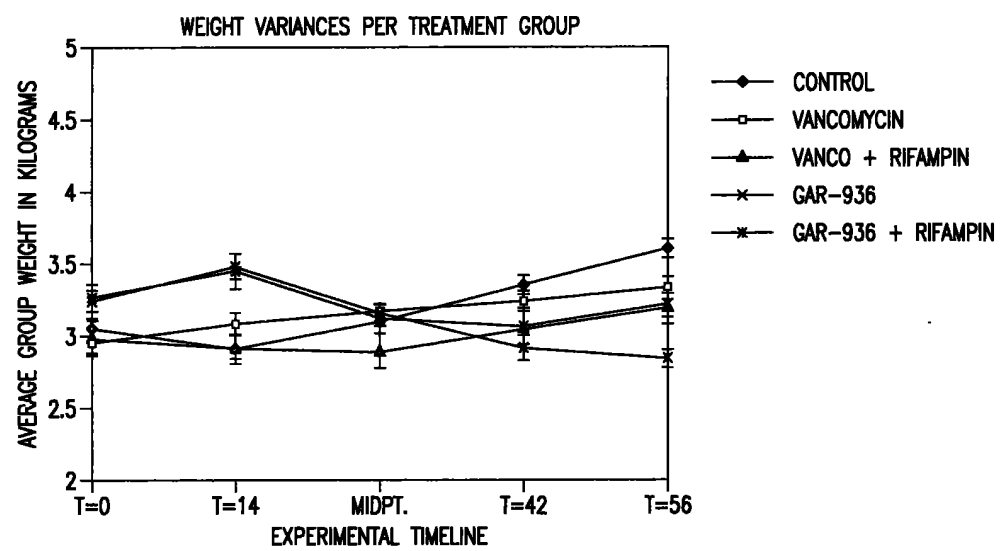
MEAN RADIOGRAPHIC GRADES AT DAY 14 AND DAY 56 IN EACH GROUP ARE SHOWN. CONTROL = CONTROL GROUP, NO TREATMENT; VANCOMYCIN = SUBCUTANEOUS VANCOMYCIN TREATED GROUP; VAN + RIFAM = SUBCUTANEOUS VANCOMYCIN WITH ORAL RIFAMPIN TREATED GROUP; GAR-936 = SUBCUTANEOUS GAR-936 TREATED GROUP; GAR + RIFAM = SUBCUTANEOUS GAR-936 WITH ORAL RIFAMPIN TREATED GROUP.

FIG.2



* INDICATES SIGNIFICANT DIFFERENCE FROM CONTROL $p \leq 0.004$

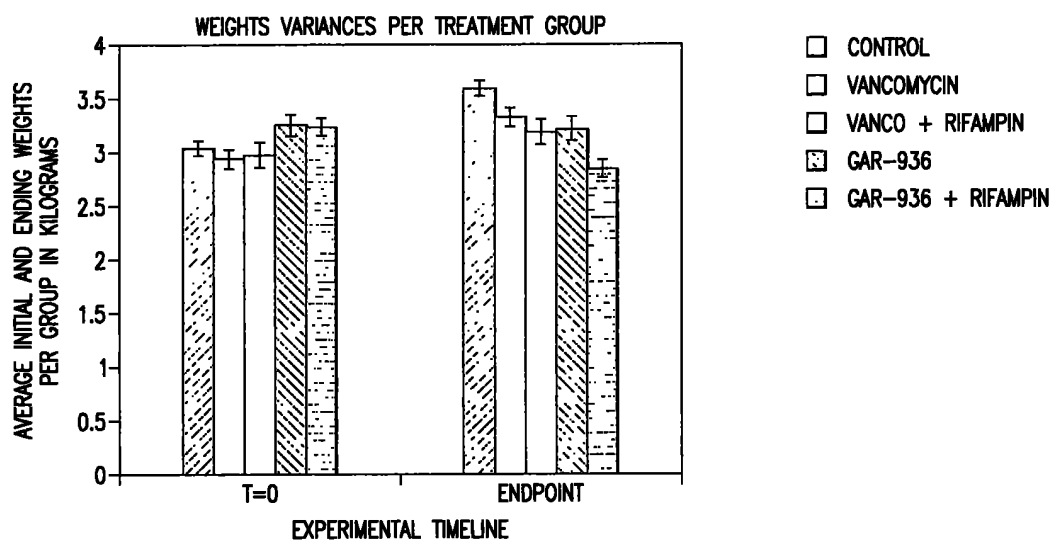
FIG.3



CONTROL = CONTROL GROUP, NO TRATMENT;
VANCOMYCIN = SUBCUTANEOUS VANCOMYCIN TREATED GROUP;
VANCO + RIFAMPIN = SUBCUTANEOUS VANCOMYCIN WITH ORAL RIFAMPIN TREATED GROUP;
GAR-936 = SUBCUTANEOUS GAR-936 TREATED GROUP;
GAR-936 + RIFAMPIN = SUBCUTANEOUS GAR-936 WITH ORAL RIFAMPIN TREATED GROUP.
AVERAGE GROUP WEIGHT DURING THE EXPERIMENT ARE SHOWN.

FIG.4

96



CONTROL = CONTROL GROUP, NO TRATMENT;
 VANCOMYCIN = SUBCUTANEOUS VANCOMYCIN TREATED GROUP;
 VANCO + RIFAMPIN = SUBCUTANEOUS VANCOMYCIN WITH ORAL RIFAMPIN TREATMENT GROUP;
 GAR-936 = SUBCUTANEOUS GAR-936 TREATED GROUP;
 GAR-936 + RIFAMPIN = SUBCUTANEOUS GAR-936 WITH ORAL RIFAMPIN TREATED GROUP.

AVERAGE INITIAL AND ENDING WEIGHT IN EACH GROUP ARE SHOWN.

FIG.4B

PEAK AND TROUGH GAR-936 CONCENTRATION IN RABBIT SERUM

GAR-936, 14 mg/kg BID, SC. SERUM SAMPLES WERE COLLECTED AT 1 HOUR AND 12 HOUR AFTER THE FIRST DOSAGE

PEAK (1 HOUR)							
RABBIT	GROUP	DIAMETER1(mm)	DIAMETER2(mm)	DIAMETER3(mm)	MEAN OF DIAMETER	STANDARD DEVIATION	STANDARD ERROR OF MEAN
117	2	16.5	16.5	16.5	16.50	0.0	0.00
119	2	18	18	18	18.00	0.0	0.00
120	2	16.5	16.5	16.5	16.50	0.0	0.00
125	2	17	17.2	17.5	17.23	0.2	0.12
126	2	16.5	16.5	16.5	16.50	0.0	0.00
128	2	16.5	16.5	16.5	16.50	0.0	0.00
AVERAGE INHIBITION: mm					16.87	0.0	0.02
Log 10					0.21	-2.60196	-2.60438
GAR-936 CONCENTRATION: µg/ml					1.62	0.0	0.0

TROUGH (12 HOUR)							
RABBIT	GROUP	DIAMETER1(mm)	DIAMETER2(mm)	DIAMETER3(mm)	MEAN OF DIAMETER	STANDARD DEVIATION	STANDARD ERROR OF MEAN
117	2	14	14	14	14.00	0.0	0.00
119	2	14	14	14	14.00	0.0	0.00
120	2	14	13.2		13.60	0.4	0.23
125	2	13.2	14		13.60	0.4	0.23
126	2	14	13		13.50	0.5	0.29
128	2	14	13		13.50	0.5	0.29
AVERAGE INHIBITION: mm					13.70	0.3	0.17
Log 10					-0.32	-2.56	-2.58
GAR-936 CONCENTRATION: µg/ml					0.48	0.00	0.00

FIG.5A

PEAK AND TROUGH FOR VANCOMYCIN IN RABBIT SERUM
VANCOMYCIN: 30 mg/kg BID, SC. SERUM SAMPLES WERE COLLECTED AT 1 HOUR AND 12 HOUR AFTER THE FIRST DOSAGE.

PEAK (1 HOUR)							
RABBIT	GROUP	DIAMETER1(mm)	DIAMETER2(mm)	DIAMETER3(mm)	MEAN OF DIAMETER	STANDARD DEVIATION	STANDARD ERROR OF MEAN
100	1	18.4	19		18.70	0.3	0.17
102	1	17.2	17.2	16	16.80	0.6	0.33
107	1	18.8	18.8	18.8	18.80	0.0	0.00
108	1	12.3	12.3		12.30	0.0	0.00
109	1	16.3			16.30	0.0	0.00
113	1	18.4	18.4	18.4	18.40	0.0	0.00
AVERAGE INHIBITION: mm					16.88	0.1	0.08
Log 10					0.51	-1.57	-1.58
VANCOMYCIN CONCENTRATION: µg/ml					3.26	0.03	0.03

TROUGH (12 HOUR)							
RABBIT	GROUP	DIAMETER1(mm)	DIAMETER2(mm)	DIAMETER3(mm)	MEAN OF DIAMETER	STANDARD DEVIATION	STANDARD ERROR OF MEAN
100	1	8	8	8	8.00	0.0	0.00
102	1	8	8	8	8.00	0.0	0.00
107	1	10.5	10.5	10.5	10.50	0.0	0.00
108	1	8	8	8	8.00	0.0	0.00
109	1	11.5	11.5	11.5	11.60	0.1	0.08
113	1	13.4	13.4	13.4	13.40	0.0	0.00
AVERAGE INHIBITION: mm					9.92	0.0	0.01
Log 10					-0.35	-1.59	-1.59
VANCOMYCIN CONCENTRATION: µg/ml					0.44	0.03	0.03

FIG.5B

79
100

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU 41671

To:

LAVENUE, Teresa, A.
KENYON & KENYON
1500 K Street, N.W.
Suite 700
Washington, DC 20005-1257
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 22 October 2004 (22.10.2004)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 01855.185	International application No. PCT/US2004/028980

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:
WYETH et al (for all designated States except US)

International filing date : 07 September 2004 (07.09.2004)
Priority date(s) claimed : 05 September 2003 (05.09.2003)
03 September 2004 (03.09.2004)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 11 October 2004 (11.10.2004)

List of designated Offices :

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

The receiving Office was closed for business on 06 September 2004 (06.09.2004)

11-13-04

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.89.70	Authorized officer: Ryad BENTOBAL (Fax 338 8970) Telephone No. (41-22) 338 8272
--	---

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

LAVENUE, Teresa, A.
KENYON & KENYON
1500 K Street, N.W.
Suite 700
Washington, DC 20005-1257
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 28 November 2004 (28.11.2004)	
Applicant's or agent's file reference 01855.185	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US04/028980	International filing date (day/month/year) 07 September 2004 (07.09.2004)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 05 September 2003 (05.09.2003)
Applicant WYETH et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
05 September 2003 (05.09.2003)	80/500,474	US	11 October 2004 (11.10.2004)

12-9-04

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 740 14 35	Authorized officer Wimmer Peter Facsimile No. +41 22 338 89 70 Telephone No. +41 22 338 9896
---	---

PCT

707
102

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 01855.185	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US2004/028980	International filing date (day/month/year) 07/09/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 05/09/2003
Applicant WYETH		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 36.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regards to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/028980A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/496 A61P19/02 A61P31/04 A61K31/65

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	NORDEN C W ET AL: "Chronic staphylococcal osteomyelitis: treatment with regimens containing rifampin." REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES. 1983 JUL-AUG, vol. 5 Suppl 3, July 1983 (1983-07), pages S495-S501, XP009041854 ISSN: 0162-0886 table 1	1-23, 43-47
Y	WO 03/005971 A (PARATEK PHARMACEUTICALS INC) 23 January 2003 (2003-01-23) page 110; example DZ page 98, line 10 - line 31 example 24 claim 3 page 100; example A	1-23, 43-47
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents.

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 2004

Date of mailing of the international search report

07/01/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentean 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Giacobbe, S

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/028980203
104

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MERCIER RENEE-CLAUDE ET AL: "Antimicrobial activity of tigecycline (GAR-936) against Enterococcus faecium and Staphylococcus aureus used alone and in combination." PHARMACOTHERAPY, vol. 22, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 1517-1523, XP009041884 ISSN: 0277-0008 table 1 table 2 page 1520, column 2, line 9 - line 11 page 1521, column 2, line 12 - line 14 page 1522, column 1, last paragraph	1-48
Y	WO 02/102384 A (GARDNER REBECCA ; ORTHOGENICS AS (NO); EL-GEWELY MOHAMED RAAFAT (NO)) 27 December 2002 (2002-12-27) claims 1-5	24-46, 48
Y	PATEL R ET AL: "In vitro activity of GAR-936 against vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant Staphylococcus aureus and penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae." DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE. NOV 2000, vol. 38, no. 3, November 2000 (2000-11), pages 177-179, XP002311637 ISSN: 0732-8893 the whole document	1-48
Y	ZIMMERLI W ET AL: "Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group." JAMA : THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. 20 MAY 1998, vol. 279, no. 19, 20 May 1998 (1998-05-20), pages 1537-1541, XP009041853 ISSN: 0098-7484 the whole document	1-48
Y	LEW D P ET AL: "Osteomyelitis." THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 3 APR 1997, vol. 336, no. 14, 3 April 1997 (1997-04-03), pages 999-1007, XP009041924 ISSN: 0028-4793 table 1	1-23, 43-47
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US2004/028980

704
105

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	VARIOUS: "The Merck Index, 7th Ed." 1999, MERCK RESEARCH LABORATORIES, WHITEHOUSE STATION, NJ, USA., XP002311638 page 455 - page 460	1-48
P,Y	WO 03/099217 A (ACTIVBIOTICS INC) 4 December 2003 (2003-12-04) claims 1,8 page 6, line 20 - page 7, line 21	1-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/028980

105
106

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-44, 47 and 48 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/028980

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03005971	A	23-01-2003	EP 1408987 A2	21-04-2004
			WO 03005971 A2	23-01-2003
			US 2004063674 A1	01-04-2004
WO 02102384	A	27-12-2002	CA 2456685 A1	27-12-2002
			EP 1401448 A1	31-03-2004
			WO 02102384 A1	27-12-2002
			US 2004236074 A1	25-11-2004
WO 03099217	A	04-12-2003	WO 03051299 A2	26-06-2003
			WO 03051300 A2	26-06-2003
			WO 03099217 A2	04-12-2003
			US 2004014749 A1	22-01-2004
			US 2004014750 A1	22-01-2004
			US 2003236265 A1	25-12-2003
			US 2004077533 A1	22-04-2004

107
108

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)**

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2004/028980

International filing date (day/month/year)
07.09.2004

Priority date (day/month/year)
05.09.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K31/496, A61P19/02, A61P31/04, A61K31/85

Applicant
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA.



European Patent Office
D-80289 Munich
Tel: +49 89 2369 - 0 Tx: 523856 epmu d
Fax: +49 89 2369 - 4465

Authorized Officer

Giacobbe, S
Telephone No. +49 89 2369-8463



Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☐ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☐ in written format
☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/028980

709
110

Box No. II Priority

1. ☒ The following document has not been furnished:

☒ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(a)).

☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(b)).

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. ☐ It has not been possible to consider the validity of the priority claim because a copy of the priority document was not available to the ISA at the time that the search was conducted (Rule 17.1). This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

4. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **111**
PCT/US2004/028980

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 1-44,47,48 (IA only)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-44,47,48 (IA only) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

277
1/2

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-48
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-48
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	45,46
	No: Claims	1-44,47,48

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

1. Section III

Claims 1-44, 47 and 48 are directed to a method of treatment of the human/animal body by therapy. Such subject-matter is considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT, and therefore no opinion shall be formulated with respect to industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT). However an opinion shall be formulated with respect to novelty and inventive step based on the alleged effects of the compounds/compositions.

2. Section V

2.1 Cited Documents

The following documents (D) are referred to in this Opinion; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:

- D1: NORDEN C W ET AL: "Chronic staphylococcal osteomyelitis: treatment with regimens containing rifampin." REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES. 1983, vol. 5 Suppl 3, 1983, pages S495-S501, XP009041854
- D2: WO 03/005971 A (PARATEK PHARMACEUTICALS INC) 23 January 2003
- D3: MERCIER RENEE-CLAUDE ET AL: "Antimicrobial activity of tigecycline (GAR-936) against Enterococcus faecium and Staphylococcus aureus used alone and in combination." PHARMACOTHERAPY, vol. 22(12), 2002, pages 1517-1523, XP009041884
- D4: WO 02/102384 A (GARDNER REBECCA ; ORTHOGENICS AS (NO); EL-GEWELY MOHAMED RAAFAT (NO)) 27 December 2002
- D5: PATEL R ET AL: "In vitro activity of GAR-936 against vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant Staphylococcus aureus and penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae." DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE, vol. 36(3), 2000, pages 177-179, XP002311637
- D6: ZIMMERLI W ET AL: "Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group." JAMA, vol. 279(19), 1998, pages 1537-1541, XP009041853
- D7: LEW D P ET AL: "Osteomyelitis." THE NEW ENGLAND JOURNAL OF

MEDICINE. 3 APR 1997, vol 336(14), 1997, pages 999-1007, XP009041924

D8: VARIOUS: "The Merck Index, 7th Ed." 1999, MERCK RESEARCH
LABORATORIES, WHITEHOUSE STATION, NJ, USA, XP002311638

Unless otherwise indicated reference is hereafter made to the passages cited in the
Search Report.

2.2 The prior art

D1: The document describes the treatment of osteomyelitis with a combination of rifampin and doxycycline, a tetracycline belonging to the same class as tigecycline

D2: The document discloses tigecycline as an antibacterial agent. The molecule is describes as having activity in an arthritic-osteoporosis model and against *S. aureus* and *E. coli*, and is claimed against osteoarthritis and osteomyelitis. The document further discloses the use of doxycycline (example A in Table 3) for the same purposes

D3: The document discloses the activity of tigecycline and rifampin as antibacterial agents, alone or in combination. In particular it is said that "the multidrug-resistant bacteria, including doxycycline-resistant isolates, were susceptible to tigecycline" (cf. Abstract).

D4: The document discloses that doxycycline is used for the treatment of osteoarthritis

D5: The document discloses the activity of tigecycline (GAR-936) against vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant *S. aureus* and penicillin-resistant *S. pneumoniae*.

D6: The document discloses the treatment of osteomyelitis caused by *S. aureus* infections subsequent to implantation of orthopaedic devices with a course of flucoxacin/rifampin or vancomycin/rifampin followed by ciprofloxacin/rifampin long term therapy.

D7: The document provides a list of the most common microorganisms causing osteomyelitis.

D8: The document lists the bacteria that most commonly cause infectious arthritis (i.e. septic arthritis) and osteomyelitis. *S. aureus* is among them, but most of the bacteria presently claimed are described.

2.3 Art 33(2) PCT (Novelty)

The subject-matter of claims 1-48 of the present application meets the requirements of Article 33(2) PCT.

None of the cited documents discloses the treatment of bone or joint infections, and in particular of osteomyelitis or of septic arthritis, with tigecycline, alone or in combination with a second antibiotic agent like rifampin.

In particular document D2 discloses the use of a long list of compounds for the treatment of a number of different lists of unrelated diseases. The present invention is deemed to be a novel selection over the disclosure of D2 based on the two-list principle.

2.4 Art 33(3) PCT (Inventive step)

The subject-matter of claims 1-48 of the present application does not meet the requirements of Article 33(3) PCT.

Document D1 discloses the treatment of osteomyelitis with a combination of doxycycline and rifampin, whereas D4 shows the use of the former alone. The technical problem faced by the skilled person in the light of this document can be formulated as "how to find a different, possibly better treatment of osteomyelitis". The solution proposed by the present application is the substitution of tigecycline for doxycycline.

Document D2 shows and claims the activity of doxycycline and of tigecycline (both alone) in the treatment of *inter alia* osteomyelitis, in part due to their (shown) activity against *S. aureus* infections, which are shown in documents D7 and D8 to be one of the major causes of osteomyelitis and septic arthritis. Document D5 further shows the activity of tigecycline against MRSA infections, and document D3 shows that tigecycline is active also against doxycycline-resistant isolates of *S. aureus*. From this body of information the skilled person would have deduced that tigecycline is an ideal candidate for substituting doxycycline in the treatment of osteomyelitis and septic arthritis, since not only it is shown to do so in document D2, but also since it possesses properties which can make it even better than the latter. No inventive step can be acknowledged under these circumstances.

2.5 Art 33(4) PCT (Industrial applicability)

As stated above, no opinion is given on the question of whether present claims 1-44, 47 and 48 are industrially applicable since their patentability is *inter alia* dependent upon their formulation as well as upon national and regional laws and no unifying criteria is provided

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No. **1/16**

PCT/US2004/028980

in this field by the PCT.

3. Section VI

Other cited documents (Rule 70.10 PCT)

Patent number	Filing date	Priority date	Publication date
WO03/099217	22.05.2003	23.05.2002	04.12.2003

The document discloses the treatment of bacterial infections with a rifamycin antibiotic combined with a second antibiotic, which may be tigecycline

01855.185

1/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/ROH81 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.162)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	01855.185
I	Title of invention	USE OF TIGECYCLINE, ALONE, OR IN COMBINATION WITH RIFAMPIN TO TREAT OSTEOMYELITIS AND/OR SEPTIC ARTHRITIS
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name:	WYETH
II-5	Address:	Five Giralda Farms Madison, New Jersey 07940 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant only
III-1-2	Applicant for	all designated States except US
III-1-4	Name:	BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM
III-1-5	Address:	201 West 7th Street Austin, Texas 78701 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or Inventor	
III-2-1	This person is:	inventor only
III-2-4	Name (LAST, First)	TESTA, Raymond, Thomas
III-2-5	Address:	55 Rockledge Place Cedar Grove, New Jersey 07009 United States of America
III-3	Applicant and/or Inventor	
III-3-1	This person is:	inventor only
III-3-4	Name (LAST, First)	CALHOUN, Jason
III-3-5	Address:	Department of Orthopaedic Surgery University of Missouri One Hospital Drive Suite MC213 Columbia, Missouri 65212 United States of America
III-4	Applicant and/or Inventor	
III-4-1	This person is:	inventor only (deceased)
III-4-4	Name (LAST, First)	MADER, Jon, T.
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	LAVENUE, Teresa, A.
IV-1-2	Address:	KENYON & KENYON 1500 K Street, N.W. Suite 700 Washington, DC 20005-1257 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	(202) 220-4200
IV-1-4	Facsimile No.	(202) 220-4201
IV-1-5	e-mail	tlavenue@kenyon.com
IV-1-6	Agent's registration No.	47,737
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	ALI, Zeba (51,392); MELORO, Thomas, J. (33,538); TSEVDOS, Estelle, J. (31,145); GALBRAITH, James (28,509); WALLACE, W., David (42,210); MCCARTHY, Neil, M. (43,435); ZIKER, Dana (54,567)

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	05 September 2003 (05.09.2003)
VI-1-2	Number	60/500,474
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2-1	Filing date	03 September 2004 (03.09.2004)
VI-2-2	Number	
VI-2-3	Country	US
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)
VIII	Declarations	Number of declarations
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-

279
120

01855.185

4/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description	52	-
IX-3	Claims	5	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	7	-
IX-7	TOTAL	70	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	other:	hand-carry receipt	
IX-18	other:	transmittal	
IX-18	other:	early Ser. No. card w/postage	
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	3	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	for ALI, Zeba	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

720
121

01855.185

5/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

127
122

USO DE TIGECICLINA SOLA O EN COMBINACIÓN CON RIFAMPICINA PARA
TRATAR LA OSTEOMIELITIS Y/O LA ARTRITIS SÉPTICA

Esta solicitud reivindica prioridad en la solicitud
5 provisional de los Estados Unidos 60/500.474 presentada el 5 de
septiembre de 2003, que se incorpora en su totalidad a la
presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a un método nuevo para el
tratamiento de osteomielitis y artritis séptica causada o
consecuente de infecciones bacterianas. La presente invención
también se refiere al tratamiento de infecciones bacterianas
del hueso, la médula ósea, las articulaciones y el líquido
15 sinovial. La presente invención también se refiere al
tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a
antibióticos en estas patologías y tejidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 En la última mitad del siglo XX se produjeron
significativos progresos en el desarrollo de agentes
antibacterianos. Este éxito generó la percepción de que las
enfermedades bacterianas se curaban con mayor facilidad que
cualquier otro trastorno importante, pero la emergencia de
25 microorganismos resistentes a múltiples fármacos en la década

de 1990 dio por resultados severas implicaciones de salud pública. La resistencia se diseminó a microorganismos previamente susceptibles, y algunos microorganismos son esencialmente resistentes a todos los agentes antibacterianos
5 aprobados.

La tigeciclina, que pertenece a la clase de antibióticos de la glicilciclina, supera los mecanismos existentes de resistencia microbiana. Demostró un amplio espectro de actividad antibacteriana, con inhibición de múltiples bacterias
10 resistentes grampositivas, gramnegativas y anaerobias. La tigeciclina es activa contra la mayoría de los agentes patógenos más comunes. La tigeciclina es activa contra agentes patógenos tales como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), enterococos resistentes a vancomicina
15 (incluso *Enterococcus faecalis*), neumococos resistentes a penicilina /macrólidos, *Prevotella* spp., peptostreptococos, micobacterias y microorganismos resistentes a minociclina (Boucher et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(8): 2225-2229, Gales et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 46:
20 19-36, Goldstein et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(10): 2747-2751). La tigeciclina es útil para el tratamiento agentes patógenos respiratorios tales como *Streptococcus pneumoniae* (sensible a penicilina y resistente a penicilina), *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma*
25 *pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (susceptible a meticilina y

resistente a meticilina), bacilos gramnegativos aerobios, y enterococos (enterococos susceptibles a vancomicina y resistentes a vancomicina). Los resultados *in vivo* han sido muy alentadores y mejores de los previsto, sobre la base del tiempo superior a la concentración inhibitoria mínima (CIM) en suero. Se observa que tigeciclina es un agente antibacteriano seguro.

Los estafilococos meticilinoresistentes son los microorganismos más comunes en las infecciones de huesos y articulaciones (Waldvogel, *Infectious Diseases* 1988: 1339-1344). Las opciones para el tratamiento de infecciones debidas a estos microorganismos son limitadas: la sensibilidad de las cepas clínicas a las quinolonas, clindamicina, cotrimoxazol y rifampicina es variable, y a menudo la sensibilidad se limita a los glucopéptido, que se deben administrar por vía parenteral. Ya se describió la resistencia de los estafilococos a los glucopéptidos, lo cual representa un problema importante, dado que esos fármacos se consideran la regla de oro para el tratamiento de infecciones severas debidas a estafilococos meticilinoresistentes (Smith, *et al.*, *N Engl J Med* 1999; 340: 493-501).

Recientemente se han introducido en la práctica clínica nuevos fármacos para el tratamiento de infecciones estafilocócicas meticilinoresistentes, tales como quinupristina-dalfopristina y linezolid (Johnson, *et al.*, *Lancet* 1999; 354: 2012-2013, Livermore, *J Antimicrob Chemother*

2000; 46: 347-350). No obstante, ninguno de ellos se ha investigado con detenimiento en estudios clínicos para el tratamiento de osteomielitis.

El tratamiento de infecciones ortopédicas agudas y
5 crónicas es difícil, en parte debido a que muchas de las infecciones son causadas por agentes patógenos resistentes a antibióticos, pero también debido en parte a la localización de la infección. A menudo el tratamiento requiere una prolongada terapéutica con antibióticos y tratamiento quirúrgico
10 (Lazzarini et al., *Curr Infect Dis Rep* 2002; 4: 439-445). Se han llevado a cabo varios estudios con diversos modelos animales de osteomielitis (Rissing, *Infect Dis Clin North Am* 1990; 4: 377-390). A pesar de un prolongado tratamiento con antibióticos, aún se pueden hallar bacterias viables en el
15 hueso. La erradicación de más bacterias del hueso se ha asociado con una duración prolongada de tratamiento con antibióticos (Norden, *Rev Infect Dis* 1988; 10: 103-110). Tras cuatro semanas de tratamiento con antibióticos, la mayoría de los regímenes antibióticos fueron incapaces de erradicar los
20 estafilococos del hueso.

Tradicionalmente se administra el tratamiento antibiótico para osteomielitis por vía intravenosa. Sin embargo, se han probado con éxito regímenes orales para osteomielitis en estudios humanos (Bell, *Lancet* 1968; 10: 295-297, Feigin et
25 al., *Pediatr* 1975; 55: 213-223, Slama et al., *Am J Med* 1987; 82

(Suppl 4A): 259-261). Lamentablemente, la elección de agentes antimicrobianos orales es restringida cuando se manejan microorganismos resistentes a múltiples fármacos, y el tratamiento de estos microorganismos resistentes a múltiples fármacos puede requerir el uso de fármacos parenterales (Tice, *Infect Dis Clin North Am* 1998; 12: 903-919).

En consecuencia, aún hay necesidad de un método para el tratamiento de osteomielitis y/o artritis séptica causadas por infecciones bacterianas, especialmente las causadas por cepas bacterianas resistentes a antibióticos. La presente invención cubre esta necesidad de larga data.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención provee un método para el tratamiento de infecciones del hueso o de la médula ósea (a menudo denominadas osteomielitis) y/o infecciones articulares e infecciones de los tejidos circundantes (a menudo denominados artritis séptica) en un mamífero, de preferencia un humano. Este método comprende la administración al mamífero de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina y/o un agente antimicrobiano seleccionado del grupo formado por rifamicina, rifampicina, rifapentina, rifaximina o estreptovaricina, para tratar la infección. De preferencia, el antimicrobiano es rifampicina.

La infección puede ser causada por un agente patógeno

seleccionado del grupo formado por bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, bacterias anaerobias, y bacterias aerobias. Entre los ejemplos de estas bacterias se incluyen *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*,
5 *Salmonella*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*,
Escherichia, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Rickettsia*, neumococos, *Prevotella*, peptoestreptococos, *Bacteroides*, *Legionella*, estreptococos beta hemolíticos, estreptococos grupo B y espiroquetas. De preferencia, la infección se debe a *Neisseria*,
10 *Mycobacterium*, *Staphylococcus* y *Haemophilus*, con mayor preferencia a *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, o *Mycobacterium leprae*.

15 En realizaciones de preferencia, la infección comprende un agente patógeno que exhibe resistencia a antibióticos. Como ejemplos de resistencia a antibióticos se incluye la resistencia a meticilina, resistencia a glucopéptido, resistencia a tetraciclinas, resistencia a oxitetraciclinas,
20 resistencia a doxiciclina; resistencia a clortetraciclinas, resistencia a minociclina, resistencia a glicilciclina, resistencia a cefalosporinas, resistencia a ciprofloxacina, resistencia a nitrofurantoina, resistencia a trimetoprima-sulfas, resistencia a piperacilina/tazobactam, resistencia a
25 moxifloxacina, resistencia a vancomicina, resistencia a

teicoplanina, resistencia a penicilina y resistencia a macrólidos.

Una resistencia a glucopéptidos de preferencia es la resistencia a vancomicina. En otra realización de preferencia,
5 la infección comprende *S. aureus* que exhibe resistencia seleccionada del grupo formado por resistencia a glucopéptido, resistencia a tetraciclinas, resistencia a minociclina, resistencia a meticilina, resistencia a vancomicina y resistencia a antibióticos de glicilciclina distintos de
10 tigeciclina.

En otra realización, la infección comprende *Acinetobacter baumannii*, que puede o no exhibir resistencia a antibióticos seleccionada del grupo formada por resistencia a cefalosporinas, resistencia a ciprofloxacina, resistencia a
15 nitrofurantoína, resistencia a trimetoprima-sulfas, resistencia a y piperacilina/tazobactam.

En otra realización, la infección comprende *Mycobacterium abscessus* que puede o no exhibir resistencia a moxifloxacina. En otras realizaciones, la infección comprende *Haemophilus*
20 *influenzae*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, o *Rickettsia rickettsii*.

La presente invención también provee el uso de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina para el
25 tratamiento de osteomielitis y/o artritis séptica en un

mamífero. En otra realización, la presente invención provee el uso de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina y un agente antimicrobiano seleccionado del grupo formado por rifamicina, rifampicina, rifapentina, rifaximina o estreptovaricina para el tratamiento de osteomielitis y/o artritis séptica. En otra realización, la invención provee el uso de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de osteomielitis y/o artritis séptica en un mamífero. En otra realización se provee el uso de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina y un agente antimicrobiano seleccionado del grupo formado por rifamicina, rifampicina, rifapentina, rifaximina o estreptovaricina para el tratamiento de osteomielitis y/o artritis séptica en un mamífero.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos ilustran ciertas realizaciones de la presente invención y de ninguna manera intentan limitar el alcance de la invención.

20 La Figura 1 muestra farmacocinética de tigeciclina en conejos New Zealand blancos normales, que establece niveles séricos superiores a la concentración inhibitoria mínima más de doce horas después del tratamiento con 14 mg/kg de tigeciclina.

La Figura 2 muestra la gradación por los investigadores de
25 la extensión de la infección ósea como se observa en las

imágenes de rayos X. Los datos demuestran el efectivo tratamiento de la osteomielitis mediante tigeciclina y tigeciclina en combinación con rifampicina, sobre los controles.

5 La Figura 3 muestra las unidades formadores de colonias por gramo de médula y de hueso en cada uno de los tratamientos, lo cual demuestra que tigeciclina y tigeciclina en combinación con rifampicina fueron tratamientos efectivos de la infección del hueso y de la infección de la médula ósea respecto de los
10 controles.

La Figura 4A provee una descripción gráfica de los pesos de los conejos durante el curso temporal de la administración de diversos agentes antibacterianos.

La Figura 4B provee una descripción gráfica de las
15 variaciones de pesos de los conejos durante el curso temporal de la administración de diversos agentes antibacterianos.

Las Figuras 5A y 5B muestran los picos y valles de tigeciclina (14 mg/kg dos veces por día) y vancomicina (30 mg/kg dos veces por día) en el suero de conejos infectados,
20 tras la administración de los fármacos respectivos. Los datos demostraron que los niveles séricos de antibiótico eran superiores a las concentraciones inhibitorias mínimas durante el tratamiento.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a métodos para el tratamiento de infecciones de hueso y médula ósea en un mamífero. De preferencia, el mamífero es un humano. En una realización de preferencia, la infección de hueso o médula ósea causa osteomielitis. La osteomielitis es una infección aguda o crónica del hueso y/o la médula ósea, e incluye el proceso inflamatorio relacionado del hueso y sus estructuras debido a la infección por microorganismos piogénicos. La infección asociada con osteomielitis puede ser localizada o diseminarse por el periostio, la corteza, la médula y el tejido trabecular. Los agentes patógenos bacterianos comunes causales de osteomielitis varían sobre la base de la edad del paciente y al mecanismo de infección. La osteomielitis aguda incluye dos categorías principales: osteomielitis hematógena y osteomielitis por inoculación directa o contigua.

La osteomielitis hematógena es una infección causada por la siembra bacteriana desde la sangre. La osteomielitis hematógena aguda se caracteriza por una infección aguda del hueso causada por la siembra de la bacteria dentro del hueso, proveniente de una fuente remota. La osteomielitis hematógena ocurre sobre todo en niños. El sitio más frecuente es la metáfisis altamente vascular y de rápido crecimiento de los huesos en desarrollo. El aparente enlentecimiento y la sedimentación del flujo sanguíneo a medida que los vasos forman ángulos agudos en la metáfisis distal predispone a trombosis de

los vasos y a necrosis localizada del hueso, con siembra bacteriana. Estos cambios de la estructura ósea se puede detectar en las imágenes radiológicas. A pesar de su nombre, la osteomielitis hematógena aguda puede tener un desarrollo
5 clínico lento y un inicio insidioso.

La inoculación directa o contigua de osteomielitis es causada por el contacto del tejido con la bacteria durante un traumatismo o una cirugía. La osteomielitis por inoculación directa (foco contiguo) es una infección del hueso secundaria a
10 la inoculación de microorganismos por traumatismo directo, diseminación a partir de un foco de infección contiguo, o sepsis tras un procedimiento quirúrgico. Las manifestaciones clínicas de la osteomielitis por inoculación directa son más localizadas que las de la osteomielitis hematógena, y tienden a
15 comprometer múltiples microorganismos / agentes patógenos.

Otras categorías incluyen osteomielitis crónica y osteomielitis secundaria a enfermedad vascular periférica. La osteomielitis crónica persiste o recurre, con independencia de la causa y/o mecanismo inicial y a pesar de la intervención
20 agresiva. Si bien se considera una etiología, la enfermedad vascular periférica en realidad es un factor predisponente más que una causa verdadera de infección.

Los síntomas de osteomielitis a menudo incluyen fiebre alta, fatiga, irritabilidad y malestar. A menudo hay
25 restricción de movimientos en el miembro o articulación

infectado. Por lo general, la infección viene acompañada de edema local, eritema y sensibilidad, y puede haber calor alrededor de la zona afectada. También puede haber drenaje de los tractos sinusales en estadios más tardíos de la infección.

5 Por lo general, la osteomielitis hematógena se presenta con una progresión insidiosa lenta de síntomas, mientras que la osteomielitis cónica puede incluir una úlcera que no cura, drenaje del tracto sinusal, fatiga crónica y malestar. Por lo general, la osteomielitis directa se presenta con síntomas y

10 signos destacados en una zona más localizada.

Se sabe que ciertos estados patológicos predisponen a los pacientes a osteomielitis. Estos estados incluyen diabetes mellitus, enfermedad de células falciformes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), abuso de drogas IV,

15 alcoholismo, uso crónico de esteroides, inmunosupresión y artropatías crónicas. Además, la presencia de un dispositivo protésico ortopédico es un factor de riesgo independiente, al igual que cualquier cirugía ortopédica o fractura abierta recientes.

20 Varios agentes patógenos bacterianos son causales comunes conocidas de osteomielitis aguda y directa. Por ejemplo, la osteomielitis directa aguda en recién nacidos (menores de 4 meses) suele ser causada por *S. aureus*, especies de *Enterobacter*, y especies de *Streptococcus* grupos A y B. En

25 niños de entre 4 meses y 4 años, la osteomielitis hematógena

aguda suele ser causada por *S. aureus*, especies de *Streptococcus* grupo A, *Haemophilus influenzae*, y especies de *Enterobacter*. En niños y adolescentes entre 4 años y adultos, la osteomielitis hematógica aguda suele ser causada por *S.*
5 *aureus* (80%), especies de *Streptococcus* grupo A, *Haemophilus influenzae*, y especies de *Enterobacter*. En adultos, la osteomielitis hematógica aguda suele ser causada por *S. aureus* y, en ocasiones, especies de *Enterobacter* o *Streptococcus*. En épocas pasadas, el tratamiento primario incluía una combinación
10 de penicilina sintética resistente a penicilinasa y una cefalosporina de tercera generación. La terapéutica alternativa incluye vancomicina o clindamicina y una cefalosporina de tercera generación. Además de estos agentes antibacterianos antes mencionados, se han usado ciprofloxacina y rifampicina en
15 terapéutica combinada para pacientes adultos. En los casos de evidencias de infección por bacilos gramnegativos, a menudo se administra una cefalosporina de tercera generación.

En general, la osteomielitis directa suele ser causada por *S. aureus*, especies de *Enterobacter*, y especies de *Pseudomonas*.
20 A menudo, la osteomielitis directa es causada por una herida punzante a través de un calzado deportivo. En estos casos, la osteomielitis directa suele ser causada por *S. aureus* y especies de *Pseudomonas*. En este escenario, los principales antibióticos incluyen ceftazidime o cefepime. A menudo se
25 utiliza ciprofloxacina como tratamiento alternativo. En

234
135

pacientes con enfermedad de células falciformes, la osteomielitis directa suele ser causada por *S. aureus* y especies de *Salmonella*, y la principal elección de tratamiento es un antibiótico de fluoroquinolona (no en niños). Una
5 elección alternativa es una cefalosporina de tercera generación (p.ej., ceftriaxona).

Para pacientes con osteomielitis debida a traumatismo, por lo general los agentes infecciosos incluyen *S. aureus*, bacilos coliformes y *Pseudomonas aeruginosa*. Los antibióticos
10 principales son nafcilina y ciprofloxacina. Entre las alternativas se incluyen vancomicina y una cefalosporina de tercera generación con actividad antipseudomonas.

En consecuencia, tal como se usa en la presente y en las reivindicaciones, el término "osteomielitis" incluye
15 osteomielitis hematógena, osteomielitis de inoculación directa o contigua, osteomielitis crónica y osteomielitis secundaria a enfermedad vascular periférica. La osteomielitis puede ser consecuencia de infecciones causadas por cualquiera de los agentes patógenos antes descritos, sino también otros agentes
20 patógenos con capacidad para infectar el hueso, la médula ósea, la articulación o el tejido circundante.

El término "tratamiento de osteomielitis" incluye la erradicación de los agentes patógenos / bacterias causales de infección asociada con osteomielitis, la inhibición de
25 crecimiento bacteria, la reducción de la concentración

bacteriana, la reducción del tiempo de recuperación de la infección, el mejoramiento, la eliminación o la reducción de los síntomas de infección tales como tumefacción, necrosis, fiebre, dolor, debilidad y/u otros indicadores seleccionados como medidas adecuadas por los expertos en el arte.

En la actualidad, el principal tratamiento de osteomielitis consiste en antibióticos parenterales que penetran las cavidades óseas y articulares. Se requiere tratamiento durante al menos cuatro a seis semanas. Después de iniciar la administración de antibióticos intravenosos en un paciente internado se puede continuar la terapéutica con antibióticos intravenosos u orales, según el tipo y la localización de la infección, para pacientes externos.

Por ejemplo, por lo general la osteomielitis causada por infección por *S. aureus* se trata con 2 gramos de cloxacilina administrada por vía intravenosa o parenteral cada seis horas, durante al menos los primeros 14 días, o durante todo el curso del tratamiento de hasta seis semanas. Otros tratamientos son cefazolina administrada en 1-2 gramos cada ocho horas durante seis semanas o 600 mg de clindamicina cada ocho horas durante seis semanas.

En general, la osteomielitis causada por estreptococos beta-hemolíticos se trata por vía intravenosa o parenteral con penicilina bencílica con dos millones de UI cada cuatro a seis horas durante dos a cuatro semanas. Las infecciones por

Salmonella spp. se tratan con ciprofloxacina a 750 mg por vía oral cada 12 horas durante seis semanas.

En general, el tratamiento de la osteomielitis causada por *Haemophilus influenzae* en niños consiste en la administración intravenosa o parenteral de 25-50 mg de cloxacilina cada cuatro a seis horas durante cuatro a seis días, mas ceftriaxona en 50-75 mg/kg cada 24 horas durante cuatro a seis días. Este tratamiento se continúa con amoxicilina en 15 mg/kg más ácido clavulánico por vía oral (máximo 500 mg) cada ocho horas durante cuatro semanas.

En recién nacidos se logra el tratamiento con cloxacilina por vía intravenosa o parenteral en 25-50 mg/kg cada cuatro a seis horas durante cuatro a seis días, más cefotaxime intravenoso o parenteral en 50-75 mg/kg cada ocho horas durante cuatro a seis días. Se sigue el tratamiento con amoxicilina en 15 mg/kg más ácido clavulánico oral (máximo 500 mg) cada ocho horas durante cuatro semanas.

En general, la infección en niños por *S. aureus* se trata mediante la administración intravenosa o parenteral de 25-50 mg de cloxacilina cada cuatro a seis horas durante cuatro a seis días, mas ceftriaxona en 50-75 mg/kg cada 24 horas durante cuatro a seis días. Este tratamiento se sigue con cloxacilina en 12,5 mg/kg por vía oral cada seis horas durante tres o cuatro semanas.

El tratamiento de la infección en niños por *Salmonella*

138 787

spp. depende de la susceptibilidad del agente patógeno. Las elecciones de tratamiento incluyen cloxacilina más ceftriaxona, seguido de sulfametoxazol en 20 mg/kg y trimetoprima en 4 mg/kg por vía oral cada 12 horas durante seis semanas, c amoxicilina
5 en 7,5-15 mg/kg por vía oral cada 12 horas durante seis semanas, o ciprofloxacina en 10-15 mg/kg cada cuatro a seis horas durante cuatro a seis días, más cefotaxime en 50-75 mg/kg por vía intravenosa cada ocho horas durante cuatro a seis días, seguido de sulfametoxazol y trimetoprima o amoxicilina o
10 ciproflaxacina.

Otra realización de la presente invención provee métodos para el tratamiento de infecciones articulares y/o infecciones de tejidos circundantes en un mamífero. De preferencia, el mamífero es un humano. En una realización de preferencia, la
15 infección articular y/o la infección de tejidos circundantes causa artritis séptica.

La artritis séptica es una infección de la articulación y los tejidos circundantes, y causa inflamación de la articulación causada por la presencia de microorganismos
20 intraarticulares vivos. Con mayor frecuencia, la artritis séptica es secundaria a osteomielitis, especialmente en la infancia, es consecuencia de la infección bacteriana.

La infección de la articulación se puede producir por varias vías. Con mayor frecuencia, la diseminación del agente
25 patógeno infectante es hematógena. Con frecuencia, la artritis

séptica se origina a partir de infecciones o abscesos en la piel. La sepsis en la boca y los dientes o tras procedimientos dentales o en asociación con infecciones de las vías respiratorias o urogenitales también pueden causar artritis séptica. Los traumatismos penetrantes directos de la articulación con objetos punzantes, o por lesiones traumáticas importantes también pueden causar infección articular. La aspiración o la inyección articular y los procedimientos quirúrgicos tales como el reemplazo articular también pueden causar infección articular. Además, a menudo la osteomielitis se disemina y afecta la articulación. Esto es especialmente común en niños pequeños. Por último, la infección de los tejidos blandos adyacentes a la articulación, por ejemplo la inflamación de las bolsas o vainas tendinosas, se pueden diseminar hasta afectar el espacio articular. La diseminación de la infección por vía hematógena sigue siendo la causa más frecuente de sepsis articular.

Entre los síntomas de artritis séptica se incluyen malestar y fiebre, articulación o articulaciones calientes agudas, junto con inflamación aguda: tumefacción y efusión articular, enrojecimiento, dolor y pérdida de función.

Los microorganismos causales de artritis séptica más comunes son *Staphylococcus aureus*. En artritis séptica neonatal también son agentes patógenos comunes *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae*. En niños de hasta 5 años, la causa más

común de sepsis articular hematogena es *Haemophilus influenzae*. Las bacterias gramnegativas intestinales también son agentes patógenos comunes en ancianos y en personas con diabetes mellitus o prótesis articulares. En los casos de lesiones
5 penetrantes, y en personas que abusan de drogas intravenosas a menudo se encuentra infección por *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus epidermidis*. En adultos jóvenes sanos, en ocasiones la causa de artritis séptica es la infección por *Neisseria gonorrhoeae* o por meningococos. La artritis séptica
10 crónica de grado bajo, especialmente en la columna, puede ser consecuencia de infección por microorganismos tales como *Mycobacteria* o *Brucella abortus*. Además, el rango de agentes patógenos en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida es variado.

15 Algunos de los agentes patógenos de artritis séptica más comunes incluyen, sin limitaciones, (1) grampositivos: *Staphylococcus aureus* (80% de los casos), *Streptococcus pyogenes/pneumoniae*; (2) gramnegativos: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae/meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*,
20 *Bacteroides fragilis*, especies de *Brucella*, especies de *Salmonella*, bacterias fusiformes; (3) bacilos ácido-alcohol resistentes: *Mycobacterium tuberculosis*, micobacterias atípicas; y (4) espiroquetas: *Leptospira icterohaemorrhagica*.

En consecuencia, tal como se usa en la presente y en las
25 reivindicaciones el término "artritis séptica" incluye

infecciones articulares y de los tejidos circundantes causados por los agentes patógenos antes mencionados, además de cualquier otro agente patógeno con capacidad para infectar la articulación y los tejidos circundantes. Los tejidos
5 circundantes incluyen, sin limitaciones, el músculo circundante, los tendones relacionados, los huesos conectados, las bolsas, las vainas tendinosas, el sinovio, el líquido sinovial y el cartílago relacionado.

El término "tratamiento de la artritis séptica" incluye la
10 erradicación de los agentes patógenos / bacterias causales de la infección subyacente asociada a artritis séptica, la inhibición del desarrollo bacteriano, la reducción de la concentración bacteriana, la reducción del tiempo de recuperación de la infección, el mejoramiento, la eliminación,
15 o la reducción de síntomas de infección tales como tumefacción, necrosis, fiebre, dolor, debilidad, y/u otros indicadores seleccionados como medidas adecuadas por los expertos en el arte.

Por lo general, las articulaciones sépticas se tratan
20 durante cuatro a seis semanas, mientras que las artroplastias infectadas se tratan durante cuatro a seis semanas o más. (Calhoun et al., *Am. J. of Surgery* 1989; 157: 443-449, Calhoun et al., *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 1988; 114: 1157-1162, Gordon et al., *Antimicrob Agents*
25 *Chemother* 2000; 44(10): 2747-2751, Mader et al., *West J Med*

1988; 148: (5)568, Mader et al., *Orthopaedic Review* 1989; 18: 581-585, Mader et al. *Drugs & Aging* 2000; 16(1): 67-80). Estos prolongados tratamientos antibióticos se tornan aún más problemáticos cuando hay bacterias resistentes a fármacos, tales como *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

Antes de la caracterización del agente patógeno, por lo general el tratamiento de la artritis séptica en adultos comienza con 2 g de cloxacilina por vía intravenosa o intramuscular cada seis horas en combinación con 1-2 g de ceftriaxona cada 24 horas. En niños mayores de dos meses, el tratamiento incluye cloxacilina por vía intravenosa o intramuscular en 25-50 mg/kg, hasta un máximo de 2 g cada seis horas, en combinación con ceftriaxona 25-50 mg/kg hasta un máximo de 2 g cada 24 horas. En neonatos, el tratamiento incluye cloxacilina por vía intravenosa o intramuscular en 50-75 mg/kg hasta un máximo de 2 g por vía intravenosa cada ocho horas. Otros tratamientos antibióticos incluyen cefotaxima, flucloxacilina, y penicilina bencílica.

Una vez identificado el agente patógeno, el curso común de tratamiento se basa en los agentes patógenos infectantes presentes. Por ejemplo, cuando se determina que la infección comprende *Staphylococcus aureus*, a menudo se trata la artritis séptica con cloxacilina por vía intravenosa cada seis horas, o cefazolina cada ocho horas, o clindamicina cada ocho horas, donde el tratamiento elegido dura dos o tres semanas. El S.

aureus meticilinoresistente se trata con vancomicina administrado por vía parenteral.

El tratamiento antibiótico de osteomielitis y artritis séptica es aún un desafío para el médico. Muchas infecciones
5 ortopédicas se adquieren en el ambiente hospitalario (Hollom et al., *Clin Orthop* 2002; 403: 38-44). Además, los agentes causales de estas infecciones a menudo son resistentes a múltiples fármacos. Los estafilococos son los microorganismos hospitalarios resistentes a fármacos más comunes, pero también
10 pueden intervenir agentes patógenos gramnegativos (Cunha, *Clin Infect Dis* 2002; 35: 287-293).

Las infecciones debidas a *Staphylococcus aureus* meticilinoresistentes, comparadas con las debidas a *S. aureus* meticilinosensibles, son más difíciles de tratar y pueden tener
15 un peor pronóstico (Cosgrove et al., *Clin Infect Dis* 2003; 36: 53-59). Las opciones terapéuticas para estas infecciones son limitadas. Los únicos fármacos con eficacia constante contra todas las cepas de estafilococos y extensamente estudiados para el tratamiento de infecciones óseas son los glucopéptidos.
20 Lamentablemente, ya se ha reconocido la resistencia a estos antibióticos como uno de los principales problemas del tratamiento de agentes patógenos grampositivos. Los enterococos resistentes a vancomicina tienen distribución mundial, y dicha resistencia ha demostrado ser potencialmente transmisible a
25 otros microorganismos grampositivos *in vitro* (Noble, et al.,

FEMS Microbiology Letters 1992; 72:195-198). Además, se han aislado cepas esporádicas de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina en varios países (Hiramatsu, *Am J Med* 1998; 104:7S-10S, Hamilton-Miller, *Infección* 2002; 30: 118-124). En consecuencia, tiene fundamental importancia la disponibilidad de agentes antimicrobianos alternativos para el tratamiento de patógenos resistentes a múltiples fármacos.

Tigeciclina (antes a menudo aún denominado "GAR-936") es un derivado sintético 9-t-butilglicilamido de una nueva clase de antibióticos denominados glicilciclinas. Esta nueva clase de derivados de las tetraciclinas demostró una excelente actividad *in vitro* contra una gran cantidad de microorganismos grampositivos y gramnegativos, aerobios y anaerobios, incluso *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente (MRSA), enterococos vancomicinaresistentes (incluso *Enterococcus faecalis*), neumococos penicilinoresistentes/macrolidoresistentes, *Prevotella* spp., *peptostreptococos*, y *Mycobacterium* spp. (Boucher et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(8): 2225-2229, Gales et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 46: 19-36, Goldstein et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(10): 2747-2751). Las tetraciclinas son agentes bacteriostáticos que actúan por inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas. Se han desarrollado glicilciclinas para superar los mecanismos bacterianos de resistencia a las tetraciclinas, si bien aún no se ha determinado el mecanismo de

acción exacto (Rasmussen et al., *Antimicrob Agents Chemotner* 1995; 38: 1658-1660).

La tigeciclina se concentra en hueso, médula ósea, articulaciones y líquido sinovial, además de muchos otros
5 órganos y tejidos de interés. Además, se ha descubierto que tigeciclina se concentra en las porciones infectadas de los tejidos antes descritos. Los estudios de farmacocinética de tigeciclina intravenosa en humanos han demostrado que hay una fase de difusión rápida, con una vida media prolongada (40 a 60
10 horas) y un elevado volumen de distribución en estado estable (7 a 14 L/kg). Estudios en animales con tigeciclina con marca radiactiva sugieren que esta fase de distribución rápida y elevado volumen de distribución en estado estable representa la penetración de tigeciclina en tejidos que incluyen pulmones y
15 hueso.

Por ejemplo, se ha demostrado la distribución de tigeciclina en tejidos de ratas Sprague-Dawley cuando se administra [^{14}C] tigeciclina en una dosis de 3 mg/kg por infusión IV durante 30 minutos. En general, hubo una buena
20 distribución de la radiactividad en la mayoría de los tejidos, y se observó la mayor exposición global en hueso. Las exposiciones en tejidos que mostraron las mayores concentraciones fueron las siguientes: hueso>médula ósea >glándula salival, tiroides, bazo y riñón. En cada uno de estos
25 tejidos, la relación de superficie bajo la curva concentración-

tiempo (AUC) en tejidos respecto de AUC en plasma fue superior a 10. En este estudio, la relación entre AUC en el pulmón de rata y AUC en plasma fue de 4,4. Además, se ha demostrado que la tigeciclina administrada por vía intravenosa penetra en el
5 tejido óseo de humanos y la administración intravenosa extiende la concentración de tigeciclina en líquido sinovial en humanos en el tiempo.

Los inventores descubrieron que tigeciclina es un tratamiento útil de osteomielitis y artritis séptica. El
10 espectro antimicrobiano es amplio, e incluye todos los agentes patógenos hallados en las infecciones nosocomiales de huesos y articulaciones. Las propiedades farmacocinéticas son favorables, dado que el fármaco se puede administrar dos veces por día. Además, se hallaron penetración ósea y niveles
15 farmacológicos superiores a la concentración inhibitoria mínima (CIM) en casi todas las muestras obtenidas. La concentración inhibitoria mínima es un método para determinar la eficacia de un compuesto en la inhibición del crecimiento bacteriano. Es la menor concentración de un agente antimicrobiano que inhibe el
20 desarrollo de un microorganismo, y debería corresponder a concentraciones requeridas en los sueros de los mamíferos para el tratamiento mínimo. Además, la tigeciclina proporcionó un buen perfil de seguridad en humanos, lo que demuestra que el agente antimicrobiano debería ser adecuado para estudios
25 clínicos sobre infecciones ortopédicas.

proteus, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia rickettsii*,
Mycobacterium leprae, *Mycobacterium abscessus*, o *Mycoplasma*
pneumoniae.

En una realización de la presente invención se provee un
5 método para el tratamiento de infecciones de hueso, médula
ósea, articulaciones y los tejidos circundantes, y un método
para el tratamiento de osteomielitis y/o artritis séptica
causados por las cepas bacterianas (tales como las antes
descritas) que muestran resistencia a antibióticos por la
10 administración de una cantidad farmacéuticamente efectiva de
tigeciclina. Por ejemplo, la resistencia exhibida puede ser,
sin limitaciones, resistencia a meticilina, resistencia a
glucopéptido, resistencia a tetraciclina, resistencia a
oxitetraciclina, resistencia a doxiciclina; resistencia a
15 clortetraciclina, resistencia a minociclina, resistencia a
glicilciclina, resistencia a cefalosporina, resistencia a
ciprofloxacina, resistencia a nitrofurantoína, resistencia a
trimetoprima-sulfas, resistencia a piperacilina/tazobactam,
resistencia a moxifloxacina, resistencia a vancomicina,
20 resistencia a teicoplanina, resistencia a penicilina, y
resistencia a macrólidos.

En una realización de preferencia, la resistencia a
glucopéptido es resistencia a vancomicina. En otra realización
de preferencia, la infección comprende *S. aureus* que exhibe
25 resistencia de resistencia a glucopéptido, resistencia a

tetraciclina, resistencia a minociclina, resistencia a meticilina, resistencia a vancomicina o resistencia a un antibiótico de glicilciclina distinto de tigeciclina.

En otra realización de preferencia, la infección comprende 5 *Acinetobacter baumannii* que puede o no exhibir resistencia a antibióticos tales como resistencia a cefalosporinas, resistencia a ciprofloxacina, resistencia a nitrofurantoína, resistencia a trimetoprima-sulfas, y resistencia a piperacilina/tazobactam. En otra realización, la infección 10 comprende *Mycobacterium abscessus* que puede o no exhibir resistencia a moxifloxacina.

En el tratamiento de humanos y otros mamíferos, tigeciclina se administra más comúnmente por vía intravenosa, si bien los expertos en el arte disponen de otras vías de 15 administración. Los sujetos humanos toleran dosis de hasta 100 mg administradas durante infusiones de una hora. Las administraciones dos veces al día durante nueve días de 75 mg o más en infusiones de 200 ml durante una hora a sujetos alimentados 30 minutos antes de la infusión produjeron 20 intolerancia gastrointestinal en todos los sujetos, con náuseas y vómitos. Fue tolerada la administración dos veces diarias de 25-50 mg en infusiones de 200 ml durante una hora. También se toleró una única infusión de 100 mg, con concentraciones séricas pico promedio de 0,9 a 1,1 microgramos/ml.

25 La administración de 14 mg/kg dos veces al día a conejos

New Zealand White produjo niveles de estado estable superiores a la concentración inhibitoria mínima. Véase Figura 1. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) y concentraciones bactericidas mínimas (CBM) para tigeciclina en las cepas MRSA
5 utilizadas en este estudio fueron inferiores a 0,2 g/ml y 0,2 g/ml, respectivamente. La medición de CBM provee un método para la determinación de la eficacia de un compuesto en la eliminación de las bacterias. La técnica de CBM establece el nivel mínimo de un agente bactericida que eliminará al menos
10 99,9% de los organismo en un inóculo estándar.

Las CIM y CBM fueron determinadas por Mercier et al. para tigeciclina contra *E. faecium* resistente a vancomicina en 0,125 g/ml y entre 16 y 32 g/ml, respectivamente. Para *S. aureus*, las concentraciones inhibitorias mínimas y las concentraciones
15 bactericidas mínimas fueron entre 0,25 y 1 g/ml y 16 y 64 g/ml, respectivamente. En un estudio de uso compasivo, los inventores hallaron que la concentración inhibitoria mínima de tigeciclina contra *M. abcessus* en un paciente humano fue de 0,25 g/ml.

20 En mamíferos, *S. aureus* meticilinoresistente se puede tratar con tigeciclina en el rango de 5 mg/kg a 60 mg/kg dos veces al día, con mayor preferencia 10 mg/kg a 40 mg/kg, con mayor preferencia 12 mg/kg a 20 mg/kg. Las dosificaciones adecuadas para el tratamiento de otros agentes patógenos serán
25 aparentes a los expertos en el arte.

En un estudio de uso compasivo, un paciente humano padecía espina bífida con consecuente paraplejía. El paciente tenía alergia severa a sulfas y se presentó con bacteriemia melicililorresistente por talón decúbito infectado. El paciente
5 también presentaba degradación cutánea sobre el isquión derecho. Se debridó la úlcera, pero no curó. Una IRM reveló osteomielitis y una sección del hueso fue positiva para infección por *Acinetobacter baumannii*.

El *A. baumannii* era resistente a cefalosporinas,
10 ciprofloxacina, nitrofurantoina, y mostró resistencia intermedia a trimetoprima-sulfas y piperacilina/tazobactam. El microorganismo era susceptible a imipenem, gentamicina y tobramicina. Se trató el paciente con meropenem y tobramicina. Luego se reemplazó meropenem por aztreonam debido a la
15 presencia de eosinofilia. Luego se discontinuó aztreonam debido a eosinofilia persistente. También se discontinuó tobramicina debido al aumento de la creatinina. Luego se trató el paciente con tigeciclina durante dos meses con 50 mg cada 12 horas o 50 mg cada 24 horas. Al cabo de un mes de recibir tratamiento con
20 tigeciclina, una IRM mostró la resolución de la osteomielitis y se observó notable mejoría en el líquido obtenido de la zona isquial derecha. Se informó que el paciente evolucionaba bien diez semanas después del tratamiento con tigeciclina.

En otro estudio de uso compasivo, un paciente con
25 displasia ectodérmica anhidrótica e inmunodeficiencia tenía

287
152

antecedentes de tres años y medio de osteomielitis vertebral con infección *Mycobacterium abscessus*. La debridación se logró tras un año un año de infección con colocación de hardware. El paciente mostró cierta mejoría con cefoxitana, claritromicina y ampicilina. Más tarde se interrumpió la ampicilina debido a deterioro renal. Más tarde se agregó linezolid y azitromicina al régimen terapéutico. Se determinó que el microorganismo era resistente a moxifloxacina.

Más adelante, el paciente se presentó con una nueva osteomielitis vertebral justo por encima del sitio de la vieja infección. Se realizó una biopsia y se determinó que no era necesaria una debridación adicional. Se halló que el microorganismo sólo era sensible a cefoxitina. Se determinó que sería útil otro agente antimicrobiano, y se encontró que el microorganismo era susceptible a tigeciclina. Se administró tigeciclina en CIM 0,25 microgramos/ml. El recuento de leucocitos del paciente era normal, había hipogamaglobulinemia y disminución de la función linfocitaria. El paciente también había estado bajo tratamiento con IL-12, pero se mantuvo IL-12 durante el tratamiento antibiótico. Se informó que el paciente evolucionaba bien un año después del tratamiento.

Otra realización de la presente invención provee un método para el tratamiento de infecciones de hueso, médula ósea, articulaciones y tejido circundante, y un método para el tratamiento de osteomielitis y/o artritis séptica en un

mamífero, de preferencia un humano, que comprende la administración al mamífero de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina y un agente antimicrobiano de la familia de ansamicina, que incluye los grupos de antibióticos rifamicina y estreptovaricina. La familia de rifamicina incluye rifampicina, rifapentina, rifaximina, y de preferencia, rifampicina. Estos antibióticos macrocíclicos tienen actividad bactericida debido a su propensión a unirse a ARN polimerasa. Estos antibióticos son útiles en combinación con tigeciclina pues efectúan distintos pasos en la síntesis de proteínas bacterianas. Mientras que las rifamicinas actúan con la ARNpolimerasa y limitan la producción de ARN mensajero, la tigeciclina tiene acción sobre los ribosomas y la producción de las proteínas a partir del ARN mensajero. El modo de acción de la tigeciclina parece estar relacionado con la inactivación de los ribosomas 70S a través de la unión al sitio de fijación de una tetraciclina en la subunidad ribosomal 30S con una orientación algo diferente que la tetraciclina. (Bauers et al., *J. Antimicrob Chemother.* 2004; 53(4): 592-599).

Los presentes inventores descubrieron que tigeciclina en combinación con un antibiótico de la clase de antimicrobianos de rifamicina provee efecto antimicrobiano aditivo en tejidos infectados. En una investigación con conejos inoculados en la tibia con *S. aureus* meticilinoresistentes, el tratamiento de osteomielitis con tigeciclina en combinación con rifampicina no

demostró infección en hueso en 10 conejos mientras los controles mostraron infección en 11 de 15 conejos. El tratamiento en médula ósea tampoco demostró infección en 10 conejos mientras los controles mostraron 5 conejos infectados de 15 conejos estudiados. Además el tratamiento de osteomielitis en conejos con tigeciclina sola demostró infección en hueso de un conejo de 10 y sin infección en la médula ósea.

En mamíferos, el tratamiento con rifampicina puede estar en el rango de 10 mg/kg a 100 mg/kg dos veces por día, con mayor preferencia puede estar en el rango de 20 mg/kg a 70 mg/kg dos veces por día, con mayor preferencia puede estar en el rango de 30 mg/kg a 50 mg/kg dos veces por día. En conejos New Zealand White infectados por MRSA, el tratamiento con 40 mg/kg dio por resultado actividad bactericida. Los niveles de concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima para rifampicina contra la cepa MRSA fueron de 0,78 µg/ml y 1,56 µg/ml, respectivamente, para dar una proporción de 0,5.

La administración oral a humanos de rifampicina está disponible en cápsulas de 150 y 300 mg. Tras una dosis única de 600 en adultos humanos sanos, las concentraciones séricas pico promediaron 7 microgramos/ml pero con amplia variación entre 4 y 32 microgramos/ml. Con la administración de 600 mg por vía intravenosa a humanos adultos sanos durante 30 minutos se

obtuvieron concentraciones séricas pico promedio de aproximadamente 17 microgramos/ml.

De preferencia, la administración de tigeciclina es por vía intravenosa o intramuscular, mientras que la rifampicina se puede administrar por vía intravenosa, intramuscular, oral o por otras vías de administración conocidas en el arte, tales como sistemas de administración transbucal, intrapulmonar o transdérmica. La administración conjunta puede incluir una combinación de cualquiera de estos métodos. Por ejemplo, se puede administrar tigeciclina por vía intravenosa, mientras que la rifampicina se puede administrar por vía oral. La administración conjunta incluye la administración simultánea o secuencial en cualquier orden y no necesariamente implica la administración simultánea a la misma hora o el mismo día o el mismo esquema de tiempo. De preferencia se mantienen las concentraciones de tigeciclina y rifampicina concurrentemente bien por encima de la concentración inhibitoria mínima.

En un estudio de los inventores, un grupo de conejos infectados por *S. aureus* meticilinoresistentes y tratados con tigeciclina mostró menos unidades formadoras de colonias en hueso y médula ósea que el grupo control infectado y no tratado, o el grupo tratado con vancomicina al final de periodo de tratamiento. La CIM y la CBM para tigeciclina (0,2 g/ml) fueron inferiores que para vancomicina (0,39 g/ml y 0,78 g/ml), lo que mejora la resolución de las infecciones

osteomielíticas. La asociación de tigeciclina y rifampicina permitió la erradicación completa de bacterias de la médula ósea, mientras que en el grupo con vancomicina más rifampicina una muestra seguía siendo positiva. Véase Figura 3. El
5 tratamiento fue exitoso con la administración subcutánea de 14 mg/kg de tigeciclina dos veces por día y la administración oral de 40 mg/kg de rifampicina dos veces por día. Estos datos demuestran que la osteomielitis en conejos con infección por *S. aureus* meticilinoresistente se trata eficazmente con una
10 combinación de tigeciclina y rifampicina.

En consecuencia, de acuerdo con las descripciones de la presente, tales como los regímenes de dosificación y de tratamiento (es decir, longitud y modo de administración, y curso temporal de la terapéutica) utilizados en los estudios de
15 uso comparativo antes descritos los típicos regímenes de dosificación y de tratamiento de los antibióticos comunes administrados a pacientes para tratar infecciones con los agentes patógenos enumerados, y los regímenes de dosificación y de tratamiento utilizados en el estudio con conejos, un experto
20 en el arte apreciará el régimen de dosificación y de tratamiento adecuado para administrar a un mamífero a fin de lograr una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina y/o antimicrobianos adicionales tales como rifampicina, para tratar osteomielitis y/o artritis séptica. Un experto en el
25 arte apreciará que factores tales como la extensión de la

infección, la salud general, el peso y la edad del paciente tendrán efecto sobre el régimen de dosificación y tratamiento buscado.

El término "cantidad farmacológicamente efectiva " significa, de acuerdo con consideraciones conocidas en el arte con la cantidad de agente antimicrobiano efectiva para lograr un efecto farmacológico o una mejoría terapéutica sin efectos secundarios adversos indebidos, incluyendo, sin limitaciones, inhibición del desarrollo bacteriano, reducción de la concentración de bacterias, reducción del tiempo de recuperación de la infección, mejoramiento, eliminación, o reducción de los síntomas de infección u otros patológicos tales como tumefacción, necrosis, fiebre, dolor, debilidad, y/u otros indicadores, como se seleccione como medidas adecuadas para los expertos en el arte.

Otra realización de la presente invención provee el uso de tigeciclina con o sin un agente antimicrobiano seleccionado del grupo formado por rifamicina, rifampicina, rifapentina, rifaximina, o estreptovaricina (de preferencia rifampicina) para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones de hueso, médula ósea, articulaciones y tejidos circundantes, y osteomielitis y/o artritis séptica en un mamífero, de preferencia un humano.

Otra realización provee una composición farmacéutica para el tratamiento de infecciones de hueso, médula ósea,

articulaciones y tejidos circundantes, y osteomielitis y/o artritis séptica en un mamífero, de preferencia un humano, que comprende tigeciclina, con o sin un agente antimicrobiano seleccionado del grupo formado por rifamicina, rifampicina, 5 rifapentina, rifaximina, o estreptovaricina (de preferencia rifampicina), y diluyentes, conservadores, solubilizantes, emulsionantes, coadyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables y convencionalmente utilizados en formulaciones farmacéuticas y veterinarias. Las presentes formulaciones 10 farmacéuticas se pueden adaptar para la administración a humanos y/o animales.

Otra realización de la presente invención provee el uso de tigeciclina con o sin un agente antimicrobiano seleccionado del grupo formado rifamicina, rifampicina, rifapentina, rifaximina, 15 o estreptovaricina (de preferencia rifampicina) para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones de hueso, médula ósea, articulaciones y tejidos circundantes, y osteomielitis y/o artritis séptica en un mamífero, de preferencia un humano.

20 Se entiende que las diversas realizaciones de la presente invención, tigeciclina y/o rifampicina y otros agentes antimicrobianos pueden estar presentes como las correspondientes sales farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, dichas sales pueden incluir, sin limitaciones, las

sales de clorhidrato, sulfato o fosfato. También pueden incluir las sales de acetato, citrato o lactato, por ejemplo.

El medicamento o composición farmacéutica se administra en una dosis para obtener una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina y una cantidad farmacológicamente efectiva de un agente antimicrobiano seleccionado del grupo formado por rifamicina, rifampicina, rifapentina, rifaximina, o estreptovaricina (de preferencia rifampicina). La composición farmacéutica y/o medicamento además comprende diluyentes, conservadores, solubilizantes, emulsionantes, coadyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Pueden incluir, sin limitaciones, sacarosa, manitol, sorbitol, lecitinas, polivinilpirrolidonas, celulosas microcristalinas, metilcelulosas, carboximetilcelulosas, hidroxietilcelulosas, hidroxipropilcelulosas; almidones, poliacrilatos, etilcelulosas, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y sus derivados, triacetina, dibutilftalato, dibutilsebacato, ésteres de ácido cítrico, polietilenglicoles, polipropilenglicoles, polivinilpirrolidona, lactosa, sacarosa, estearato de magnesio, talco, o aceite de silicona.

Para la administración oral, se pueden utilizar formulaciones farmacológicas tales como, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, emulsiones, soluciones, jarabes o suspensiones. Para la administración parenteral, las

formulaciones se pueden utilizar como ampollas, o como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos. Es obvio que la necesidad de agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión tendrán en cuenta la solubilidad de los compuestos activos en los vehículos que se utilizan en las realizaciones particulares. Las formulaciones pueden además contener conservadores y antioxidantes fisiológicamente compatibles.

Las formulaciones farmacológicas también se pueden utilizar como supositorios con las bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Como alternativa, las formulaciones pueden estar disponibles en forma de depósito, que liberará el compuesto activo lentamente en el organismo, durante un periodo de tiempo preseleccionado.

Los siguientes ejemplos se presentan a fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención y no pretenden de ninguna manera limitar la presente invención.

EJEMPLOS

20 EJEMPLO 1: Tratamiento de osteomielitis en conejos con tigeciclina

Este ejemplo muestra el tratamiento de osteomielitis en conejos con tigeciclina y tigeciclina en combinación con rifampicina. También se realizaron estudios comparativos con vancomicina y la combinación de vancomicina con rifampicina.

Los datos demuestran mejoramiento de la eficacia antimicrobiana con tigeciclina sobre vancomicina, y con tigeciclina en combinación con rifampicina sobre vancomicina en combinación con rifampicina. Además, tigeciclina en combinación con
5 rifampicina proveyó protección completa contra *S. aureus* meticilinoresistente dentro del grupo de prueba.

Generación de curvas estándar por bioensayos de difusión

Se usaron suero normal de conejo NZW (Fisher Scientific) y
10 hueso de tibia normal no infectado de conejo para generar curvas estándar para tigeciclina (Wyeth-Ayerst Research, Pearl River, Nueva York), vancomicina (Abbott Laboratories, Chicago, Illinois), y rifampicina (Merrell Pharmacologicals, Inc. Kansas, Missouri). Se realizaron bioensayos con cada fármaco
15 para generar las curvas estándar para la concentración de antibiótico en suero y/o hueso de la tibia.

Para el bioensayo se usó el microorganismo *Bacillus cereus* ATCC11778. Se prepararon estándares séricos con dos diluciones seriadas al medio con cada antibiótico, a fin de obtener
20 concentraciones de 25 g/ml a 0,20 g/ml del fármaco en suero de conejo NZW normal. Se prepararon estándares de eluido de hueso para tigeciclina mediante la exhaustiva limpieza de tibias de conejo no infectado con 70% de etanol en una campana estéril. Cada tibia se rompió en trozos pequeños de
25 aproximadamente 0,5 cm² con un mortero. Los trozos se colocaron

en un tubo de centrifuga cónico estéril de 50 ml y se pesaron. Se agregó un mililitro de solución fisiológica estéril 0,9% normal por cada gramo de hueso. Se agitó bien la solución durante dos minutos. El eluido de hueso obtenido se dejó bajo 5 agitación a 160 rpm en una habitación fría a 4°C, durante 12 horas. Las muestras se centrifugaron a 4.000 rpm durante 3 minutos antes del ensayo para sedimentar los trozos.

Se midió el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento alrededor de cada cavidad, en milímetros. Se generó 10 una curva estándar para la concentración de tigeciclina en los eluidos de suero y de hueso, y para vancomicina en suero, al graficar la concentración conocida de antibiótico en función de la medición de la zona de inhibición obtenida.

15 Farmacocinética de Tigeciclina

A un grupo base de 6 conejos no infectados se administraron por vía subcutánea 14 mg/kg de tigeciclina, reconstituida en agua estéril, cada 12 horas, por un periodo de 8 día. Se obtuvieron muestras de sangre a los siguientes 20 intervalos aproximados, tras el tratamiento inicial con antibiótico: 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 171 horas y 180 horas (momento del sacrificio). Se obtuvo medio mililitro de sangre por técnicas estándar. Las muestras se colocaron de inmediato en tubos de centrifuga estériles de 1,5 ml. Tras la 25 eutanasia se limpiaron exhaustivamente ambas tibias con etanol

al 70% y se usaron después de retirar todos los tejidos blandos. Las tibias se colocaron en distintos tubos de centrifuga estériles de 50 ml y se almacenaron a -70°C.

Las muestras de suero se almacenaron a -70°C hasta
5 realizar los bioensayos. Las muestras de hueso se prepararon como ya se describió. Se prepararon placas sembradas de agar y se cargaron las muestras por triplicado a las placas sembradas y se incubaron a 30°C durante 18 horas. Se midió el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento alrededor de cada cavidad
10 y se extrapolaron las concentraciones de tigeciclina a partir de la curva estándar.

Determinaciones de concentración inhibitoria mínima y de concentración bactericida mínima

15 Se determinaron las concentraciones inhibitoria mínima (CJM) de tigeciclina, vancomicina y rifampicina mediante el método de dilución de antibiótico a la mitad en tubo. También se determinaron las concentraciones bactericidas mínimas. Los límites de sensibilidad de este método fueron de 25 g/ml a
20 0,20 g/ml.

Inducción de osteomielitis tibial

Por vía percutánea se indujo una osteomielitis localizada por *S. aureus* en la metafisis tibial lateral izquierda de todos
25 los conejos de los seis grupos de estudio. La cepa de *S. aureus*

meticilinoresistente se obtuvo de un paciente sometido a con osteomielitis sometido a tratamiento.

Preparación del medio infeccioso: se incubó *S. aureus* durante la noche en medio Mueller Hinton Broth (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) al que se agregó 40 g/ml oxacilina, a 37°C. La concentración bacteriana del cultivo se ajustó a 10^7 CFU's/ml.

Procedimiento de infección del conejo: para el estudio se utilizaron conejos New Zealand blancos (Ray Nicholl's Conejory, Lumberton, Texas), de ocho a 12 semanas de edad y con un peso de 2,0 a 3,5 kg. Después de aplicar la anestesia, se insertó una aguja calibre 18 por vía percutánea a través de la cara lateral de la metáfisis tibial izquierda, hasta la cavidad medular. A continuación se inyectaron en secuencia 0,15 ml de morruato de sodio 5% (American Regent Laboratories, Inc., Shirley, New York), 0,1 ml de *S. aureus* (10^7 CFU/ml), y 0,2 ml de solución fisiológica normal 0,9%. Se dejó progresar la infección durante 2 semanas, y entonces se determinó la severidad de la osteomielitis en forma radiológica (Tabla 1).

Grupos de tratamiento: transcurridas las dos semanas de la infección, se separaron los conejos con osteomielitis tibial proximal localizada (confirmada radiológicamente como de grados 2-4) en seis grupos de estudio. Grupo 1 (grupo control): infectado por sin tratamiento durante todo el estudio. Grupo 2: conejos tratados durante 4 semanas con vancomicina subcutánea

en 30 mg/kg dos veces por día. Grupo 3: conejos tratados durante 4 semanas con vancomicina subcutánea en 30 mg/kg dos veces por día más rifampicina oral a 40 mg/kg dos veces por día en 0,5% de metilcelulosa. Grupo 4: conejos tratados durante 4
5 semanas con tigeciclina subcutánea a 14 mg/kg dos veces por día. Grupo 5: conejos tratados durante 4 semanas con tigeciclina subcutánea en la misma dosis que en los conejos del Grupo 4, más rifampicina oral en 40 mg/kg dos veces por día en 0,5% metilcelulosa. Los conejos que recibieron rifampicina oral
10 (Grupos 3 y 5) recibieron un suplemento nutricional oral (Ensure Plus, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio) y una preparación de *Lactobacillus spp.* (Kvvet Supply, 3190 N Road, David City, Nebraska) por día. Grupo 6: conejos tratados durante 1 semana con tigeciclina subcutánea en la misma dosis
15 que el Grupo 4, pero se sacrificaron 3 horas tras la administración de la última dosis. Al mismo tiempo se obtuvieron muestras de sangre y hueso infectado y se determinó la concentración de tigeciclina. Los Grupos 1 a 5 se dejaron sin tratamiento durante 2 semanas después de la fase de
20 tratamiento del experimento y se sacrificaron 8 semanas tras la infección.

Evaluación radiológica

Se obtuvieron radiografías de las tibias bilaterales al
25 comienzo de la terapéutica (2 semanas después de la infección),

al final de la antibioticoterapia (6 semanas después de la infección), y en el momento de ser sacrificados (8 semanas tras infección). Las radiografías fueron comparadas con escalas visuales (Tabla 1) por tres investigadores, cada uno ciego respecto del grupo de tratamiento grupo, y se promediaron las evaluaciones.

TABLA 1

Criterios para evaluar radiológicamente el grado de severidad de osteomielitis en conejos

Grado	Descripción de cambios
+	
0	Normal, sin cambios comparado con la tibia derecha
1+	Elevación o alteración del periostio, o ambos; tumefacción de tejidos blandos
2+	< 10% alteración de la arquitectura del hueso normal
3+	10 - 40% alteración de la arquitectura del hueso normal
4+	> 40% alteración de la arquitectura del hueso normal

*porcentaje visualmente estimado de hueso alterado.

Determinación de niveles séricos de antibiótico

Se determinaron niveles pico y valle de antibiótico para los Grupos 2 y 4 a 1 hora (pico) y 12 horas (valle) tras la administración inicial del antibiótico. Véanse Figuras 5A y 5B. Se determinaron las concentraciones de antibiótico mediante un bioensayo. El ensayo de difusión del antibiótico se realizó como se describió antes. Se extrapolaron las concentraciones de antibiótico a partir de las respectivas curvas estándar.

10

Determinación de la concentración bacteriana por gramo de hueso y médula ósea

Tras el sacrificio se realizaron cultivos macroscópicos para las tibias derecha e izquierda. Se determinaron recuentos cuantitativos de *S. aureus*, en CFU por gramo, de hueso tibial izquierdo y médula ósea para todos los grupos de estudio.

Preparación de cultivos: Se hicieron hisopados de médula ósea y del canal intramedular de las tibias bilaterales con hisopos de algodón estériles para el análisis macroscópico de cultivos de las tibias izquierdas, y controles de seguridad de calidad con las tibias derechas. El hisopo inoculado se estrió sobre placas de sangre y se colocaron en 5 ml de TSB estéril. Luego se incubaron las placas y los tubos a 37°C durante 24 horas y se registró el desarrollo y/o la turbidez.

20

La médula ósea se colocó en un tubo de centrifuga estéril de 50 ml y se pesó. Los fragmentos de hueso se rompieron en trozos de 0,5 cm², se colocaron en un tubo de centrifuga estéril de 50 ml y se pesó el producto final. Se agregó 5 solución fisiológica normal 0,9%, en una relación 3 a 1 (3 ml solución fisiológica / gramo de hueso o médula ósea) y se agitaron con fuerza las suspensiones durante 2 minutos. Se prepararon seis diluciones al décimo de cada suspensión con solución fisiológica normal 0,9%. Se sembraron en placas 10 muestras de 20 microlitros de cada dilución, incluso la suspensión inicial, por triplicado en placas de agar sangre, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se contaron las CFU a la mayor dilución para cada muestra de tibia. Se calculó la concentración de *S. aureus* en CFUs por gramo de hueso o médula 15 ósea. La resultante calculada se multiplicó por 3 para las muestras de hueso y por 4 para la médula ósea, a fin de compensar las diluciones iniciales en solución fisiológica y la adsorción de la médula ósea en solución fisiológica. Se calculó el log medio de la concentración de *S. aureus* para cada uno.

20

Análisis estadístico de datos experimentales

Se calcularon la desviación estándar y el error estándar de la media para todos los datos en crudo, incluso las medidas de difusión de disco, variaciones de peso, grados radiológicos, 25 y los recuentos bacterianos. Se realizaron análisis de

regresión lineal, por método de cuadrados mínimos para las curvas estándar de difusión de antibiótico mediante el log de base diez de las concentraciones de antibiótico para graficar la concentración (en g/ml) versus la zona de inhibición medida (en milímetros). Se extrapolaron todas las mediciones de difusión posteriores a microgramos / mililitro de concentración de antibiótico a partir de curvas estándar que utilizan la pendiente y los valores de intersección de y derivados de los cálculos de cuadrados mínimos.

10

Concentraciones inhibitorias mínimas y concentraciones bactericidas mínimas

Para la cepa de *S. aureus* meticilinoresistentes (inóculo de 10^6 CFU/ml) utilizada en el estudio, las concentraciones inhibitorias mínimas y las concentraciones bactericidas mínimas fueron inferiores a 0,2 g/ml y 0,2 g/ml, respectivamente. Los niveles de concentración inhibitoria mínima y de concentración bactericida mínima para vancomicina fueron 0,39 g/ml y 0,78 g/ml, respectivamente, para una relación CIM/CBM de 0,5. Los niveles de concentración inhibitoria mínima y de concentración bactericida mínima para rifampicina fueron de 0,78 g/ml y 1,56 g/ml, respectivamente, para una relación de 0,5.

20

Niveles de cinética de fármacos en hueso y suero

Todas las concentraciones de antibiótico se derivaron de

25

las respectivas curvas estándar. Las tendencias logarítmicas de las concentraciones de tigeciclina (14 mg/kg dos veces por día) en el suero del grupo de animales no infectados se muestran en la Figura 1. La tigeciclina, como se muestra en la Figura 1, se eliminó lentamente, por lo que mantuvo un nivel estable superior a la CIM (0,2 g/ml) por 12 horas (valle). Los picos y valles de tigeciclina (14 mg/kg dos veces por día) y vancomicina (30 mg/kg dos veces por día) en el suero de conejos infectados tras la administración de los respectivos fármacos se muestran en las Figuras 5a y 5b. Las concentraciones de tigeciclina en hueso (14 mg/kg, Bid) en el grupo de conejos infectados se midió por separado en la tibia infectada al final del tratamiento, donde promediaban 0,78 g/ml +/- 0,01 g/ml, y en la tibia no infectada, donde promediaron 0,49 g/ml +/- 0,01 g/ml. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Hallazgos radiológicos

Se indujo una osteomielitis estadio 2 a 4, de acuerdo con la Tabla 1, en todos los animales infectados. Los grados radiológicos iniciales fueron similares entre los grupos. Los grados promedio para los grupos tigeciclina, tigeciclina + rifampicina y vancomicina + rifampicina a t=14 días fueron significativamente superiores a los grados promedio a t=56 días ($p < 0,05$). El grupo control mostró la menor cantidad de

mejoramiento radiológico (0,2 +/- 0,2 o 9,1%), comparado con los grupos vancomicina (0,5 +/- 0,2 o 25%), tigeciclina (0,9 +/- 0,1 o 40,9%), vancomicina + rifampicina (0,9 +/- 0,1 o 40,9%) o tigeciclina + rifampicina (0,8 +/- 0,1 o 40,0%).

5 La Figura 2 muestra la severidad radiológica promedio para cada grupo a t=14 y t=56 días. Al final del estudio (t=56 días), los grados radiológicos promedio se compararon entre los distintos grupos. Los grados promedio para los grupos tigeciclina, tigeciclina + rifampicina y vancomicina +
10 rifampicina a t=56 días fueron significativamente inferiores a los grados promedio para el grupo control a t=56 días ($p < 0,05$). La clave para la Figura 2 es la siguiente: Control = grupo control, sin tratamiento; Vancomicina = grupo tratado con vancomicina subcutánea; Van + Rifam = grupo tratado con
15 vancomicina subcutánea y rifampicina oral; Gar-936 = grupo tratado con Gar-936 subcutáneo; Gar + Rifam = grupo tratado con Gar-936 subcutáneo y rifampicina oral.

Cultivos de hueso

20 Un elevado porcentaje de tibias de los controles infectado no tratados (n=15) revelaron cultivos positivos (80%) para *Staphylococcus aureus* meticilínorresistentes a una concentración media de $9,21 \times 10^4$ CFU/g hueso. Comparado con los controles no tratados, los grupos vancomicina grupo (n=11),
25 tigeciclina y tigeciclina + rifampicina demostraron todos un

porcentaje significativamente inferior de infección por *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. En el grupo vancomicina grupo, 2 de 11 muestras (18,2%) eran positivos para MRSA, y la concentración bacteriana promedio del grupo fue de 1,4 x 10² CFU/ gramo de hueso (p < 0,05). En el grupo tigeclina, 1 de 10 muestras fue positiva para *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente y la concentración bacteriana promedio fue de 20 CFU/ gramo hueso, que es inferior a los grupos control o vancomicina (p < 0,05). Un conejo del grupo vancomicina + rifampicina mostró concentración bacteriana mayor que el control. Los conejos del grupo que recibió tratamiento con tigeclina + rifampicina demostraron erradicación completa de bacterias de la tibia (0,0 CFU/ gramo de hueso en todas las muestras). La Figura 3 compara el CFU/gramo de médula ósea y hueso entre todos los grupos. La Figura 3 demuestra que tigeclina y tigeclina en combinación con rifampicina representan un efectivo tratamiento para la infección de hueso y la infección de médula ósea respecto de los controles.

La clave de la Figura 3 es la siguiente: Control = grupo control, sin tratamiento; Vancomicina = grupo tratado con vancomicina subcutánea; Van + Rifam = grupo tratado con vancomicina subcutánea y rifampicina oral; Gar-936 = grupo tratado con Gar-936 subcutáneo; Gar + Rifam = grupo tratado con Gar-936 subcutáneo y rifampicina oral.

Procesos adversos

De los 66 conejos infectados un total de 6 murieron antes de completar el tratamiento. De los 5 conejos que murieron en el grupo con tratamiento de tigeciclina, uno fue sacrificado el día 19 debido a severo deterioro del estado nutricional. Otro conejo murió el día 17 de tratamiento con tigeciclina debido a gastroenterocolitis. Tres de los conejos de este grupo murieron el día 28 debido a gastroenterocolitis e intolerancia a la anestesia. Un conejo del grupo tigeciclina + rifampicina murió durante el tratamiento el día 15 debido a gastroenterocolitis. Es muy probable que la gastroenterocolitis se debiera a alteraciones de la flora normal del intestino grueso. Todos los conejos fueron controlados semanalmente para la variación de peso. El grupo control mostró el mayor aumento medio (0,58 kg +/- 0,27), vancomicina el segundo mayor (0,39 kg +/- 0,26), vancomicina + rifampicina el tercero (0,21 kg +/- 0,32). Los grupos tigeciclina (-0,05 kg +/- 0,32) y tigeciclina + rifampicina (-0,39 +/- 0,31) perdieron peso después del tratamiento antibiótico. Casi todos los conejos de los grupos tigeciclina y tigeciclina + rifampicina se presentaron con síntomas leves a severos de disfunción gástrica aproximadamente 1,0-1,5 semanas después de la iniciación del antibiótico, con disminución del apetito, deshidratación, diarrea, y/o pérdida de peso. Las Figuras 4A y B muestran las variaciones de peso entre todos los grupos. La clave de las Figuras 4A y B es la

siguiente: Control = grupo control, sin tratamiento;
Vancomicina = grupo tratado con vancomicina subcutánea; Van +
Rifam = grupo tratado con vancomicina subcutánea y rifampicina
oral; Gar-936 = grupo tratado con Gar-936 subcutáneo; Gar +
5 Rifampicina = grupo tratado con Gar-936 subcutáneo y
rifampicina oral.

Por seguridad se observó mayor número de muertes y efectos
secundarios en los grupos de conejos tratados con tigeciclina.
La enterocolitis debida a tigeciclina puede ser causada por
10 extensa destrucción de la flora microbiana normal del
intestino. Los síntomas se atenuaron con la administración de
probióticos orales. El amplio espectro antimicrobiano de
tigeciclina, en contraste con el espectro más angosto de
vancomicina, puede ayudar a explicar la diferencia observada
15 entre los grupos de tratamiento.

Resultados

Los datos de recuento para cada animal en cada tejido se
enumeran en la Tabla 2. Los recuentos en la tabla son promedios
20 de las mediciones por triplicado en cada tejido. La inspección
de los datos de la Tabla 2 revelan que en los grupos tratados
con artículos de prueba, los recuentos en la mayoría de los
animales o en todos ellos eran 0. En el grupo control, se
midieron recuentos distintos de cero en médula ósea de 5 de 15
25 animales y en hueso de 11 de 15 animales. Hubo considerable

variación en la magnitud de los recuentos distintos de cero en los grupos control, especialmente para hueso.

La cantidad de cultivos positivos y negativos en cada grupo de tratamiento, y los valores p obtenidos por comparación
5 con el control fueron los siguientes:

775
176

TABLA 2

Recuento de unidades formadoras de colonias por gramo de hueso y médula ósea de estudio de osteomielitis en conejos

Grupo de tratamiento	Recuentos (CFU/gm)	Recuentos (CFU/gm)
Control 1	0	238
2	0	0
3	83.000.000	97
4	0	0
5	0	5.000
6	0	2.380
7	610.000	100.000
8	22.000	1.000
9	0	0
10	0	50
11	1.700	1.100.000
12	0	0
13	4.400	10.8000
14	0	72,9
15	0	106,3
Tigeciclina	0	178,6
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

776
177

Grupo de tratamiento	Recuentos (CFU/gm)	Recuentos (CFU/gm)
Tigeciclina	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
Vancomicina	1.250	270,3
2	0	1.315,8
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Grupo de tratamiento	Recuentos (CFU/gm)	Recuentos (CFU/gm)
Vancomicina	0	0
2	530.000.000	1.040.000
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

Datos provenientes de la comparación de osteomielitis en conejo

5 con tigeciclina, vancomicina y rifampicina

En médula ósea, la proporción de cultivos positivos en los grupos tigeciclina y tigeciclina + rifampicina fue 0, que en comparación con la proporción de 0,33 (5/15) del grupo control fue casi estadísticamente significativa ($p=0,06$) a nivel
10 convencional $p=0,05$. Las proporciones de los grupos vancomicina y vancomicina + rifampicina no mostraron diferencias estadísticamente significativas del grupo control. En hueso, la proporción de cultivos positivos en cada grupo tratado con
15 artículos de prueba muestra una disminución estadísticamente significativa de la proporción en el grupo control.

En un modelo animal de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente, con endocarditis, se demostró que 14 mg/kg bid de tigeciclina era más efectivo que 40 mg/kg de vancomicina (Murphy, *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(11): 3022-3027). En un modelo de rata se administraron dosis de hasta 80 mg/kg/día. Sin embargo, en el modelo de conejo utilizado en la presente, la administración de dosis superiores a 14 mg/kg por día causó morbilidad y mortalidad relevante en los animales (datos no mostrados). En consecuencia, las dosis antes citadas se usaron en este estudio. Aun cuando el objetivo no era el estudio de la farmacocinética de tigeciclina en conejos, se realizaron algunas mediciones de niveles de fármacos, a fin de asegurar que se usaba una dosificación adecuada en el modelo animal. Los datos confirmaron que los niveles de fármacos en suero seguían siendo superiores a la CIM de la cepa estafilocócica usada 12 horas tras la última administración. Además, el fármaco mostró una importante penetración en hueso, y se hallaron niveles terapéuticos de tigeciclina en el hueso infectado y no infectado. La mayor concentración de fármaco infectado es otro hallazgo relevante, que requiere mayor estudio.

EJEMPLO 2: Distribución de tigeciclina en tejido humano tras una administración intravenosa de 100 mg.

Este ejemplo muestra la penetración de tejidos

seleccionados en sujetos humanos tras una única aplicación intravenosa de tigeciclina. Los datos demuestran una fase de distribución rápida, con una vida media prolongada y un elevado volumen de distribución en estado estable. Establecen además la
5 penetración de hueso, líquido sinovial, pulmones, vesícula biliar, y colon en sujetos humanos. La penetración mejora el tratamiento de las infecciones de hueso y articulaciones.

Los estudios de farmacocinética de tigeciclina intravenosa en humanos han demostrado que hay una fase de distribución
10 rápida, con una vida media prolongada (40 a 60 horas) y un elevado volumen de distribución en estado estable. Los estudios en animales con tigeciclina con marca radiactiva sugieren que esta fase de distribución rápida y elevado volumen de distribución en estado estable representa penetración de
15 tigeciclina en los tejidos, incluso pulmón y hueso. Se administró a ratas Sprague-Dawley (18 machos) tigeciclina con carbono 14 en una dosis de 3 mg/kg por infusión durante 30 minutos. Se determinaron las concentraciones de radiactividad en tejidos de 3 ratas/por punto temporal al final de la
20 infusión y a las 1, 8, 24, 72, y 168 horas tras el final de la infusión. Para todos los tejidos se observó concentración de radiactividad pico al fin de la infusión. En general, se distribuyó bien la radiactividad a la mayoría de los tejidos, con las mayores concentraciones según sigue: hueso>médula ósea
25 >glándula salival, tiroides, bazo, y riñón. En cada uno de

780
181

estos tejidos la proporción de superficie bajo la curva concentración-tiempo en tejido, respecto de la superficie bajo la curva de concentración-tiempo en plasma fue >10 .

El objetivo de este estudio fue determinar las correspondientes concentraciones en tejido y suero de tigeciclina en puntos temporales seleccionados en tejidos de pulmón, colon, vesícula biliar, hueso, y líquido sinovial. Las muestras se obtuvieron de sujetos programados para cirugía de pulmón, colon, vesícula biliar, o hueso, o una punción lumbar, a los que se les dio una única dosis de tigeciclina administrada por vía intravenosa.

Se realizó un muestreo preespecificado de tejidos/fluidos de pulmón, colon, vesícula biliar, hueso y líquido sinovial en cada sujeto durante la cirugía a 4 horas, 8 horas, 12 horas, o 24 horas después del inicio de una dosis única de 100 mg de tigeciclina administrada durante 30 minutos. Se obtuvo suero de todos los sujetos a la hora 0 (antes de la primera dosis), aproximadamente a los 30 minutos (fin de la infusión), y al momento correspondiente a las extracciones de tejido / líquido. Se determinó la concentración en tejido y en suero de acuerdo con el método especificado más adelante.

Parámetros de investigación para muestras de suero

Las muestras de suero y tejido humano obtenidas de sujetos de estudio que había recibido tigeciclina se analizaron de

787
182

acuerdo con métodos convalidados previamente. Las muestras de suero y el líquido sinovial (0,2 ml) se mezclaron con 0,6 ml de estándar interno en acetonitrilo, se evaporó el sobrenadante hasta sequedad y se reconstituyó el residuo en 200 microlitros de fase móvil. Alícuotas (10 microlitros) de las muestras reconstituidas se inyectaron en un LC/MS/MS.

Los datos se adquirieron y analizaron en software PE SCIEX "Analyst" versión 1.3. Se usó regresión lineal, con calibración $1/x^2$ para obtener el mejor ajuste de los datos a las curvas de calibración. El límite inferior de cuantificación fue de 10 ng/ml para muestras de suero y de líquido sinovial, de 10 ng/g para muestras de colon y de vesícula biliar, y de 30 ng/g para muestras de hueso.

Se analizaron muestras de control de calidad (2 juegos) bajas (25 ng/ml), medias (500 ng/ml) y altas (1500 ng/ml), preparadas en suero humano, con cada conjunto de muestras de suero. Para las muestras de control de calidad de colon, vesícula biliar y pulmón se analizaron dos conjuntos de muestras de control de calidad a 25, 500, y 1500 ng/g con cada conjunto de muestras de tejido. Para hueso se analizaron dos conjuntos de muestras de control de calidad a 100, 500, y 1500 ng/g con cada juego de muestras de tejido.

Las curvas fueron lineales en el rango de 10 a 2000 ng/ml par suero y líquido sinovial, y desde el límite inferior de cuantificación hasta 2000 ng/g para los tejidos. Se consideró

exitosa una corrida si no más de dos muestras de control de calidad estaban fuera del rango del 85-115% del blanco, y no había dos muestras de control de calidad de la misma concentración fuera de ese rango. Si dos muestras de control de
5 calidad de la misma concentración estaban fuera de ese rango sólo se informaban las concentraciones entre las muestras de control de calidad restantes.

Materiales y Métodos para muestras de suero

10 Se midió tigeciclina en suero humano mediante un método LC/MS/MS. Se preparó la solución madre primaria de tigeciclina a 1 mg/ml por disolución en metanol. Se preparó una solución madre secundaria a partir de la solución madre primaria por dilución a una concentración de aproximadamente 40.000 ng/ml
15 con acetonitrilo. Las soluciones madre se guardaron a -20 °C cuando no se usaban. Se preparó una solución madre estándar interno primaria de ter-butil-d9-tigeciclina a una concentración de 1 mg/ml en metanol. Se preparó una solución madre estándar interno secundaria por dilución de la solución
20 madre primaria a una concentración de 100 microgramos/ml en acetonitrilo por agregado de 0,1% de trifluoroacetato. Las soluciones madre primaria y secundaria se almacenaron a -20 °C. Se preparó el estándar interno de trabajo por dilución en volumen con acetonitrilo /0,1% de trifluoroacetato. El estándar
25 interno de trabajo se almacenó a 4°C cuando no se usaba. El día

del análisis se llevó la solución madre secundaria a temperatura ambiente antes de usarla para preparar las soluciones de trabajo para la curva estándar. La curva estándar se preparó a aproximadamente 2.000, 1.600, 1.000, 500, 250, 5 100, 50, 20, y 10 ng/ml por dilución seriada en suero humano control.

El procedimiento de extracción fue el siguiente: a 200 microlitros de calibrador, control de calidad o muestras se agregaron 600 microlitros de solución estándar interno de 10 trabajo y se mezcló por agitación vigorosa. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm para separar las capas, y se transfirió el sobrenadante a un tubo de cultivo. Las muestras se evaporaron hasta sequedad en un Speed Vac. Los residuos se reconstituyeron por sonicación en 200 microlitros 15 de fase móvil y se inyectaron 10 microlitros en el LC/MS/MS.

El LC/MS/MS comprendía HPLC (Agilent 1100), espectrómetro de masa (Applied Biosystems API3000), Columna (Aquasil C18, 50 x 2.1 mm i.s., 5micron (ThermoKeystone) con fase móvil de 16% de acetonitrilo, 6% de metanol, 78% de agua, y 0,1% de 20 tetrefluoroacetato, velocidad de flujo de aproximadamente 0,35 ml/min, volumen de inyección 10 microlitros, Condiciones del detector: 119 búsquedas por periodo, tipo de búsqueda MRM, polaridad positiva, fuente de aerosol de turbo ion, a bajo resolución, con nitrógeno a 6 psi como gas de nebulización, una 25 gas de cortina, y un gas de colisión, con energía iónica a

4.500 mv, y temperatura de aerosol iónico a 450 °C. El detector monitoreó tigeciclina y el estándar interno.

Las muestras se analizaron en tres corridas analíticas. En cada día de análisis de muestras se corrió un estándar completo
5 junto con muestras de control de calidad y muestras de sujeto de estudio. Las muestras con concentración medida superior al mayor calibrador se diluyeron al mezclar muestras de 100 microlitros con 900 microlitros de suero humano y se analizaron 200 microlitros de la mezcla como ya se describió. Se logró la
10 cuantificación de tigeciclina en suero por comparación con una curva estándar preparada en la matriz adecuada y calculada mediante un factor de calibración $(1/\text{concentración})^2$.

El límite de cuantificación para tigeciclina fue de 10 ng/ml. No se detectaron picos que interfirieran con la
15 determinación de cualquiera de los isómeros de tigeciclina en ninguna de las muestras previas a la dosis. Todas las muestras calibradoras y de control de calidad estaban dentro del rango (85-115% del blanco). Los resultados de las muestras se presentan en la Tabla 1. Los resultados de las curvas estándar
20 y los calibradoras se presentan en la Tabla 4.

Parámetros de investigación para muestras de tejidos

Se preparó solución madre y solución estándar interno como para los parámetros de investigación para las muestras de suero
25 anteriores. Se prepararon las soluciones estándar de trabajo a

10.000, 8.000, 5.000, 2.500, 500, 250, 100 y 50 mg/ml. El día del análisis se agregaron 40 microlitros de las soluciones de trabajo a 200 mg de tejido para obtener calibradores a 2.000, 1.600, 1.000, 500, 250, 100, 50, 20 y 10 ng/ml. Se substituyó el
5 tejido humano por tejido canino para preparar los calibradores y las muestras de control de calidad. Debido a la limitada disponibilidad de vesículas biliares caninas se usó colon canino para preparar la curva estándar para el análisis de vesícula biliar humana. Se demostró que el colon era una matriz
10 sustituta adecuada para el análisis de muestras de vesícula biliar.

El procedimiento de extracción fue el siguiente: a 200 mg de calibrados, control de calidad o muestra se agregaron 3 ml de solución estándar interno de trabajo y muestras y se
15 homogenizaron con un homogenizador manual. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 14.000 rpm para separar las capas y se transfirió el sobrenadante a un tubo de centrifuga. Las muestras se evaporaron hasta sequedad en un Speed Vac. Los residuos se reconstituyeron por sonicación en 200 microlitros
20 de fase móvil y se inyectaron 10 microlitros en el LC/MS/MS. Las condiciones de LC/MS/MS eran las mismas que las utilizadas para analizar muestras de suero. Las muestras de líquido sinovial se extrajeron de la misma manera que las muestras de suero.

25 Se analizaron las muestras mediante varias corridas

analíticas. Cada día de análisis de las muestras se corrió una curva estándar completa, junto con muestras de control de calidad y tejido. La curva estándar se preparó en la matriz sustituta adecuada para analizar las muestras de tejido. Las
5 muestras con concentración medida superior al calibrador mayor (200 ng/g) se homogenizaron con estándar interno a 10 o 20 veces la concentración utilizada para la curva estándar. Una alícuota (300 microlitros) (dilución al décimo) se evaporó hasta sequedad y se reconstituyeron las muestras de modo tal
10 que las relaciones de superficie de los picos y las superficies de los picos estaban dentro del rango de la curva estándar.

Se logró la cuantificación de tigeciclina en tejidos por comparación con una curva estándar preparada en la matriz adecuada y calculada mediante un factor de calibración
15 $(1/\text{concentración})^2$. Para líquido sinovial se prepararon los calibradores en solución fisiológica con buffer de fosfato. Un segundo conjunto de calibradores se preparó en un líquido sinovial artificial compuesto por los siguientes componentes: 100 mmol/L de glucosa, 2,03-2,26 g/L de hialuronato y
20 aproximadamente 8 g/L de albúmina ajustada a pH 7,4. Para la curva de calibración preparada en PBS y la recuperación se calculó un factor de corrección mediante la realización de una regresión lineal de determinadas concentraciones de muestras de líquido sinovial artificial a partir de la curva de PBS en
25 función de la concentración teórica de estas muestras con una

ecuación potencial ($y=y_0 +ax^b$). Dado que la concentración determinada de las muestras de los sujetos de estudio estaba en el rango bajo de la curva de calibración, sólo los calibradores entre 20 y 500 ng/ml se usaron para calcular esta regresión.

5 Los resultados de esta regresión demostraron una fuerte correlación ($r^2 = 0,9996$) y las concentraciones calculadas hacia atrás de los calibradores ASF fueron de entre 94 y 122% de sus valores blanco para todo el rango completo de la curva estándar (20-2000ng/ml). Luego se aplicó la ecuación de
10 regresión a las concentraciones de muestras de sujeto de estudio a partir de la curva de estándar de PBS y se determinó la concentración corregida de tigeciclina en muestras de líquido sinovial.

El límite de la cuantificación de tigeciclina fue de 10
15 ng/ml. Se hallaron concentraciones medibles de tigeciclina en todas las matrices analizadas. Todos los calibradores y las muestras de control de calidad con concentraciones similares a las muestras estaban dentro del rango (85-115% del blanco). Los resultados de las muestras se presentan en la Tabla 4 (tejidos)
20 y la Tabla 5 (líquido sinovial).

Resultados

Los datos demuestran una fase de distribución rápida, con una vida media prolongada y un elevado volumen de distribución
25 en estado estable. También establecen la penetración de hueso,

líquido sinovial, pulmón, vesícula biliar y colon en sujetos humanos. Además, las concentraciones en líquido sinovial muestran rápida distribución y prolongada retención de tigeciclina, comparado con los datos provenientes de suero en 5 periodos similares.

184
190

TABLA 3

Resultados del análisis de suero

Calculado Calculado Calculado

Muestra			Concentr. Tiempo			Muestra			Concentr. Tiempo			Muestra			Concentr. Tiempo		
ID.	mg/ml	Hora	ID.	mg/ml	Hora	ID.	mg/ml	Hora	ID.	mg/ml	Hora	ID.	mg/ml	Hora	ID.	mg/ml	Hora
5	1A	BQL	0	22A	BQL	0	40A	BQL	0								
	1B	5450	0,5	22B	1810	0,5	40B	1950	0,5								
	1C	81,6	24	22C	251	4	40C	80,6	24								
10	2A	BQL	0	23A	BQL	0	41A	BQL	0								
	2B	1080	0,5	23B	1530	0,5	41B	2580	0,5								
	2C	151	4	23C	74,4	24	41C	191	12								
15	4A	BQL	0	24A	BQL	0	42A	BQL	0								
	4B	1490	0,5	24B	1650	0,5	42B	789	0,5								
	4C	175	4	24C	85,6	12	42C	198	8								
20	5A	BQL	0	25A	BQL	0	43A	BQL	0								
	5B	1100	0,5	25B	3550	0,5	43B	1150	0,5								
	5C	116	12	25C	136	4	43C	77,4	24								
25	6A	BQL	0	26A	BQL	0	44A	BQL	0								
	6B	1170	0,5	26B	878	0,5	44B	954	0,5								
	6C	113	12	26C	120	12	44C	144	4								
30	7A	BQL	0	27A	BQL	0	45A	BQL	0								
	7B	1640	0,5	27B	847	0,5	45B	894	0,5								
	7C	97,2	12	27C	78,9	12	45C	299	4								
35	8A	BQL	0	28A	BQL	0	46A	BQL	0								
	8B	1710	0,5	28B	922	0,5	46B	1420	0,5								
	8C	186	4	28C	120	12	46C	66,6	24								
40	9A	BQL	0	29A	BQL	0	47A	BQL	0								
	9B	1860	0,5	29B	5190	0,5	47B	447	0,5								
	9C	221	4	29C	147	4	47C	252	4								
45	10A	BQL	0	30A	BQL	0	48A	BQL	0								
	10B	27400	0,5	30B	1190	0,5	48B	976	0,5								
	10C	244	4	30C	50,8	24	48C	86,9	24								
50	11A	BQL	0	31A	BQL	0	49A	BQL	0								
	11B	1320	0,5	31B	2320	0,5	49B	1200	0,5								
	11C	47,2	12	31C	166	4	49C	102	12								
55	12A	BQL	0	32A	BQL	0	50A	BQL	0								
	12B	6950	0,5	32B	3550	0,5	50B	1430	0,5								
	12C	54,4	24	32C	42,1	24	50C	186	8								
60	13A	BQL	0	33A	BQL	0	51A	BQL	0								
	13B	1960	0,5	33B	620	0,5	51B	726	0,5								

5	150'	250	4	330'	43.7	24	510'	44.7	24
	16A	BQI	0	34A	BQI	0	52A	BQI	0
	16B	741	0.5	34B	4080	0.5	52B	821	0.5
	16C'	107	12	34C'	92.7	12	52C'	125	4
	17A	BQI	0	35A	BQI	0	53A	BQI	0
	17B	1110	0.5	35B	2430	0.5	53B	1060	0.5
	17C'	51	24	35C'	53.6	24	53C'	209	4
	18A	BQI	0	36A	BQI	0	54A	BQI	0
10	18B	761	0.5	36B	2300	0.5	54B	1850	0.5
	18C'	133	8	36C'	65.7	24	54C'	206	8
	19A	BQI	0	37A	BQI	0	55A	BQI	0
	19B	1240	0.5	37B	2415	0.5	55B	628	0.5
15	19C'	162	4	37C'	95.7	12	55C'	431	4
	20A	BQI	0	38A	BQI	0			
	20B	903	0.5	38B	4600	0.5			
	20C'	106	12	38C'	106	12			
	21A	BQI	0	39A	BQI	0			
	21B	870	0.5	39B	5130	0.5			
	21C'	778	4	39C'	342	4			

20 ' BQL = por debajo del nivel cuantitativo

TABLA 4

Resultados del análisis de tejido calculado *BQL = por debajo
de los límites cuantitativos del ensayo (<33,2 ng/ml)

	Muestra	Concentración	Tejido
5	LD	102/21	
	001	8210	Vesícula biliar
	002	1560	Vesícula biliar
	004	41,6	Hueso
	005	20 700	Vesícula biliar
10	006	46,5	Hueso
	007	31,3	Hueso
	008	75,3	Hueso
	009	1 890	Pulmon
	010	141	Hueso
15	011	7 640	Vesícula biliar
	012	BQL	Hueso
	015	8 400	Vesícula biliar
	016	824	Vesícula biliar
	017	93,3	Hueso
20	018	3 750	Vesícula biliar
	019	18 900	Vesícula biliar
	020	269	Hueso
	021	66,6	Colon
	022	50,0	Hueso
25	023	1 180	Vesícula biliar
	024	BQL	Hueso
	025	1 50	Vesícula biliar
	026	91,2	Colon
	027	BQL	Hueso
30	028	598	Colon
	029	3.240	Vesícula biliar
	030	BQL	Hueso
	031	5 960	Vesícula biliar
	032	938	Vesícula biliar
35	033	BQL	Hueso
	034	3 480	Vesícula biliar
	035	778	Vesícula biliar
	037	3.830	Vesícula biliar
	038	BQL	Hueso
40	039	108	Colon

242
193

5	040	1 500	Ventricula bilis
	041	106	Colon
	042	238	Vesicula biliar
	043	995	Colon
	044	725	Colon
10	045	814	Colon
	046	1001	Hueso
	047	453	Colon
	048	1001.	Hueso
	050	618	Colon
15	051	653	Pulmon
	052	35,5	Hueso
	053	1001	Hueso
	054	36.1	Hueso
	055	118	Colon

793
194

TABLA 5
Resultados del análisis de líquido sinovial

~~Calculado~~

Muestra Concentración Tiempo I.D.		
	(ng/ml)	(litro)
5	4	39.9
	6	62.8
	8	159
	10	170
10	12	46.4
	20	111
	22	181
	24	65.6
15	30	37.8
	31	25.9
	38	65.7
	46	55.4
20	48	43.0
	52	70.6
	54	70.9
	8	

EJEMPLO 3: Distribución tisular en ratas tratadas con Tigeciclina

Este estudio se llevó adelante para cuantificar la radiactividad derivada de [¹⁴C]-tigeciclina en tejidos mediante autorradiografías de cuerpo entero con imágenes de fósforo, después de una única infusión intravenosa de 3 mg/kg durante 30 minutos de [¹⁴C]-tigeciclina en ratas Sprague-Dawley y Long-Evans machos.

Materiales y Métodos

La tigeciclina fue provista por el Departamento analítico

de Wyeth-Ayerst Research, Montreal, Canadá. La [^{14}C]-tigeciclina fue provista por Amersham (Boston, MA). La pureza radioquímica y la actividad específica de [^{14}C]-tigeciclina en masa fue de 1 98% y 93,6 microCi/mg, respectivamente.

5 Se usó agua estéril para preparar la solución de dosificación intravenosa. El cóctel de centelleo líquido utilizado para contar la radiactividad en plasma y orina fue Ultima Gold (Packard Instruments Co., Meriden, CT).

10 Se usó un Tri-Carb Sample Oxidizer Modelo 3078 equipado con un Oximate-80 Robotic Automatic Sampler (Canberra-Packard Co., Downers Grove, IL) para la combustión de las muestras de sangre. Se usaron cóctel de centelleo líquido Permafluor E (Packard Instruments Co., Meriden, CT), Carbo-Sorb-E (Packard Instruments Co., Meriden CT) para la absorción de dióxido de

15 carbono y agua deionizada para atrapar el dióxido de carbono radiactivo generado por la combustión de la muestra en el oxidador. Las alícuotas de sangre se transfirieron a conos de combustión y parches de cubierta (Canberra-Packard Co., Downers Grove, IL) para la combustión.

20 Todas las determinaciones de radiactividad (dosis, sangre y plasma) se realizaron con un contador de líquido de centelleo Tri-Carb Model 2700 TR (Canberra-Packard Co., Downers Grove, IL) con una curva estándar Ultima Gold o de tolueno. Las

25 cuentas por minuto (CPM) se transformaron en desintegraciones por minuto (DPM) mediante la aplicación de estándares externos

de radiactividad conocida. Se determinó el apagado de cada estándar mediante el índice espectral transformado de un estándar radiactivo externo (TSIE). Los límites inferiores de detección se definieron como fondo doble.

5 Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley y Long-Evans machos de Charles River Breeding Laboratories, Raleigh, NC, y dejaron en cuarentena durante al menos una semana antes del inicio del estudio. La solución dosis intravenosa (1,02 mg/ml) se preparó por disolución de 6,90 mg de tigeciclina sin marca y 5,30 mg de
10 [¹⁴C]-tigeciclina en 12 ml de agua estéril. La solución de dosificación se diluyó y se hizo el radioensayo directo en cóctel de recuento de centelleo Ultima Gold (Packard Inc.). Todas las determinaciones de radiactividad total se realizaron con un espectrómetro de centelleo líquido Packard 2700 TR
15 (Canberra-Packard Co.).

Los pesos de las ratas variaban entre 0,206 y 0,301 kg. Todas las ratas recibieron una única dosis por infusión intravenosa de 30 minutos de [¹⁴C]-tigeciclina a través de una cánula de vena yugular, (3 ml/kg, 3 mg/kg como residuo activo,
20 40 microCi/kg) con una bomba de infusión Harvard 22 (Harvard Apparatus, Southnatick, MA). Todas las bombas se calibraron antes de la administración del compuesto. Las ratas se anestesiaron con isoflurano antes de realizar exsanguinación por punción cardíaca en los momentos prescritos tras la
25 dosificación. Las ratas Sprague-Dawley y Long-Evans se

sacrificaron una a la vez en los momentos 0,5, 8,5, 24, 72, 168 y 336 hr después de la dosis.

Se obtuvieron muestras control de sangre entera de ratas macho Sprague-Dawley en tubos que contenían heparina sódica. Se usó sangre de una muestra común para preparar los estándares de calibración y las muestras de control de calidad. Los estándares se usaron para construir la curva estándar para la cuantificación de la distribución de fármaco con marca radiactiva en tejidos de criosecciones de sangre entera. Se usaron controles de calidad incluidos en el mismo bloque de CMC con cada rata, para evaluar la variación entre e intrasecciones en el espesor de criosecciones de cuerpo entero de rata.

Se diluyó en forma seriada una solución madre de 200 microCi/ml de [^{14}C]-glucosa (New England Nuclear, Boston, MA) con sangre entera de ratas macho Sprague-Dawley para obtener catorce estándares con las siguientes concentraciones: 832, 485, 250, 122, 48,6, 24,3, 12,0, 4,72, 2,36, 0,853, 0,638, 0,405, 0,327 y 0,221 nCi equiv./ml. Las concentraciones de GC bajas, medias y altas fueron de 12,39, 25,9 y 508 nCi equiv./ml.

Inmediatamente después de la eutanasia, se sumergió toda la rata en un baño de hexano y hielo seco ($-75\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su congelación. Cada carcasa se secó y almacenó a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su inclusión. Cada animal se incluyó en un molde (15 cm x 45 cm) por el agregado de 10% descarboximetilcelulosa (CMC) de baja

viscosidad y su congelamiento al colocar la placa en una mezcla de hexano-hielo seco.

Los bloques congelados se transfirieron al Jung Cryomacrocut 3000 (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) y se dejaron equilibrar durante la noche hasta la temperatura interna del criótomo durante al menos 12 horas antes de cortar.

Cada rata congelada se sometió a cortes sagitales a -20°C . Se juntó una cantidad suficiente de cortes para asegurar el muestreo de todos los tejidos de interés. Las secciones se deshidrataron durante la noche en una criocámara y luego se transfirieron rápidamente a un desecador que contenía CaSO_4 para impedir la condensación de la humedad ambiente mientras se equilibraba a temperatura ambiente. Las secciones se montaron en cartón y se marcaron con $[-^{14}\text{C}]$ -tinta negra con un número de identificación exclusivo. La tinta radiactiva se preparó con volúmenes iguales de tinta china y $[-^{14}\text{C}]$ -CL-284846 (100 microCi/ml). Se colocó un pequeño trozo de cinta adhesiva sobre la tinta radiactiva seca para impedir la contaminación de las pantallas de almacenamiento de fósforo.

Las placas de imágenes de fósforo BAS-SR 2025 (Fuji Photo Film Co., Japan) se expusieron a luz visible brillante durante 20 minutos con un borrador IP (Raytest, USA Inc., New Castle, DE) para eliminar la radiación de fondo. Las secciones y los estándares de calibración de sangre se colocaron concurrentemente en contacto directo con Ips y se expusieron

durante 7 días. Todas las secciones se guardaron a temperatura ambiente en una caja protectora de plomo para minimizar los niveles de fondo. Se generaron las imágenes de fósforo con un Fujifilm BAS-5000 Bio-Imaging Analyzer y se cuantificaron
5 mediante MCID M2 Software, versión 3.2 (Imaging Research Inc., St. Catherines, Ontario, Canadá). Los STD y los CC se analizaron mediante la herramienta de muestreo circular del programa de software de MCID. Las zonas de interés en las secciones de cuerpo entero se marcaron manualmente con la
10 herramienta de muestreo regional para generar los datos de recuento.

Se determinaron las concentraciones radiactivas en tejidos seleccionados mediante análisis digital de las autorradiografías obtenidas en base a una curva de calibración.
15 Se generó una curva de calibración de las concentraciones establecidas (nCi/g) versus la respuesta de MCID, con luz fotoestimulada /mm² (PSL/ mm²-menos el fondo convertido a nCi/g) para cada estándar mediante análisis de regresión lineal calibrado ($1/x^2$). Luego se usó la curva de regresión lineal
20 para determinar la concentración de la radiactividad desconocida de las muestras de estudio. Las regiones de interés (ROI) que visualmente exhibieron niveles de radiactividad se marcaron individualmente o se autoescanearon con herramientas de muestreo, a fin de obtener las concentraciones de
25 radiactividad. Para determinar el límite de cuantificación para

QWBAR, se determinaron coeficientes de variación respecto de los estándares de sangre estudiados, y se definió el límite de cuantificación como la menor concentración para la cual los coeficientes de variación no excedían el 15%.

5 Las alícuotas de plasma se combinaron con 10 ml de cóctel de recuento de centelleo Ultima Gold™ (Packard Inc.) y se contaron directamente. Las muestras de sangre se sometieron a combustión con un oxidador de muestras Model 307 (Packard Instrument Company). El [^{14}C]O₂ obtenido se atrapó en Carbo-
10 Sorb®, se agregó cóctel de centelleo (PermaFlour®E+) y se cuantificaron las muestras mediante LSC.

Las muestras se contaron en un espectrofotómetro de centelleo líquido Packard 2700 TR (Canberra-Packard Co.) durante 10 minutos o 0,2 sigma. Las cuentas por minuto se
15 convirtieron en desintegraciones por minuto mediante el uso de una curva de apagado generada a partir de estándares externos de radiactividad conocida. Se determinó el apagado de cada estándar y muestra mediante variación espectral total. El límite de cuantificación (LOQ) para LSC se definió como dos
20 veces el fondo.

Se calcularon los parámetros farmacocinéticos para la radiactividad derivada de [^{14}C]-GAR-936 mediante la infusión intravenosa en el módulo de análisis sin compartimientos (Model 202) WinNonlin, ver. 1.1, (Scientific Consultants, Inc.
25 Research Triangle Park, NC), que aplica un enfoque

independiente del modelo y procedimientos estándar como se describe en Gibaldi y Perrier. Gibaldi, *Farmacocinética*, 1982. Para determinar la concentración media se sustituyó el cero por cualquier valor inferior al límite de cuantificación (5.10 ng equiv./g). Para la dosificación de la infusión IV, C30 min fue la concentración a los 30 minutos, el primer momento de muestreo. La concentración plasmática máxima (C_{max}) y el correspondiente momento de concentración pico tras la administración IV se obtuvieron directamente por inspección numérica a partir de cada dato de concentración-tiempo. La vida media terminal se calculó mediante la relación $\ln 2 / \lambda_z$ donde λ_z se derivó de la pendiente terminal de la curva de concentración/tiempo. La superficie bajo la curva concentración plasmática versus tiempo entre cero e infinito se calculó mediante la regla del trapecoide, donde C_{ultima} es la última concentración plasmática medible. Las proporciones entre concentración tisular y plasmática se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación: C_{tejido} / C_{plasma} , donde C_{tejido} equivale a la concentración de fármaco en tejido (ng equiv./g), y C_{plasma} equivale a concentración de fármaco en plasma (ng equiv./g).

La actividad específica de [^{14}C]-tigeciclina (base) se determinó por ensayo gravimétrico en 43,94 $\mu Ci/mg$ (Tabla 1). La concentración de la solución de dosificación fue de 1,02 mg/ml. Los animales recibieron una dosis promedio de $3,09 \pm 0,11/kg$ comparada con la dosis blanco de 3 mg/kg.

201
202

Resultados

Las concentraciones individuales (ng equiv./g) de radiactividad total en tejidos de ratas Sprague-Dawley tras una infusión IV de 3 mg/kg de [^{14}C]-tigeciclina se representan en la Tabla 6. Los parámetros farmacocinéticos en tejidos se presentan en la Tabla 7. Las relaciones entre tejido y plasma se presentan en la Tabla 8.

Se obtuvieron concentraciones pico individuales (C_{max}) de radiactividad total al final de la infusión para cada todos los tejidos. Los tejidos con las mayores concentraciones de radiactividad fueron riñón (7601 ng equiv./g), hígado (7300 ng equiv./g) y bazo (6627 ng equiv./g) (Tabla 7). Los tejidos con menor concentración pico de radiactividad fueron encéfalo (54 ng equiv./g) y ojo (108 ng equiv./g) (Tabla 7). C_{max} fue superior a 2000 ng equiv./g para la mayoría (70%) de los tejidos. La radiactividad derivada de tigeciclina a C_{max} fue menor en plasma que en todos los tejidos, salvo encéfalo, ojos, grasa y testículos (Tabla 7). A las 24 hs, todos los tejidos tenían concentraciones de radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina (Tabla 6) superiores a las de plasma, salvo en ojo.

Las concentraciones tisulares individuales de radiactividad a las 168 horas para la mayoría de los tejidos declinó hasta el 1% o menos, respecto de su C_{max} , salvo hueso, riñón, hígado, piel, bazo y tiroides (Tabla 6). Hacia las 336

horas, la mayoría de los tejidos tenían concentraciones inferiores al límite de cuantificación (5,10 ng. equiv./g) excepto hueso, riñón, piel y tiroides. Sin embargo, las concentraciones en estos tejidos (hueso, tiroides, riñón y 5 piel) se redujeron mucho respecto de C_{max} . En general, las concentraciones tisulares de radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina en hueso, riñón, piel y tiroides a las 336 horas eran del 19%, 0,18%, 0,43% y 6% de C_{max} , respectivamente.

Con AUC como medida de la carga tisular, hueso y tiroides 10 tenían una carga mucho mayor que cualquier otro tejido. Los mayores valores de AUC se hallaron en hueso (794704 ng eq·hr/g), tiroides (330047 ng eq·hr/g), glándula salival (110979 ng eq·hr/g), riñón (70704 ng eq·hr/g), tiroides (33047 ng eq·hr/g), bazo (70522 ng eq·hr/g) e hígado (53527 ng 15 eq·hr/g). Los tejidos con menor carga eran encéfalo (2865 ng eq·hr/g), grasa (3500 ng eq·hr/g) y testículos (10303 ng eq·hr/g). La exposición AUC en hueso era dos veces superior a la del siguiente tejido (tiroides). Los valores de la relación de AUC en tejido:plasma eran superiores a uno en la mayoría de 20 los tejidos (Tabla 7).

La vida media terminal para la radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina varía desde un mínimo de 5 horas en grasa hasta más de 200 horas en hueso y tiroides, comparado con un $t_{1/2}$ plasmático de 24 horas (Tabla 7). Los tejidos con vida 25 media de eliminación más prolongada fueron tiroides (804

horas), hueso (217 horas), piel (182 horas) y riñón (118 horas) (Tabla 7).

Las relaciones de concentración tejido:plasma (Tabla 8) fueron superiores a uno en la mayoría de los tejidos, con excepción de encéfalo, ojo, testículo y grasa en los puntos temporales 0,5 y 8,5 horas. A las 24 horas, todas las relaciones eran superiores a uno. Las mayores relaciones entre tejido y plasma se observaron para algunos tejidos a 72 horas:hueso (414), tiroides (56), piel (19,3), bazo (16,7) y riñón (11,1). Las relaciones sangre:plasma fueron mayores a uno para todos los puntos temporales, lo cual sugiere que hubo sustancial particionamiento de la radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina hacia los eritrocitos.

También se evaluó la distribución de la radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina hacia los tejidos que contienen melanina (piel y tracto uveal) en ratas Long-Evans hasta 336 horas después de la dosis. Las concentraciones en sangre y plasma de radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina en ratas Long-Evans fueron similares a ratas Sprague-Dawley (Tablas 2 y 5). Las concentraciones de radiactividad pico (C_{max}) se observaron al final de la infusión (0,5 horas) para piel, tracto uveal, plasma y sangre (Tabla 9). La C_{max} de la radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina en piel y tracto uveal fue de 1997 y 2502 ng equiv./g, respectivamente. La AUC para la radiactividad derivada de [^{14}C] [^{14}C]-tigeciclina en

205 209

piel y tracto uveal fue de 109.296 y 233.288 ng equiv·hr/g, respectivamente. Las vidas medias terminales para piel y tracto uveal fueron de 473 y 20 horas, respectivamente (Tabla 10). Los valores de vida media son de incuestionable importancia, dado
5 que no se pudieron identificar con certeza las fases de eliminación en el perfil de concentración-tiempo. Esto también se refleja en la extrapolación de los datos AUC para tracto uveal y piel.

Las relaciones de concentración tejido:plasma fueron
10 superiores a uno para piel y tracto uveal en todos los puntos de tiempo (Tabla 7). Las mayores relaciones globales entre tejido y plasma se observaron a las 72 horas en piel (179) y tracto uveal (393). Las relaciones de AUC tejido:plasma fueron 8,45 y 18,0 para piel y tracto uveal, respectivamente, e
15 indican que estos tejidos retienen selectivamente concentraciones significativas de radiactividad derivada de [¹⁴C]-tigeciclina. Los datos sugieren que la radiactividad es selectivamente particionada en la región del ojo de rata que contiene melanina. Las concentraciones tisulares medias de
20 radiactividad a las 336 horas para piel y tracto uveal declinaron a 8 y 1% de C_{max}, respectivamente.

Tabla 6

Concentraciones medias de radiactividad total en tejidos después de una única infusión durante 30 Minutos de [^{14}C]-tigeciclina en ratas macho Sprague-Dawley

Tipo de tejido	0,5 Hrs	8,5 Hrs.	24 Hrs.	72 Hrs.	168 Hrs.	336 Hrs.
Sangre	1.277	624	44,.5	11,8	1,87	<1,03
Plasma	895	504	14,8	4,31	<1,03	<1,03
Glándula suprarrenal	3.580	941	68,.9	19,3	<5,10	<5,10
Hueso	3.312	3.794	2.711	1.787	1526	720
Médula ósea	4.376	1.562	291	22,5	<5,10	<5,10
Encéfalo	35,8	54,3	35,8	13,3	<5,10	<5,10
Ojo	106	108	36,6	6,76	<5,10	<5,10
Grasa	450	144	<5,1	<5,10	<5,10	<5,10
Corazón	5.657	1.138	69,9	6,98	<5,10	<5,10
Riñón	7.601	1.725	140	47,9	41,3	13,9
Hígado	7.300	1.192	160	22,7	13,3	<5,10
Pulmón	2.981	496	73,1	13,5	<5,10	<5,10
Ganglio linfático	3.473	1.276	180	29,1	<5,10	<5,10

206
207

Músculo	2.260	1.863	85,8	6,24	<5,10	<5,10
Páncreas	4.437	971	70,0	7,41	<5,10	<5,10
Hipófi- sis	3.693	2.014	144	18,8	<5,10	<5,10
Glándula salival	5.771	6.313	300	31,6	<5,10	<5,10
Piel	1.929	577	249	83,1	7,32	8,34
Bazo	6.627	1.691	476	72,0	18,8	<5,10
Testícu- lo	347	361	119	16,4	<5,10	<5,10
Timo	2.528	1.590	158	15,3	<5,10	<5,10
Tiroides	2.992	1.762	354	242	218	187

207
208

Tabla 7

Parámetros farmacocinéticos de radiactividad total en tejidos tras una única infusión de 30 minutos de [^{14}C]-tigeciclina en ratas macho Sprague-Dawley

Tipo de tejido	C _{max} Ng equiv/g	T _{1/2}	AUC Ng hr/g	AUC Ng hr/g	AUC tejido:plasma
Sangre	1.277	105	12.063	1.261	1,15
Plasma	895	24	10.643	10.652	1,00
Glándula suprarrenal	3.580	13	29.153	29.515	2,77
Hueso	3.794	217	569.498	794.704	74,6
Médula ósea	4.376	11	47.116	47.468	4,46
Encéfalo	54	32	2.256	2.865	0,269
Ojo	108	17	3.060	3.221	0,302
Grasa	450	5	2.489	3.500	0,329
Corazón	5.657	9	40.083	40.179	3,77
Riñón	7.601	118	68.333	70.704	6,64
Hígado	7.300	44	52.676	53.527	5,03
Pulmón	2.981	13	21.263	21.523	2,02
Ganglio linfa-	3.473	13	36.478	37.010	3,47

tico					
Músculo	2.260	8	34.833	34.910	3,28
Páncreas	4.437	10	32.908	33.014	3,10
Hipófi- sis	3.693	10	44.882	45.164	4,24
Glándula salival	6.313	9	110.558	110.979	10,4
Piel	1.929	182	31.819	36.471	3,42
Bazo	6.627	33	69.638	70.522	6,62
Testícu- lo	361	15	9.975	10.323	0,97
Timo	2.528	10	35.204	35.430	3,33
Tiroides	2.992	804	113.022	330.047	31,0

Tabla 8

Relación tejido:plasma tras una única infusión de 30 minutos de
[¹⁴C]-tigeciclina en ratas macho Sprague-Dawley

Tipo de tejido	0,5 Hrs	8,5 Hrs.	24 Hrs.	72 Hrs.	168 Hrs.	336 Hrs.
Sangre	1,43	1,24	3,01	2.74	NA	NA
Plasma	1,00	1,00	1,00	1.00	NA	NA
Glándula suprar- renal	4,00	1,87	4,57	4.47	NA	NA

Hueso	3,70	7,53	184	414	NA	NA
Médula ósea	4,89	3,10	19,7	5,21	NA	NA
Encéfalo	0,040	0,108	2,42	3,10	NA	NA
Ojo	0,118	0,215	2,46	1,57	NA	NA
Grasa	0,50	0,287	NA	NA	NA	NA
Corazón	6,32	2,26	4,74	1,62	NA	NA
Riñón	8,49	3,42	9,49	11,1	NA	NA
Hígado	8,16	2,37	10,8	5,26	NA	NA
Pulmón	3,33	0,984	4,96	3,13	NA	NA
Ganglio linfático	3,88	2,53	12,2	6,75	NA	NA
Músculo	2,52	3,70	5,801	1,45	NA	NA
Páncreas	4,96	1,93	4,75	1,72	NA	NA
Hipófisis	4,13	4,00	9,79	4,36	NA	NA
Glándula salival	6,45	12,53	20,3	7,32	NA	NA
Piel	2,15	1,14	16,9	19,3	NA	NA
Bazo	7,40	3,36	32,3	16,7	NA	NA
Testículo	0,388	0,716	8,08	3,80	NA	NA
Tímo	2,82	3,16	10,7	3,55	NA	NA

211
270

Tiroides	3,34	3,50	24,0	56,0	NA	NA
----------	------	------	------	------	----	----

Tabla 9

Concentración media (ng equiv./g) de radiactividad total en tejidos después de una única infusión de 30 minutos de [^{14}C]-tigeciclina en ratas macho Long-Evans

Tipo de tejido	0,5 Hrs	24 Hrs.	72 Hrs.	168 Hrs.	336 Hrs.
Sangre	1.296	340	11,8	2,72	1,24
Plasma	975	70,5	4,31	<1,03	<1,03
Tracto uveal	1.997	124	96,5	74,8	19,3
Piel	2.502	2.363	1.787	351	211

5

Tabla 10

Parámetros farmacocinéticos de radiactividad total en tejidos después de una única infusión de 30 minutos de [^{14}C]-tigeciclina en ratas macho Long-Evans

Tipo de tejido	Cmax Ng equiv/g	T _{1/2}	AUC Ng eq hr/g	AUC Ng eq hr/g	AUC tejido:plasma
Sangre	1.296	62	21.843	21.954	1,70
Plasma	975	19	12.923	12.938	1,00
Piel	1.997	473	58.287	109.296	8,45
Tracto uveal	2.502	201	131.346	233.288	18,0

Tabla 11

Relación tejido:plasma después de una única infusión de 30 minutos de [^{14} C]-tigeciclina en ratas macho Long-Evans

Tipo de tejido	0,5 Hrs	24 Hrs.	72 Hrs.	168 Hrs.	336 Hrs.
Sangre	1,33	4,81	5,05	5,05	NA
Plasma	1,00	1,00	1,00	1,00	NA
Piel	2,05	8,76	179	179	NA
Tracto uveal	2,57	25,7	393	393	NA

Análisis

La distribución de la radiactividad a los tejidos se evaluó después de una única infusión de 30 minutos (3 mg/kg) de [^{14} C]-tigeciclina en ratas macho Long-Evans y Sprague-Dawley.

5 La radiactividad se distribuyó rápidamente a los tejidos, con C_{max} observada al final de la infusión (0,5 hr) para la mayoría de los tejidos. Las concentraciones tisulares fueron similares a un estudio conducido previamente por el método de disección de tejidos. La extensa distribución de tigeciclina en diversos
10 tejidos sugiere un volumen de distribución muy grande. Este hallazgo confirma la observación previa de un elevado volumen de distribución en ratas y perros. En general, la eliminación de la radiactividad de la mayoría de los tejidos fue más lenta que la velocidad en plasma.

15 Las concentraciones de radiactividad derivada de [^{14} C]-tigeciclina en tejidos de ratas Sprague-Dawley fue mayor que en plasma en la mayoría de los puntos de tiempo. Las concentraciones tisulares de radiactividad a las 168 horas para la mayoría de los tejidos declina a 1% o menos, respecto de los
20 valores al final de la infusión. A las 336 horas, las concentraciones en hueso, tiroides, riñón y piel declinaron a 19%, 6,25%, 0,18% y 0,43% de los valores de C_{max}, respectivamente.

Los tejidos con los mayores valores de exposición en ratas
25 Sprague-Dawley, como se incida con los valores medios de AUC,

fueron hueso, tiroides, glándulas salivales, riñón y bazo. Las vidas medias de eliminación fueron bastante largas (5 a 217 horas), donde las vidas medias de eliminación más prolongadas en hueso, piel y tiroides. El valor de la vida media para el
5 tejido tiroide es cuestionable, dado que las fases de eliminación en el perfil concentración-tiempo no se pudieron identificar con certeza. Esto también se refleja en la extrapolación de los datos AUC a AUC.

Las relaciones entre tejido y sangre o plasma fueron
10 mayores de uno para todos los puntos de tiempo, o que sugiere que hubo sustancial particionamiento de la radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina a los tejidos y las células de la sangre. Los resultados de la relación tejido:plasma obtenidos en este estudio son similares a los resultados de la relación
15 tejido:plasma de la rara después de una dosis IV de minociclina.

Si bien no está limitado por la teoría, las elevadas concentraciones de radiactividad en hueso se pueden deber a la quelación de tigeciclina con calcio. La capacidad de las
20 tetraciclinas (minociclina, clortetraciclinas) para formar complejos de quelación con calcio u otros iones metálicos, y así adherirse al hueso ha sido descrita en la bibliografía. En el estudio actual, la radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina era retenida significativamente en hueso, con AUC
25 de 794.704 ng equiv·hr/g. Este valor es aproximadamente 75

veces más elevado que en plasma. En hueso también se observó una vida media de eliminación aparente de 217 horas. La retención de radiactividad en hueso puede ser responsable de la recuperación algo incompleta ($89,4 \pm 2,50\%$) de [^{14}C]-
5 tige ciclina en un estudio de equilibrio de masa en ratas macho Sprague-Dawley observada tras una dosis intravenosa de 5 mg/kg. La exposición (AUC) en hueso fue 2,5 veces superior que en el siguiente tejido, en valor elevado (tiroides). La radiactividad derivada de [^{14}C]-tige ciclina también mostró una fuerte
10 afinidad y vida media prolongada para los tejidos de hueso y tiroides, similar a otras tetraciclinas conocidas.

Las concentraciones de radiactividad derivada de [^{14}C]-tige ciclina se detectaron hasta 336 horas en el riñón y fueron más elevadas que las de otros tejidos, excepto hueso y
15 tiroides. No obstante, en el estudio de equilibrio de masa, además del estudio de excreción biliar y urinaria, la mayor parte de la radiactividad derivada de [^{14}C]-tige ciclina se excretó durante las primeras 48 horas, lo cual sugiere que parte de la radiactividad derivada de [^{14}C]-tige ciclina puede
20 ser fijadora, con gran afinidad por el tejido renal. La fijación al tejido renal también es conocida en las tetraciclinas.

Como se determinó mediante QWBAR, la radiactividad presente en tejidos oculares de rata sólo se particionó
25 selectivamente en los tejidos que contienen melanina del tracto

uveal, además de la piel de ratas Long-Evans. El tracto uveal tenía concentraciones relativamente elevadas de radiactividad en todos los puntos temporales después de 0,5 horas, lo cual sugiere un significativo nivel de exposición y una vida media prolongada. En un estudio realizado con anterioridad mediante el método de disección de tejidos, la evaluación del globo ocular intacto reveló la presencia de radiactividad en este órgano; sin embargo, no fue posible asociar la ubicación de esta radiactividad en ningún tejido ocular específico.

10 Las concentraciones de los 14 estándares y 28 QCS determinados por recuento convencional de centelleo líquido (LSC) fueron similares a las evaluaciones QWBAR para estos mismos estándares. La exposición de estos estándares a 14 pantallas de almacenamiento de fósforo diferentes dio por
15 resultado una respuesta MCID confiable que se correlacionaba con las actividades específicas determinadas por LSC, lo cual sugiere que la variabilidad entre días e intra días era muy baja. La CV y la exactitud del método QWBAR estaban dentro de límites aceptables ($\leq 20\%$). La reproducibilidad de la respuesta
20 MCID y la buena correlación de las actividades específicas entre LSC convencional y QWBAR demostraron que los estándares RBC tenía concentraciones uniformes de radiactividad. Se consideró que la variabilidad observada en este estudio se relacionaba con diversos aspectos de los cortes congelados, la
25 técnica QWBAR y el análisis por imágenes. Se demostró que QWBAR

era reproducible, con una sensibilidad de 0,221 nCi/g (límite inferior de cuantificación). El rango dinámico era lineal a través de cuatro órdenes de magnitud entre 0,221 y 832 nCi/g.

En conclusión, las concentraciones tisulares de radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina eran superiores para la mayoría de los tejidos que para las concentraciones plasmáticas. En general, la eliminación de la radiactividad proveniente de la mayoría de los tejidos era más lenta que la tasa proveniente del plasma. La AUC era más elevada para la mayoría de los tejidos que para el plasma, lo cual sugiere que la mayoría de los tejidos eliminaba lentamente la radiactividad derivada de [^{14}C]-tigeciclina.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el tratamiento de una infección en hueso o médula ósea en un mamífero, que comprende la
5 administración al mamífero de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que, además, comprende la administración de un agente antimicrobiano seleccionado del grupo formado por rifamicina, rifampicina,
10 rifapentina, rifaximina o estreptovaricina.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde el agente antimicrobiano es rifampicina.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, donde la infección comprende un agente patógeno seleccionado
15 del grupo formado por bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, bacterias anaerobias y bacterias aerobias.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde el agente patógeno se selecciona del grupo formado por
20 *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*,
Salmonella, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*,
Escherichia, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Rickettsia*, *Pneumococci*,
Prevotella, *Peptostreptococci*, *Bacteroides* *Legionella*,

estreptococos beta-hemolíticos, estreptococos grupo B y espiroquetas.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la infección comprende *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*
5 y *Haemophilus*.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde la infección comprende *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, o *Haemophilus influenzae*.

10 8. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde le agente patógeno exhibe resistencia a antibióticos.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde la resistencia a antibióticos se selecciona del grupo formado por resistencia a meticilina, resistencia a glucopéptidos,
15 resistencia a tetraciclinas, resistencia a oxitetraciclina, resistencia a doxiciclina; resistencia a clortetraciclina, resistencia a minociclina, resistencia a glicilciclina, resistencia a cefalosporinas, resistencia a ciprofloxacina, resistencia a nitrofurantoína, resistencia a trimetoprima-
20 sulfas, resistencia a piperacilila/tazobactam, resistencia a moxifloxacina, resistencia a vancomicina, resistencia a teicoplanina, resistencia a penicilina y resistencia a macrólidos.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde la resistencia a glucopéptido resistencia a vancomicina.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde el agente patógeno se selecciona del grupo formado por
5 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,
Streptococcus pneumoniae, o *Streptococcus pyogenes*.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, donde la infección comprende *Staphylococcus aureus*.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde
10 el *Staphylococcus aureus* exhibe resistencia a antibióticos
seleccionada del grupo formado por resistencia a glucopéptido,
resistencia a tetraciclina, resistencia a minociclina,
resistencia a meticilina, resistencia a vancomicina y
resistencia a un antibiótico de glicilciclina distinto de
15 tigeciclina.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la infección comprende *Acinetobacter baumannii*.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde *Acinetobacter baumannii* exhibe resistencia a antibiótico
20 seleccionada del grupo formado por resistencia a cefalosporina,
resistencia a ciprofloxacina, resistencia a nitrofurantoína,

resistencia a trimetoprima-sulfas, y resistencia a piperacilina/tazobactam.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la infección comprende *Mycobacterium abscessus*.

5 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, donde el *Mycobacterium abscessus* exhibe resistencia a moxifloxacin.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la infección comprende *Haemophilus influenzae*.

10 19. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la infección comprende *Enterococcus faecium*.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la infección comprende *Escherichia coli*.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la infección comprende *Neisseria gonorrhoeae*.

15 22. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la infección comprende *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi* o *Rickettsia rickettsii*.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde la infección causa osteomielitis.

20 24. Un método para el tratamiento de una infección articular o una infección de los tejidos circundantes de la

articulación en un mamífero, que comprende la administración al mamífero de una cantidad farmacológicamente efectiva de tige ciclina.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que, además, comprende la administración de un agente antimicrobiano seleccionado del grupo formado por rifamicina, rifampicina, rifapentina, rifaximina o estreptovaricina.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, donde al agente antimicrobiano es rifampicina.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 24, 25 o 26, donde la infección comprende un agente patógeno se selecciona del grupo formado por bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, bacterias anaerobias y bacterias aerobios.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, donde el agente patógeno se selecciona del grupo formado por *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Rickettsia*, *Pneumococci*, *Prevotella*, *Peptostreptococci*, *Bacteroides*, *Legionella*, estreptococo beta-hemolítico, estreptococos grupo B y espiroquetas.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, donde la infección comprende *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, y *Haemophilus*.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 29, donde la infección comprende *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* o *Haemophilus influenzae*.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 27, donde el agente patógeno exhibe resistencia a antibióticos.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, donde la resistencia a antibióticos se selecciona del grupo formado por resistencia a meticilina, resistencia a glucopéptido, resistencia a tetraciclina, resistencia a oxitetraciclina, resistencia a doxiciclina; resistencia a clortetraciclina, resistencia a minociclina, resistencia a glicilciclina, resistencia a cefalosporina, resistencia a ciprofloxacina, resistencia a nitrofurantoina, resistencia a trimetoprima-sulfas, resistencia a piperacilina/tazobactam, resistencia a moxifloxacina, resistencia a vancomicina, resistencia a teicoplanina, resistencia a penicilina y resistencia a macrólidos.

33. El método de acuerdo con la reivindicación 32, donde la resistencia a glucopéptido es resistencia a vancomicina.

34. El método de acuerdo con la reivindicación 28, donde el agente patógeno se selecciona del grupo formado por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, o *Streptococcus pyogenes*.

5 35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, donde la infección comprende *Staphylococcus aureus*.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 35, donde el *Staphylococcus aureus* exhibe resistencia a antibiótico seleccionada del grupo formado por resistencia a glucopéptido,
10 resistencia a tetraciclina, resistencia a minociclina, resistencia a metícilina, resistencia a vancomicina y resistencia a un antibiótico glicilciclina distinto de tigeciclina.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 28, donde
15 la infección comprende *Acinetobacter baumannii*.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 37, donde *Acinetobacter baumannii* exhibe resistencia a un antibiótico seleccionado del grupo formado por resistencia a cefalosporina, resistencia a ciprofloxacina, resistencia a nitrofurantoína,
20 resistencia a trimetoprima-sulfas, y resistencia a piperacilina/tazobactam.

39. El método de acuerdo con la reivindicación 28, donde la infección comprende *Mycobacterium abscessus*.

40. El método de acuerdo con la reivindicación 39, donde *Mycobacterium abscessus* exhibe resistencia a moxifloxacina.

5 41. El método de acuerdo con la reivindicación 28, donde la infección comprende un agente patógeno seleccionado del grupo formado por *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi* o *Rickettsia rickettsii*.

10 42. El método de acuerdo con la reivindicación 27, donde la infección articular o la infección de los tejidos circundantes a la articulación causan artritis séptica.

43. El uso de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina para el tratamiento de infecciones en hueso, médula
15 ósea o articulaciones en un mamífero.

44. El uso de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina y un agente antimicrobiano seleccionado del grupo formado por rifamicina, rifampicina, rifapentina, rifaximina, o estreptovaricina para el tratamiento de infecciones de hueso,
20 médula ósea o articulares en un mamífero.

45. El uso de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina para la fabricación de un medicamento para el

tratamiento de infecciones de hueso, médula ósea o articulares en un mamífero.

46. El uso de una cantidad farmacológicamente efectiva de tigeciclina y un agente antimicrobiano seleccionado del grupo
5 formado por rifamicina, rifampicina, rifapentina, rifaximina, o estreptovaricina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones de hueso, médula ósea o articulaciones en un mamífero.

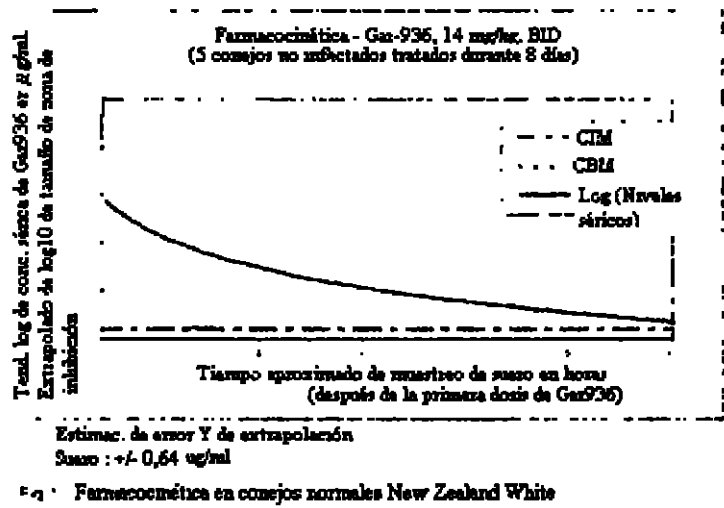
47. El uso de las reivindicaciones 43 - 45, donde la
10 infección de hueso o médula ósea causa osteomielitis.

48. El uso de las reivindicaciones 43 - 45, donde la infección articular o la infección de los tejidos circundantes de la articulación causa artritis séptica.

RESUMEN

La presente invención está dirigida a un método para el tratamiento de infecciones de hueso o médula ósea, infección de la articulación o infección de los tejidos circundantes a la articulación por la administración del antibiótico tigeciclina sola o en combinación con un antibiótico de rifamicina. En una realización de preferencia, la infección de hueso o de médula ósea causa osteomielitis. En otra realización, la infección articular o infección de los tejidos circundantes causa artritis séptica. La invención también está dirigida a la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones de hueso y/o médula ósea, o infecciones articulares y/o infecciones en los tejidos circundantes a la articulación con tigeciclina sola o en combinación con rifampicina.

227
229



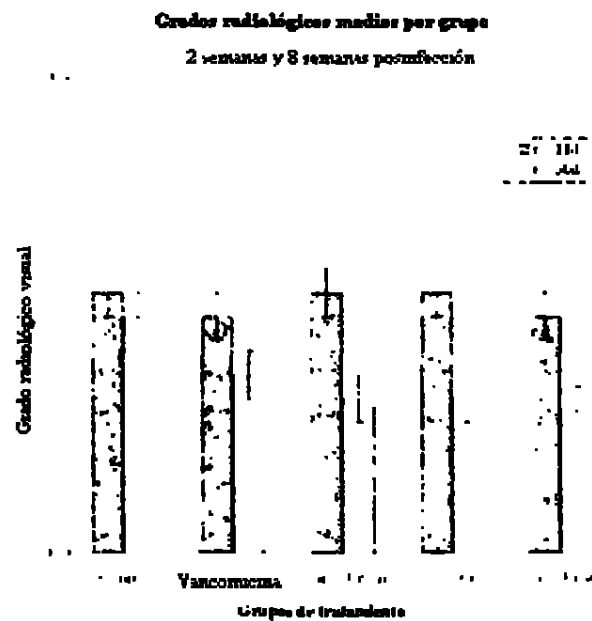
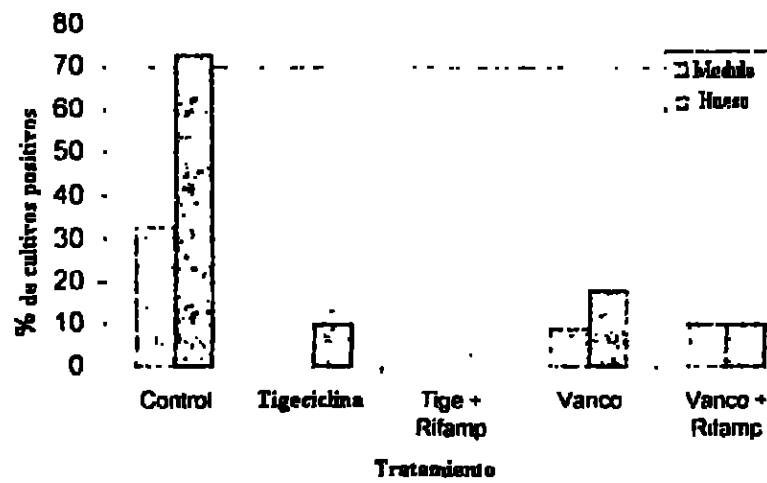


Fig. 2 Se muestran los grados radiológicos medios los días 14 y 56 en cada grupo. Control: grupo control, sin tratamiento; Vancomicina: grupo tratado con vancomicina subcutánea; Van + Rifam: grupo tratado con vancomicina subcutánea y rifampicina oral; Gar-936: grupo tratado con Gar-936 subcutáneo; Gar + Rifam: grupo tratado con Gar-936 subcutáneo y rifampicina oral.

Figura 3

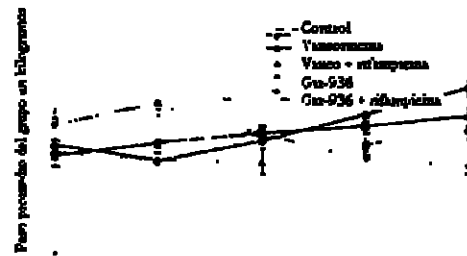
Recuperación de MRSA de estudio de osteomielitis en conejo



Indica diferencia significativa con el control

 $p \leq 0.004$

Variaciones de peso por grupo de tratamiento



Línea de tiempo experimental

Fig. 4a. Se muestra el peso promedio del grupo durante el experimento

Control grupo control, sin tratamiento.

Vancomicina grupo tratado con vancomicina subcutánea

Vanco + rifampicina grupo tratado con vancomicina subcutánea y rifampicina oral

Gm-936 grupo tratado con Gm-936 subcutáneo

Gm-936 + rifampicina grupo tratado con Gm-936 subcutáneo y rifampicina oral

231
233

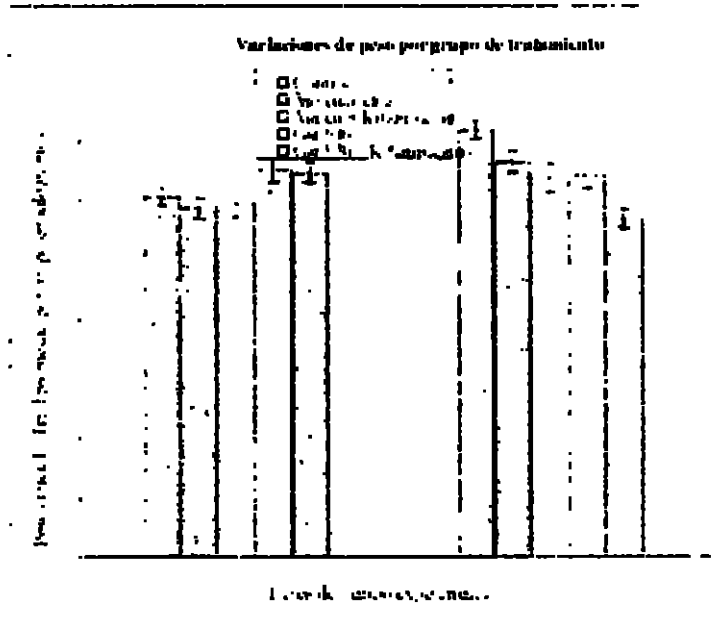


Fig. 20. Variaciones de peso por grupo de tratamiento.

Control, grupo control; Sin antibiótico, grupo sin antibiótico; Sin antibiótico + vitamina K, grupo sin antibiótico + vitamina K; Sin antibiótico + vitamina K + vitamina B12, grupo sin antibiótico + vitamina K + vitamina B12; Sin antibiótico + vitamina K + vitamina B12 + vitamina C, grupo sin antibiótico + vitamina K + vitamina B12 + vitamina C.

232
234

Figura 5: Concentración pico y valle de Gar-936 en suero de conejo

Los sustratos se obtuvieron 1 y 12 horas después de la primera dosis

		Peso (1 hora)					
conejo	grupo	Diámetro 1 (mm)	Diámetro 2 (mm)	Diámetro 3 (mm)	Medida de diámetro	Conversión artificial	Error estándar de media
		11	1	1	16.10	11	0.00
		11	11	1	16.00	11	0.00
		11	1	1	16.50	11	0.00
		11	11	1	17.25	11	0.00
		11	1	1	16.50	11	0.00
		11	11	11	16.50	11	0.00
Inhibición promedio: mm					16.87	0.0	0.02
Log 10					0.21	-2.60195	-2.60438
concentrac. Gar-936 mg/ml					1.02	6.00	0.00

[illegible]

Figura 3b

Pico y valle para vancomicina en suero de conejo

Vancomicina 1000 mg/24 h. Se obtuvieron muestras de suero a 1 y 12 horas después de la primer dosis

conejo	grupo	Pico (hora 1)				
		Diámetro 1 (mm)	diámetro 2 (mm)	diámetro 3 (mm)	media de diámetro	desviación estándar de media
1		12.1	12.1	12.1	12.76	0.12
2		12.1	12.1	12.1	12.80	0.12
3		12.1	12.1	12.1	12.76	0.12
4		12.1	12.1	12.1	12.80	0.12
5		12.1	12.1	12.1	12.80	0.12
Inhibición promedio: mm					12.80	0.08
Log 10					0.87	-1.57
concent. vancomicina / mg/L					3.28	0.03

conejo	grupo	Trough (12 hour)				
		diámetro 1 (mm)	diámetro 2 (mm)	diámetro 3 (mm)	media de diámetro	desviación estándar de media
1		11.1	11.1	11.1	11.00	0.12
2		11.1	11.1	11.1	11.00	0.12
3		11.1	11.1	11.1	11.00	0.12
4		11.1	11.1	11.1	11.00	0.12
5		11.1	11.1	11.1	11.00	0.12
Inhibición promedio: mm					11.00	0.08
Log 10					-0.35	-1.50
concent. vancomicina / mg/L					0.44	0.03



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION (☒)	MODELO DE UTILIDAD ()	USUARIO ()	RADICADOR ()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()	(☒)
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()	(☒)
-Descripción de la invención.	()	()	(☒)
-Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()	(☒)
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()	(☒)
COMPLETA (☒)	INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Fecha: