



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

of

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-106466

54. TÍTULO COMPOSICIONES DE DALBANCINA PARA
EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE NIHON PHARMACEUTICALS, INC

DOMICILIO 455 South Road, King of Prussia,
Pennsylvania 19106.

74. APODERADO Carlos R. OLARTE

22. BOGOTÁ, D. C., 20 de octubre de 2006



OLARTE RAISE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-106486-00000-0000
Fec: 2006-10-20 17:00:55 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE I+D
Enc. 379 FABRICACIONAL II
Act 411 PRESENTACION Folio 466

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

27-Nov-06

1 SOLICITUD DE:		
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.		
☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: <u>VICURON PHARMACEUTICALS, INC</u> Dirección: <u>455 South Gulph Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406, E.U.A.</u> Nacionalidad o Domicilio: <u>ESTADOUNIDENSE</u> Lugar de Constitución: <u>ESTADOS UNIDOS DE AMERICA</u> Teléfono: _____ Fax: _____ E-mail: _____	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE APODERADO	Nombre: <u>CARLOS R. OLARTE</u> Dirección: <u>World Trade Center Torre A, Calle 100 N°. 8A-37 Piso 10</u> Teléfono: <u>601-7700</u> Fax: <u>601-7799</u> E-mail: <u>office@olarteraisbeck.com</u>	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>79.782.747 Bta TP 74.295</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u> Dirección: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u> Nacionalidad o Domicilio: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u>	
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2005/014355</u> Fecha <u>Abril 26, 2005</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2006/078277</u> Fecha <u>Julio 27, 2006</u>		
6 Título (54) <u>COMPOSICIONES DE DALBAVANCINA PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS.</u>		
7 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 31/704</u>		
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>Abril 27, 2004</u>
		(31) Número de Solicitud <u>10/834.395</u>
9 Comprobante de pago No. <u>06-78.143</u> Fecha <u>Octubre 10, 2006</u>		

10

ANEXOS☒

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.

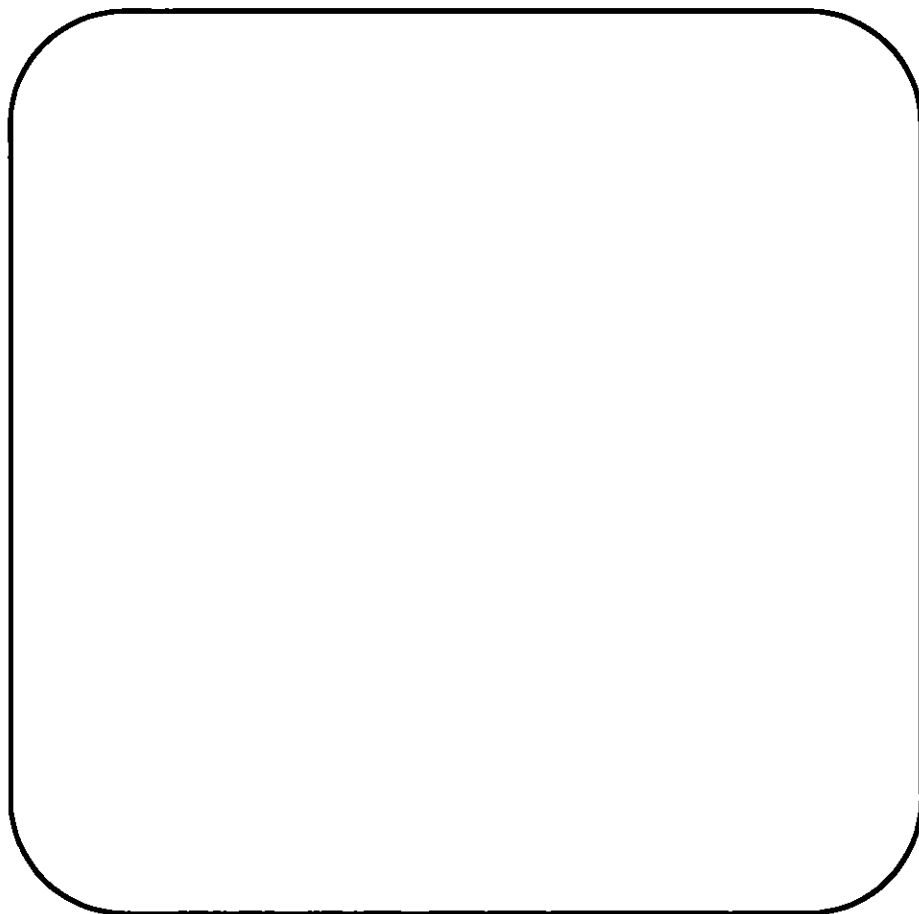
☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENT RES PCT/US2005/014355**MARTIN STOGNIEW**

1870 Ferguson Lane, Blue Bell,
Pennsylvania 19422,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

LUIGI COLOMBO

Via Redipuglia 15,
21046 Malnate (VA)
Italia
Nacionalidad: Italiana

ROMEO CIABATTI

Via Brodolini 15,
20026 Novate Milanese (MI)
Italia
Nacionalidad: Italiana

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 78,143
FECHA : OCTUBRE 10 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-106468-00000-0000
Fec: 2006-10-20 17:00:56 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/II
Eje: 379 FABRICACIONALH
Act: 411 PRESENTACION Folio: 455

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISDEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	52198835	10/10/2006	5,644,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. REMIESTICO	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. _____

18 de agosto de 2006. Traducción oficial hecha por Michael Anderson-Gomez (traductor e intérprete oficial debidamente licenciado bajo Resolución 395 del 22 de abril de 2002 del Ministerio de Justicia de Colombia), de unos documentos expedidos en inglés.

Los documentos traducidos son una Apostille, un certificado suscrito por un oficial de registro del condado de New York y una constancia notarial; acompaña a los mismos un poder y una certificación notarial relativa al mismo que no se traducen pues están hechos en inglés y en español (salvo unos cuantos datos). Estos documentos se refieren a VICURON PHARMACEUTICALS INC.

Apostille

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Norman Goodman
3. obrando en su condición de Oficial de Registro del Condado
4. lleva el sello/estampilla del condado de New York

Certificado

- | | |
|--|--|
| 5. En New York, New York | 6. el 14 de agosto de 2006 |
| 7. por el Vice-Secretario Especial de Estado, Estado de New York | |
| 8. No. NYC-10460556A | |
| 9. Sello/estampilla
[Sellado] | 10. Firma
[Firmado]
James Bizzari
Vice-Secretario Especial
de Estado |


MICHAEL ANDERSON-GOMEZ
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 ESPAÑOL-INGLES-ESPAÑOL
 RES. 395 22-04-02 MINJUSTICIA

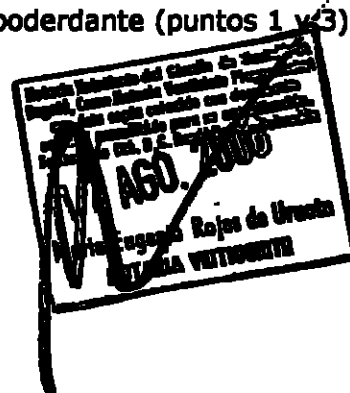
[Del poder, la fecha, al final:]

11 de agosto de 2006

[Del certificado notarial, la fecha (al comienzo), los datos del poderdante (puntos 1 y 3) y la mención de un documento en el punto 5:]

11 de agosto de 2006

Grover F. Fuller Jr.
 150 East 42nd Street, New York, NY 10017, USA (EE.UU.)



VICURON PHARMACEUTICALS INC.

Poder fechado el 10 de octubre de 2005

Estado de New York
Condado de New York

a saber:

El día 11 de agosto de 2006 se presentó personalmente el señor Grover F. Fuller Jr. ante mí, Susan Killian (notario público del Estado de New York, condado de New York), a quien conozco como la persona que firma el poder anexo a la presente.

[Firmado y sellado]
Susan Killian
Notario Público

[El sello del notario indica que su comisión expira el 4 de octubre de 2008].

Estado de New York
Condado de New York

a saber:

514099

Yo, Norman Goodman, Oficial de Registro del Condado y Oficial de Registro de la Corte Suprema del Estado de New York, establecida en el Condado y para el Condado de New York, una corte de poderes regulares que cuenta con el sello de ley, certifico por el presente bajo la Ley Ejecutiva del Estado de New York, que Susan Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración, testimonio, constancia de presentación personal, reconocimiento, o prueba anexos, era, al tiempo de recibir los mismos, un Notario Público en el Estado y para el Estado de New York, debidamente comisionado, juramentado y calificado para actuar como tal; que, bajo la ley, se ha archivado en esta oficina la comisión o certificado de su carácter oficial al igual que su propia firma autógrafa; que al tiempo de recibir dicha prueba, presentación personal, reconocimiento o juramento estaba debidamente autorizado para recibirlos; que conozco bien la letra de dicho Notario Público o he comparado la firma del instrumento anexo con su firma registrada en mi oficina, y creo que dicha firma es genuina.

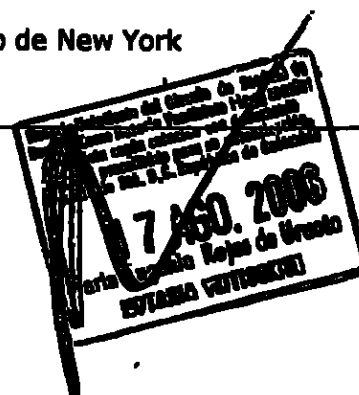
En fe de lo cual, he estampado mi firma y sello oficial hoy 14 de agosto de 2006.

[Firmado y sellado]

Oficial de Registro del Condado y de la Corte Suprema, Condado de New York

Michael Anderson-Gomez
Michael Anderson-Gomez

MICHAEL ANDERSON-GOMEZ
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL-INGLES-ESPAÑOL
RES. 395 22-04-02 MINJUSTICIA



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

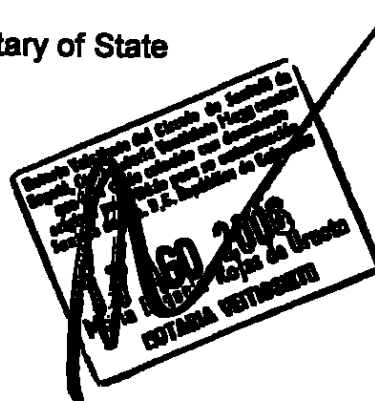
1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 14th day of August 2006
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10460556A
9. Seal/Stamp
10. Signature

James Bizzarri

James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State



Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

VICURON PHARMACEUTICALS

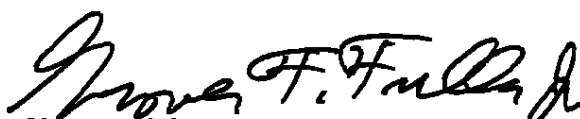
domiciled in

domiciliado en

455 South Gulph Road. King of Prussia, Pennsylvania 19406 USA

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

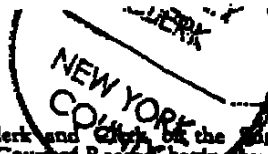

Signature/Firma:

Date/Fecha: 11 August 2006

City/Country/Ciudad,País: New York, New York, USA



State of New York }
County of New York, } ss.:



514099

Form 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal, DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

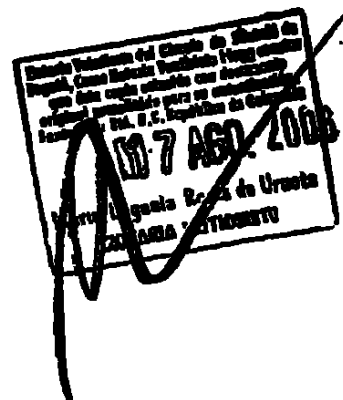
Season 2 - Kiliam
whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

AUG 14 2006

FEE PAID \$3.00

Norman Goodman
County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County



Notarial Certificate

On this date, 11 August 2006

The undersigned Notary Public certifies:

1. That Grover F. Fuller, Jr. of legal age and domiciled in 150 East 42nd Street New York, NY 10017 USA signed the foregoing document.
2. That the grantor has executed the foregoing document as Attorney-in-Fact
3. That VICURON PHARMACEUTICALS having its principal place of business located in King of Prussia, Pennsylvania is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.
5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Power of Attorney dated the 10th day of October, 2005

NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan Z. Killian



SUSAN Z. KILLIAN
Notary Public, State of New York
No. 01K1614521
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

STATE of New York)

ss.:

County of New York)

ON 11 AUGUST 2006 Grover F. Fuller, Jr. appeared before me, Susan Z. Killian, a Notary Public of the State of New York, New York, to me known to be the individual sign Attached Power of Attorney

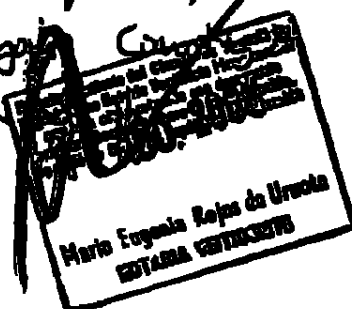
Certificación Notarial

En esta fecha,

El Notario Público suscrito certifica:

1. Que Mayor de edad y domiciliado Suscribió el documento que antecede.
2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de
3. Que con sede principal ubicada en está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.
4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.
5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3, y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente (s) documento(s) auténtico(s):

COUNTY



11

El suscrito STEPHEN FINN, de 31 Amersham Hill Drive, High Wycombe, Buckinghamshire, debidamente autorizado bajo ejercicio de dicha ciudad, ...

Por el presente certifico que el documento adjunto presentado ante mi es auténtico.

CESION firmada por MARTIN STOGNIEW, LUIGI COLOMBO, ROMEO CIABATTI.

EN FE DE LO CUAL firmo de mi puño y letra y estampo mi Sello oficial de funcionario en la ciudad de High Wycombe antedicha, el 1 de septiembre de 2006.

(Fdo) STEPHEN FINN

Notario Público

(Sello Oficial)

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este es documento público
2. Ha sido firmado por **Stephen David Finn**
3. Actuando en calidad de **Notario Público**
4. Lleva el sello/estampilla de **El antedicho Notario Público**

Certificado

5. En Londres
6. El **04 de septiembre de 2006**
7. Por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y de la Mancomunidad.
8. Número **H129017**
9. Sello/Estampilla
10. Firma

(Sello de la Oficina de
Asuntos Exteriores y de la
Mancomunidad).

(Fdo) **Z. Ahmed**
Por el secretario de Estado.

CESION

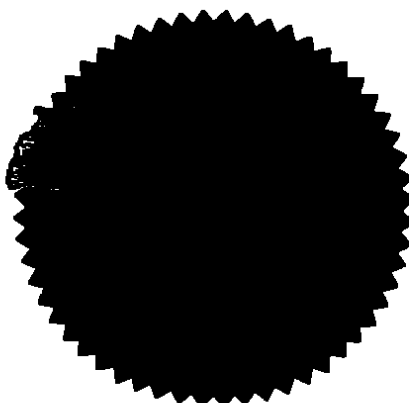
Por contraprestación valiosa pagada a nosotros por **VICURON PHARMACEUTICALS INC.**, una sociedad constituida en virtud de las leyes del **Estado de Pennsylvania, Estados Unidos de América**. cuya dirección postal completa es **455 South Gulph Road, Suite 305, Reino de Prussia, Pennsylvania 19406, Estados Unidos de América**, por el presente vendemos y traspasamos a la citada **VICURON PHARMACEUTICALS INC.**, todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en **COMPOSICIONES DE DALBAVANCIN PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIALES** en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada **VICURON PHARMACEUTICALS INC.**, de conformidad con esta cesión.

En fe de lo cual, firmamos de nuestro puño y letra,

West Conshohocken PA, USA – 05 de julio 2006 (Fdo) Martín STOGNIEW.
Lugar, fecha y firma – Martín STOGNIEW.

IVREA (TO) Italia. – 31 de julio 2006 (Fdo) Luigi COLOMBO.
Lugar, fecha y firma – Luigi COLOMBO

Gerentown – 12 de julio 2006 (Fdo) Romeo CIABATTI.
Lugar, fecha y firma – CIABATTI



**I, STEPHEN FINN, 31 Amersham Hill Drive, High Wycombe, Buckinghamshire,
duly admitted and sworn, practising in the said Town,**

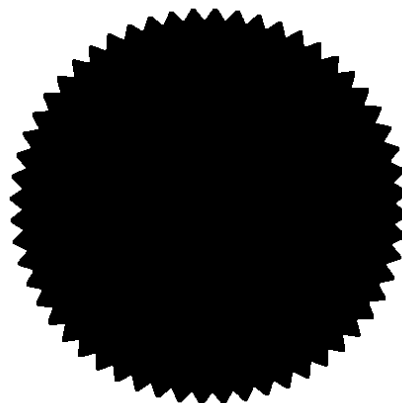
DO HEREBY CERTIFY AND ATTEST:

**THAT the documents presented before me as attached are believed to be genuine
namely:**

**ASSIGNMENT signed by, MARTIN STOGNIEW, LUIGI COLOMBO,
ROMEO CIABATTI**

**IN TESTIMONY WHEREOF I have hereunto set my hand and affixed my Seal of
Office in the Town of High Wycombe aforesaid, this 1st day of September Two
Thousand and Six**

**STEPHEN FINN
NOTARY PUBLIC**



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Stephen David Finn**
a été signé par

3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. at London/à Londres

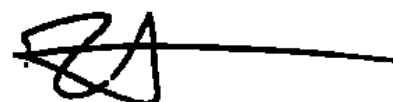
6. the/le **04 September 2006**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H129017**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **Z. Ahmed**





For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by VICURON PHARMACEUTICALS INC. a corporation organized under the laws of the State of Pennsylvania, United States of America whose full post office address is 455 South Gulph Road, Suite 305, King of Prussia, Pennsylvania 19406, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said VICURON PHARMACEUTICALS INC., all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in DALBAVANCIN COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said VICURON PHARMACEUTICALS INC. in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

West Conshohocken PA USA 5 July 2006 *Martin Stogniew*
Place, date and signature - Martin STOGNIEW

IVERSA (TO) ITALY, 31 July 2006 *Luigi Colombo*
Place, date and signature - Luigi COLOMBO

Genetana, July 12, 06. *Romeo Ciabatti*
Place, date and signature - Romeo CIABATTI

16
17

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 July 2006 (27.07.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/078277 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 31/704 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/014355

(22) International Filing Date: 26 April 2005 (26.04.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10/834,395 27 April 2004 (27.04.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): VI-
CURON PHARMACEUTICALS INC. [US/US]; 455
South Gulph Road, Suite 305, King Of Prussia, Pennsyl-
vania 19406 (US).

(72) Inventors; and

(73) Inventors/Applicants (for US only): STOGNIEW, Mar-
tin [US/US]; 1870 Ferguson Lane, Blue Bell, Pennsylvania
19422 (US). COLOMBO, Luigi [IT/IT]; Via Redipuglia
15, I-21046 Malrate (IT). CIABATTI, Romeo [IT/IT]; Via
Brodolini 15, I-20026 Novate Milanese (mi) (IT).

(74) Agents: FULLER, Groves, F., Jr. et al.; c/o Jackie
Lawrence, Pfizer Inc., Eastern Point Road, Groton, CT
06340 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, 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, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, 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, SM,
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, IS, IT, LT, 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:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

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

(54) Title: DALBAVANCIN COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS

(57) Abstract: The invention provides methods and compositions for treatment of bacterial infections. The composition may be a combination of factors, which include A₀, A₁, B₁, B₂, C₀, C₁, isoB₀, and MAG, in the presence of low level solvent. Methods of the invention include administration of dalbavancin formulations for treatment of a bacterial infection, in particular a Gram-positive bacterial infection of skin and soft tissue. Dosing regimens include multiple dose administration of dalbavancin, which often remains at therapeutic levels in the bloodstream for at least one week, providing prolonged therapeutic action against a bacterial infection. Dosing regimens for renal patients are also included.

WO 2006/078277 A2

DALBAVANCIN COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS**FIELD OF THE INVENTION**

[0001] This application relates to dalbavancin compositions and methods of use of such compositions in methods of treatment of bacterial infections.

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0002] This application is an international filing based on U.S. Application Serial No. [Attorney Docket No. 892,280-225], filed on April 26, 2005, which is a continuation-in-part of U.S. Application Serial No. 10/834,395, filed April 27, 2004, which is a continuation-in-part of U.S. Application Serial No. 10/714,261, filed November 14, 2003, which claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application Serial Nos. 60/427,654, filed November 18, 2002, 60/485,694, filed July 8, 2003, 60/495,048, filed August 13, 2003, and 60/496,483, filed August 19, 2003, the disclosures of all of which are incorporated herein by reference in their entireties.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] According to the U.S. Center for Disease Control and Prevention, nosocomial bloodstream infections are a leading cause of death in the United States. Approximately five percent of the seven million central venous catheters (CVCs) inserted annually in the United States are associated with at least one episode of bloodstream infection (approximately 350,000 a year). Catheter-related bloodstream infections occur when bacteria enter the bloodstream through an intravenous catheter and can be life threatening.

[0004] Skin and soft tissue infections (SSTIs) (also known as complicated and/or uncomplicated skin and skin structure infections (SSSIs)) are a common medical condition and often the consequence of trauma or surgical procedures. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* are the pathogens most frequently isolated from patients with deep tissue infections, although any pathogenic organism, including those found on healthy skin, may cause infection. Many SSTIs are mild to moderate in severity, permitting successful treatment with oral antimicrobial agents and local cleansing. In contrast, more severe or complicated infections, which frequently occur in patients with underlying risk factors (e.g., vascular compromise, diabetes) and/or infections caused

A
B

by difficult-to-treat or multiply-resistant bacteria, may require potent intravenous antimicrobial therapy and aggressive surgical debridement.

[0005] Staphylococci are a clinical and therapeutic problem and have been increasingly associated with nosocomial infections since the early 1960s. The coagulase-positive species methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has long been problematic in both community-acquired and nosocomial infections, and several coagulase-negative staphylococci have been recognized as opportunistic human pathogens, especially in the treatment of critically ill patients in intensive care units. Another major cause for clinical concern is the increasing isolation of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains in many parts of the world.

[0006] The glycopeptide antibiotics vancomycin and teicoplanin have been used against serious nosocomial infections caused by multi-drug-resistant Gram-positive pathogens, particularly MRSA, coagulase-negative staphylococci (CoNS), and enterococci. Vancomycin and teicoplanin are used for infections caused by MRSA, and until recently, all isolates were uniformly susceptible. However, the isolation of *Staphylococcus aureus* strains with intermediate susceptibility or resistance to teicoplanin as well as vancomycin has now been reported with increasing frequency. A number of vancomycin-resistant strains, classified "VanA," "VanB," or "VanC," based on the mechanism of resistance, have been reported. Thus, alternative treatment options are needed.

[0007] Teicoplanin is at least as active as vancomycin against most Gram-positive bacteria and appears to cause fewer adverse events. Both forms of treatment require at least once daily dosing to effect complete recovery. Currently, the therapeutic options for severe infections caused by some of these pathogens are quite limited. The emerging resistance of Gram-positive pathogens to vancomycin makes the availability of new antibiotics with potential for increased effectiveness highly desirable.

[0008] In addition, less frequent dosing regimens than currently-available therapies would be desirable to enhance patient comfort, especially for parenteral, e.g., intravenous or intramuscular, antibiotic administration. Hospital stays are sometimes necessitated by the need for multi-daily antibiotic administration by parenteral means, and less frequent dosing would be advantageous to permit such treatment to be done on an outpatient basis.

[0009] Although less frequent dosing is a desirable feature of an antibiotic administration regimen, the "pharmaceutical window," i.e., the toxicity profile, of the administered antibiotic must be sufficiently acceptable to permit a large single dose to be administered without jeopardizing treatment by causing severe adverse reactions in the treated patient. Further, even when an antibiotic exhibits a suitable pharmaceutical window, less frequent dosing is possible only if the

antibiotic exhibits a suitable serum half-life to maintain therapeutic effectiveness over the dosing interval desired. The serum half-life of an antibiotic dictates both the longevity of a drug *in vivo* and the length of time after administration when the serum level will reach a minimum trough level which is still bactericidally effective. The serum trough level over time after administration of a first dose of antibiotic dictates when a further dose must be administered to retain a minimum bactericidal level of the antibiotic *in vivo*.

[0010] Recently, successful glycopeptide antibiotics have been rationally synthesized from natural glycopeptides. For example, the semisynthetic glycopeptide dalbavancin was synthesized from the natural antibiotic A 40926, originally isolated from an *Actinomadura* culture (Malabarba *et al.*, 1998, U.S. Patent No. 5,750,509). Dalbavancin has shown greater efficacy against various bacterial strains than vancomycin or the antibiotic linezolid and represents a promising new treatment for skin and soft tissue infections (see, e.g., Jabés *et al.*, 2004, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1118-1123). According to U.S. Patent No. 5,750,509, dalbavancin is a glycopeptide antibiotic with a monomethyl moiety at its N^{15} amino (see FIG. 1 for numbering), and this N^{15} -monomethyl amino could be free (*i.e.* $-NHCH_3$) or protected with an amino protecting group such as *t*-butoxycarbonyl, carbobenzyloxy, arylalkyl or benzyl. The method for making certain of the dalbavancin components reported in the '509 patent also produced N^{15},N^{15} -dialkyl analogs of dalbavancin in minor quantities, but these molecules were not characterized.

[0011] In view of the above pathogens, further antibiotics possessing activity against one or more microbes, including antibiotic resistant bacteria, would be of commercial value and would satisfy a long-felt need in the art.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] The invention provides compositions, methods and kits for treatment or prevention of a bacterial infection with dalbavancin. Surprisingly, stabilized formulations of dalbavancin have been found to exhibit both a pharmaceutical window as well as a prolonged serum half-life to permit treatment regimens of about once every 5-7 days or longer, while retaining antibacterial properties *in vivo*.

[0013] Accordingly, in one aspect, a pharmaceutical composition is provided that includes a unit dose of dalbavancin in an amount sufficient to provide a therapeutically or prophylactically effective plasma level of dalbavancin in an individual for at least five days, a stabilizer, and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0014] Pharmaceutical compositions of the invention are generally formulated in a pharmaceutically acceptable form for administration to an individual, such as a pharmaceutically acceptable aqueous formulation. Such pharmaceutical compositions are preferably administered by parenteral, *e.g.*, intravenous or intramuscular, routes. Accordingly, in this preferred embodiment, these pharmaceutical compositions are typically sterile.

[0015] In some embodiments, a unit dose of dalbavancin is provided in dry powder (*e.g.*, lyophilized) form and reconstituted in a pharmaceutically acceptable carrier, such as a sterile aqueous formulation, prior to administration to an individual. In one embodiment, the pharmaceutically acceptable carrier includes 5% dextrose in water. A pharmaceutical composition of the invention may be administered to a mammal in need of treatment or prevention of a bacterial infection, such as a human. In some embodiments, a pharmaceutical composition may include at least one antibiotic that is not dalbavancin, such as an antibiotic that is effective (*e.g.*, bactericidal) against a Gram-negative bacterium and/or an antibiotic that is effective against Gram-positive species against which dalbavancin is not effective, such as VanA vancomycin-resistant bacterial strains.

[0016] The invention provides compositions, methods of making, and methods for treatment or prevention of a bacterial infection with a room-temperature stable dalbavancin pharmaceutical composition.

[0017] In some embodiments, one or more stabilizing substances are employed to inhibit degradation of one or more dalbavancin components during storage as a dry powder (*e.g.*, lyophilized) formulation and/or as an aqueous formulation prior to administration to an individual. Over time, degradation can result in the undesirable formation of less active and/or inactive components which could potentially cause adverse effects *in vivo*. Preferred stabilizers include nonionic components such as sugars or sugar alcohols, *e.g.*, a mono-, di-, or polysaccharide, or derivative thereof, such as, for example, mannitol, lactose, sucrose, sorbitol, glycerol, cellulose, trehalose, maltose, or dextrose, or mixtures thereof.

[0018] In one embodiment, the invention encompasses a pharmaceutical composition comprising stable dalbavancin.

[0019] In another embodiment, the invention encompasses a pharmaceutical composition comprising dalbavancin and a stabilizer.

[0020] In yet another embodiment, the invention encompasses a pharmaceutical composition comprising dalbavancin and a stabilizer at a pH of about 1-7, more preferably 2-6. In another embodiment, the composition is at a pH of about 3-5. The stabilizer may comprise a carbohydrate

or an amino acid. The carbohydrate may be mannitol, lactose, or a combination of mannitol and lactose. The mannitol and lactose may be added in equal or unequal amounts. In one embodiment, equal amounts of mannitol and lactose are added and the pH is adjusted to about pH 4.5.

[0021] In another embodiment, the invention also encompasses a pharmaceutical composition comprising dalbavancin and mannitol at a pH of about 3. In one embodiment, the pH of the composition is about 3.3. In another embodiment, this composition may further comprise lactose. The lactose and mannitol may be added in equal or unequal amounts.

[0022] In another embodiment, the invention also encompasses a pharmaceutical composition comprising dalbavancin and a stabilizer, wherein the stabilizer comprises mannitol and lactose. The mannitol and lactose may be added in equal amounts. The pH of this composition may optionally range from 1-7, more preferably 2-6, more preferably 3-5, more preferably 4-5, more preferably approximately 4.5.

[0023] Glycopeptides, and dalbavancin in particular, are very unstable due to the glycosidic linkage. There may be some degradation at room temperature and more degradation at 40 °C. Some of the formulations described above may need special storage conditions. In particular, refrigeration may be desirable (e.g., -40 to 10 °C, alternatively -20 to 9 °C, more preferably 2 to 8 °C). The formulations may additionally be sterilized. They will form a stable, clear, particle free solution when administered. The solution should be stable and not contain a precipitate.

[0024] The pharmaceutical compositions described above preferably degrade by no more than about 4% at about 25 °C after about 2 years, more preferably by no more than about 3%, more preferably by no more than about 2%, more preferably by no more than about 1%, more preferably by no more than about 0.5%. Alternatively, the pharmaceutical compositions described above have no more than about 4% MAG at about 25 °C after about 2 years, more preferably have no more than about 3% MAG, more preferably have no more than about 2% MAG, more preferably have no more than about 1% MAG, more preferably have no more than about 0.5% MAG.

[0025] In another embodiment, the pharmaceutical compositions described above preferably degrade by no more than about 6% at about 40 °C after about 3-6 months, more preferably by no more than about 5%, preferably by no more than about 4%, preferably by no more than about 3%, preferably by no more than about 2%, preferably by no more than about 1%. Alternatively, the pharmaceutical compositions described above preferably have no more than about 6% MAG at about 40 °C after about 3-6 months, more preferably have no more than about 5% MAG, preferably have no more than about 4% MAG, preferably have no more than about 3% MAG, preferably have no more than about 2% MAG, and even more preferably have no more than about 1% MAG. A

19
20

stable compound at 40 °C would be desirable, especially in places that are not able to store the compounds in a refrigerator or at room temperature (e.g., third world countries and Indian reservations).

[0026] In yet another embodiment, the pharmaceutical compositions degrade by no more than 3% at about 2-8 °C after about 2 years, more preferably by no more than about 2%; more preferably by no more than about 1%; more preferably by no more than about 0.5 %. Alternatively, the pharmaceutical compositions have no more than 3% MAG at about 2-8 °C after about 2 years, more preferably have no more than about 2% MAG; more preferably have no more than about 1% MAG; more preferably have no more than about 0.5 % MAG.

[0027] The invention includes dalbavancin compositions that may comprise a combination of any of the dalbavancin factors. These factors include dalbavancin factor A₀, A₁, B₁, B₂, C₀, C₁, isoB₀, and MAG.

[0028] The invention also include a drying process for reducing the level of solvent in the dalbavancin composition. The method includes the steps of providing wet dalbavancin comprising dalbavancin, water, and a solvent, drying the wet dalbavancin at a temperature of about 30 °C or less and at a vacuum pressure of about 50 mbar or less, until the water level of the wet dalbavancin is less than about 20% (w/w). Water is then added to the wet dalbavancin and the drying step is repeated. These steps of adding water and drying the wet dalbavancin are repeated until the solvent level is less than about 3.0% (w/w). These steps can be repeated once, twice, three times, four times, five times, six times, or as many as necessary to reach the desired solvent content. Similarly, the invention also includes a dalbavancin composition that has a low level of solvent. In one embodiment, the level of solvent may be below 3.0 % (w/w), alternatively below 2.5 % (w/w), alternatively below 2.0 % (w/w), alternatively below 1.5 % (w/w), alternatively below 1.0 % (w/w), alternatively below 0.5 % (w/w), alternatively below 0.1 % (w/w). The solvent may be acetone. Alternatively, the solvent may be any of ethanol, methanol, propanol, butanol, ether, methylene chloride, tetrahydrofuran, chloroform, 1,4-dioxane, trichloroethylene, benzene, carbon tetrachloride, 1,2-dichloroethane, 1,1-dichloroethane, 1,1,1-trichloroethane, acetonitrile, chlorobenzene, cyclohexane, dichloromethane, 1,2-dimethoxyethane, N,N-dimethylacetamide, N,N-dimethylformamide, 1,4-dioxane, 2-ethoxyethanol, ethyleneglycol, formamide, hexane, 2-methoxyethanol, methylbutyl ketone, methylcyclohexane, N-methylpyrrolidone, nitromethane, pyridine, sulfolane, tetralin, toluene, 1,1,2-trichloroethane, xylene, acetic acid, anisole, 1-butanol, 2-butanol, butyl acetate, tert-butylmethyl ether, cumene, dimethyl sulfoxide, ethyl acetate, ethyl ether, ethyl formate, formic acid, heptane, isobutyl acetate, isopropyl acetate, 3-methyl-1-butanol,

methylethyl ketone, methylisobutyl ketone, 2-methyl-1-propanol, pentane, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol, propyl acetate, 1,1-diethoxypropane, 1,1-dimethoxymethane, 2,2-dimethoxypropane, isootane, isopropyl ether, methylisopropyl ketone, methyltetrahydrofuran, petroleum ether, trichloroacetic acid, and trifluoroacetic acid. Additionally, the drying process may be conducted at a temperature of about 28°C or less, alternatively at a temperature of about 26°C or less, alternatively at a temperature of about 24°C or less, alternatively at a temperature of about 22°C or less, alternatively at a temperature of about 20°C or less, alternatively at a temperature of about 15°C or less, alternatively at a temperature of about 10°C or less. The vacuum pressure of the drying procedure may be about 50 mbar or less, alternatively about 45 mbar or less, alternatively about 40 mbar or less, alternatively about 35 mbar or less, alternatively about 30 mbar or less, alternatively about 25 mbar or less, alternatively about 20 mbar or less, alternatively about 15 mbar or less, alternatively about 10 mbar or less, alternatively about 5 mbar or less. Additionally, the water level may be less than about 25% (w/w), alternatively less than about 20% (w/w), alternatively less than about 15 % (w/w).

[0029] In addition to the low solvent content, the drying process may also reduce the amount of MAG present in the dalbavancin composition. The amount of MAG present may be below about 5% HPLC distribution, alternatively below about 4.5% HPLC distribution, alternatively below about 4.0% HPLC distribution, alternatively below about 3.5% HPLC distribution, alternatively below about 3.0% HPLC distribution, alternatively below about 2.5% HPLC distribution, alternatively below about 2.0% HPLC distribution, alternatively below about 1.5% HPLC distribution, alternatively below about 1.0% HPLC distribution, alternatively below about 0.8% HPLC distribution, alternatively below about 0.6% HPLC distribution, alternatively below about 0.5% HPLC distribution, alternatively below about 0.4% HPLC distribution, alternatively below about 0.3% HPLC distribution, alternatively below about 0.2% HPLC distribution, alternatively below about 0.1% HPLC distribution.

[0030] The invention also includes a pharmaceutical composition comprising dalbavancin factors B₂ and isoB₆. The content of each of B₂ and isoB₆ can independently not exceed about 3.0 percent HPLC distribution, alternatively can independently not exceed about 2.5 percent HPLC distribution, alternatively can independently not exceed about 2.0 percent HPLC distribution, alternatively can independently not exceed about 1.5 percent HPLC distribution, alternatively can independently not exceed about 1.0 percent HPLC distribution, alternatively can independently not exceed about 0.5 percent HPLC distribution, or alternatively can independently not exceed about 0.1 percent HPLC distribution.

[0031] Additionally, the invention also includes a pharmaceutical composition comprising dalbavancin factors B₂, isoB₀, and MAG. The content of each of B₂, isoB₀, and MAG can independently not exceed about 3.0 percent HPLC distribution, alternatively can independently not exceed about 2.5 percent HPLC distribution, alternatively can independently not exceed about 2.0 percent HPLC distribution, alternatively can independently not exceed about 1.5 percent HPLC distribution, alternatively can independently not exceed about 1.0 percent HPLC distribution, alternatively can independently not exceed about 0.5 percent HPLC distribution, or alternatively can independently not exceed about 0.1 percent HPLC distribution.

[0032] The invention also includes methods for treating a bacterial infection comprising providing at least one of the pharmaceutical compositions described above to patient in need thereof and administering a therapeutically effective dose of sterile, stable, particle-free, clear dalbavancin to the patient. The method may further include administering a single subsequent therapeutically effective dose. The single subsequent therapeutically effective dose may be administered approximately five to ten days, or about a week, after the initial dose. The single subsequent therapeutically effective dose may also be administered approximately five to ten days, or about a week, after the initial dose, without any intervening dose of dalbavancin. In another embodiment, the method may include administering multiple subsequent doses. The multiple subsequent doses may be administered at approximately five to ten day intervals, or one week intervals. The multiple subsequent doses may also be administered at approximately five to ten day intervals, or one week intervals, without any intervening doses of dalbavancin. The method may also include the further step of monitoring the infection after administering the first dose and, optionally, adjusting the subsequent dose(s) accordingly.

[0033] The invention also includes methods for treating a bacterial infection in a patient with renal impairment comprising administering a therapeutically effective dose of sterile, stable, particle-free, clear dalbavancin to the patient. The impairment can range from mild to severe. In one embodiment, the therapeutically effective dose achieves a peak concentration in the patient (C_{max}) of at least 100 mg/L. In another embodiment, the therapeutically effective dose achieves a patient exposure (area under the curve) of at least 13,000 mg·h/L. The method may include administering a single dose of dalbavancin of about 300-1200 mg, alternatively about 400 mg, alternatively about 500 mg, alternatively about 600 mg, alternatively about 700 mg, alternatively about 800 mg, alternatively about 900 mg, alternatively about 1000 mg, alternatively about 1100 mg, alternatively about 1200 mg.

[0034] The method for treating a bacterial infection in a patient with renal impairment may also include administering multiple doses of dalbavancin. In one embodiment, two doses may be administered about five to about ten days apart, such as about one week apart, or alternatively about ten to about eighteen days apart, such as about two weeks (or 14 days apart). Alternatively, dose frequency may be, for example, twice weekly doses, thrice weekly doses, or multiple weekly doses. Alternatively, the dosing interval may be, for example, any of about 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, or more days apart. The number of doses given, can be, for example, one, two, three, four, five, six, or more doses, each dose after the initial dose being given after the selected dosage interval.

[0035] In one embodiment, the first dose may be about 750 mg and the second (or subsequent) dose may be about 250 mg. In another embodiment, the first dose may be about 750 mg and the second (or subsequent) dose may be about 150 mg. In another embodiment, the first dose may be about 750 mg and the second (or subsequent) dose may be about 125 mg. In another embodiment, the first dose may be about 1000 mg and the second (or subsequent) dose may be about 500 mg.

[0036] In another embodiment, the first dose may be about 200 mg to about 1500 mg, alternatively about 200 mg to about 1300 mg, alternatively about 100 mg to about 1500 mg, alternatively about 200 mg to about 1400 mg, alternatively about 300 mg to about 1300 mg, alternatively about 400 mg to about 1200 mg, alternatively about 500 mg to about 1100 mg, alternatively about 600 mg to about 1000 mg, alternatively about 1000 mg, alternatively about 950 mg, alternatively about 900 mg, alternatively about 850 mg, alternatively about 800 mg, alternatively about 750 mg, alternatively about 700 mg, alternatively about 650 mg, alternatively about 600 mg, alternatively about 550 mg, or alternatively about 500 mg. The second or subsequent dose may be about 200 mg to about 1500 mg, alternatively about 200 mg to about 1300 mg, alternatively about 100 mg to about 1500 mg, alternatively about 200 mg to about 1400 mg, alternatively about 300 mg to about 1300 mg, alternatively about 400 mg to about 1200 mg, alternatively about 500 mg to about 1100 mg, or alternatively about 600 mg to about 1000 mg, alternatively about 600 mg, alternatively about 550 mg, alternatively about 500 mg, alternatively about 450 mg, alternatively about 400 mg, alternatively about 350 mg, alternatively about 300 mg, alternatively about 250 mg, alternatively about 200 mg, alternatively about 150 mg, or alternatively about 100 mg. It is to be understood that any of the above first doses may be combined with any of the above second or subsequent doses in a dosing regimen.

[0037] In a multiple dosing regimen for renal or normal patients, the ratio between the first and second (or subsequent) doses may be defined by a factor. The amount of the first dose may be

4
22

greater than about 1 times the amount of the second dose. Alternatively, the first dose may be greater than about 1.5 times, greater than about 2 times, greater than about 2.5 times, greater than about 3 times, greater than about 3.5 times, greater than about 4 times, greater than about 4.5 times, greater than about 5 times, greater than about 5.5 times, or greater than about 6 times the amount of the second (or subsequent) doses.

[0038] Similarly, the amount of the second (or subsequent) dose may be about 6 times less than the amount of the first dose. Alternatively, the amount of the second (or subsequent) dose may be about 5.5 times, alternatively less than about 5.0 times, alternatively less than about 4.5 times, alternatively less than about 4.0 times, alternatively less than about 3.5 times, alternatively less than about 3.0 times, alternatively less than about 2.5 times, alternatively less than about 2.0 times, alternatively less than about 1.5 times, alternatively less than about 1.0 times the amount of the first dose.

[0039] The method for treating a bacterial infection in a patient with renal impairment may include administering a single dose of dalbavancin. The patient may have mild, moderate, severe, or end-stage renal impairment. The amount of this single dose may be about 1200 mg, alternatively about 1150 mg, alternatively about 1100 mg, alternatively about 1050 mg, alternatively about 1000 mg, alternatively about 950 mg, alternatively about 900 mg, alternatively about 850 mg, alternatively about 800 mg, alternatively about 750 mg, alternatively about 700 mg, alternatively about 650 mg, alternatively about 600 mg, alternatively about 550 mg, alternatively about 500 mg. The amount of the single dose may also be between about 250 mg to about 1300 mg, alternatively between about 300 mg to about 1200 mg, alternatively between about 350 mg to about 1100 mg, alternatively between about 400 mg to about 1000 mg, alternatively between about 450 mg to about 1000 mg, alternatively between about 500 mg to about 1000 mg, alternatively between about 550 mg to about 950 mg, alternatively between about 600 mg to about 900 mg, alternatively between about 650 mg to about 850 mg.

[0040] The invention also includes methods of making the pharmaceutical compositions described above comprising providing dalbavancin and adding a stabilizer. In one embodiment, the stabilizer is a carbohydrate or a sugar. In another embodiment, the stabilizer is mannitol, lactose, or a combination thereof.

[0041] In yet another embodiment, the method further includes the step of adjusting the pH of the composition, if necessary. In one embodiment, the pH is adjusted to about 1-7, more preferably about 2-6, more preferably about 3-5. The pH may be adjusted with a pH modifier. pH modifiers include inorganic bases of alkali and alkaline earth metals such as NaOH, Ca(OH)₂, KOH, and

$\text{Mg}(\text{OH})_2$. Inorganic oxides, carbonates, bicarbonates of alkali and alkaline earth metals may also be used as pH modifiers. Alkali and alkaline salts of inorganic weak acids and amphoteric acids such as phosphoric acid, boric acid, sulfuric acid, and all other sulfur-containing acids may also be used as pH modifiers. Amino acids such as lysine, meglumaine, arginine, n-methyl glucosamine, may also be used to modify the pH. Organic bases, including all amines, phenols, weak carboxylic acids, dicarboxylic acids, hydroxy carboxylic acids, and their salts, may also be utilized to modify the pH of the composition.

[0042] In another aspect, methods are provided for treating a bacterial infection in an individual in need thereof, including administering at least one unit dose of dalbavancin in an amount sufficient to provide a therapeutically effective plasma level of dalbavancin in the individual for at least five days, and a pharmaceutically acceptable carrier. A therapeutically effective plasma level of dalbavancin is generally at least about 4 mg of dalbavancin per liter of plasma. In one embodiment, the dosage amount of dalbavancin administered is an amount that is clinically effective and also has reduced adverse side effects in comparison to the standard of care with drugs such as teicoplanin and vancomycin.

[0043] Dalbavancin may be administered as a single dose or as multiple doses. In some embodiments, a single dose of about 100 mg to about 4000 mg, for example 3000 mg, of dalbavancin is administered. In various embodiments, a single dalbavancin dose may include at least about any of 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, or 3 grams.

[0044] In other embodiments, two doses are administered about five to about ten days apart, such as about one week apart. The first dose may be about 500 to about 5000 mg of dalbavancin and the second dose may be about 250 mg to about 2500 mg of dalbavancin. Often, the first dose includes about 1.5 to about 3 times, often at least about twice as much of the amount of dalbavancin contained in the second dose. For example, the first dose may be about 1000 mg and the second dose may be about 500 mg of dalbavancin. In another embodiment, the first dose may be about 1200 mg and the second dose may be about 600 mg. In methods in which two doses are administered, the plasma trough level of dalbavancin in an individual prior to administration of the second dose is generally at least about 4 mg, often at least about 10 mg, often at least about 20 mg, more often at least about 30 mg dalbavancin per liter of plasma, and still more often at least about 40 mg dalbavancin per liter of plasma.

[0045] Often, methods of the invention include parenteral administration, for example intravenous administration. In some embodiments, administration is intravenous with the rate of administration controlled such that administration occurs over at least about 30 minutes or longer.

28
23

[0046] Methods of the invention may be used to treat a Gram-positive bacterial infection, such as, for example, a *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus pyogenes* skin and soft tissue infection. In some embodiments, the infection is penicillin-resistant and/or multi-drug resistant.

[0047] In another aspect, a method for preventing a bacterial infection is provided which includes administering at least one unit dose of dalbavancin in an amount sufficient to provide a prophylactically effective plasma level of dalbavancin in the individual for at least about one day, three days, five days, one week, or ten days or longer, and a pharmaceutically acceptable carrier. The dosage of dalbavancin may be, for example, about 100 mg to about 1000 mg. In some embodiments, dalbavancin is administered prior, during, or subsequent to a medical procedure or a stay in the hospital.

[0048] Therapeutic or prophylactic methods of the invention may include administration of at least one antibiotic that is not dalbavancin, preferably an antibiotic that is effective against a Gram-negative bacterium and/or an antibiotic that is effective against Gram-positive strains that dalbavancin is not effective against, such as VanA strains.

[0049] In another aspect, kits are provided that include at least one unit dose of dalbavancin in an amount sufficient to provide a therapeutically effective plasma level for at least about five days or a prophylactically effective plasma level of dalbavancin for at least about one day in an individual, and instructions for use in a method of treatment or prophylaxis of a bacterial infection. A kit may contain two unit dosages, with a first dosage including 1.5 to 3 times, often at least about twice as much of the amount of dalbavancin included in a second dosage. Kits may also include an antibiotic that is not dalbavancin, preferably effective against a Gram-negative bacterium.

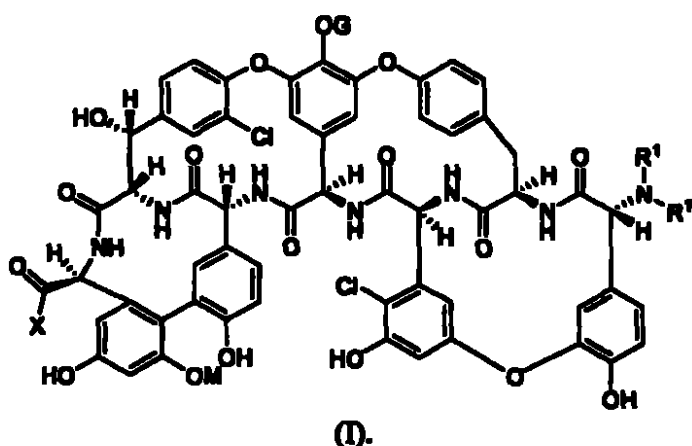
[0050] In one embodiment, kits are provided that include a first container containing a dry powder (e.g., lyophilized) dalbavancin composition and a second container containing a predetermined amount of a physiologically acceptable aqueous solution for admixing with the dalbavancin composition. Such solutions are preferably sterile aqueous solutions. In one embodiment, kits include a delivery means for administering the dalbavancin composition to an individual, for example a syringe or intravenous administration means.

[0051] The present invention also provides N'^{13} , N'^{13} -dialkyl antibiotic compounds with utility against infectious microbes. The compounds of the invention are useful for treating and/or preventing microbial infections, such as SSTIs and other bacterial infections.

[0052] The present invention is based, in part, on the discovery of N'^{13} , N'^{13} -dialkyl antibiotic compounds having antimicrobial activity at least comparable to, or even greater than, previously known N'^{13} -monoalkyl antibiotic compounds such as dalbavancin compounds. In addition, as

described in the examples below, certain N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compounds of the invention show activity against a broader spectrum of microbes when compared to the previously known N'^3 -monoalkyl antibiotic compounds such as N'^3 -monomethyl dalbavancin compounds.

[0053] In one aspect, the present invention provides N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compounds according to formula (I):



The N^{15} , N^{15} -dialkyl antibiotic compounds of the invention (having atoms numbered according to Fig. 26) comprise two alkyl substituents on the amino terminal nitrogen. In other words, in formula (I) R^1 and R^1 are alkyl. In most preferred embodiments of the invention, R^1 and R^1 are methyl. The other substituents of formula (I) are described in detail below. Preferred substituents include those found on antibiotic A 40926 compounds and/or dalbavancin compounds known to those of skill in the art. For instance, in preferred embodiments G and M are glycosyl moieties such as the aminoglucuronyl and mannopyranosyl moieties described in the sections below. In certain embodiments, the aminoglucuronyl moiety is acylated, for example, with a fatty acid, and in certain embodiments, the mannopyranosyl moiety is acetylated.

[0054] In certain embodiments, X is OH while in further embodiments X is aminoalkylamino. The aminoalkylamino group can be any aminoalkylamino group known to those of skill in the art, including those described in U.S. Patent No. 5,750,509. In preferred embodiments, X is *N,N*-dimethylaminopropylamino. As described in detail in the examples below, compounds according to formula (I) wherein X is aminoalkylamino show antibiotic activity comparable to or greater than corresponding dalbavancin compounds, such as those described in U.S. Patent No. 5,750,509. Although compounds wherein X is aminoalkylamino are preferred, compounds wherein X is OH are useful, for example, for the preparation of compounds of the invention wherein X is

aminoalkylamino, and they can also be useful themselves for treating and/or preventing microbial infections.

[0055] In another aspect, the present invention provides compositions comprising an N^{13}, N^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention and a second compound. The second compound can be any compound known to those of skill in the art. In particular embodiments, the second compound is an antibiotic compound, for instance an antibiotic A 40926 compound or a dalbavancin compound. In further embodiments, the second compound is also an N^{13}, N^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention. Exemplary compositions of the invention include mixtures of antibiotic A 40926 compounds and/or dalbavancin compounds that further comprise a compound according to formula (I). In particular embodiments, the compositions are enriched in the N^{13}, N^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention. The enrichment can be relative to antibiotic A 40926 compounds and/or dalbavancin compounds of the composition, or relative to other compounds of the composition, or both. In certain embodiments, the present invention provides compositions comprising a purified N^{13}, N^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention, an isolated N^{13}, N^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention or a purified and isolated N^{13}, N^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention.

[0056] In a further aspect, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising a N^{13}, N^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention. Preferred compositions comprise compounds according to formula (I) wherein X is aminoalkylamino. The compositions can further comprise other active ingredients, including antibiotic A 40926 compounds and/or dalbavancin compounds known to those of skill in the art. In certain embodiments, the pharmaceutical compositions further comprise a pharmaceutically acceptable carrier, excipient or diluent. In particular embodiments, the present invention provides pharmaceutical unit dosages of a compound of the invention for use, for example, in the treatment and/or prevention of microbial infections.

[0057] In a further aspect, the present invention provides a dosage form comprising a sterile, stable, particle-free dalbavancin powder suitable for reconstitution with a pharmaceutically acceptable vehicle comprising dalbavancin factors B_0 and B_2 . The names B_2 , C_2 , and N^{13}, N^{15} -dimethyl dalbavancin B_0 have been used interchangeably. In one embodiment, the content of factor B_0 is not less than about 75 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 80 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 85 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 90 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 95 percent HPLC distribution. The content of B_2 is not less than about 4.0 percent HPLC distribution, alternatively

not less than about 5.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 6.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 7.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 8.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 9.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 10.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 15.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 20.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 25.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 30.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 40.0 percent HPLC distribution. The percent HPLC distribution of particular components can be calculated by comparing the area of each single component to the total chromatography area. The dosage form may further include at least one additional factor, such as dalbavancin factor A₀, A₁, B₁, C₀, or C₁.

[0058] In a further aspect, the present invention provides for a pharmaceutical composition comprising dalbavancin factors B₀ and B₂. In one embodiment, the content of factor B₀ is not less than about 75 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 80 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 85 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 90 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 95 percent HPLC distribution. The content of B₂ is not less than about 3.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 4.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 5.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 6.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 7.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 8.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 9.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 10.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 15.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 20.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 25.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 30.0 percent HPLC distribution, alternatively not less than about 40.0 percent HPLC distribution. As defined above, the percent HPLC distribution of particular components can be calculated by comparing the area of each single component to the total chromatography area. The pharmaceutical composition may further include at least one additional factor, such as dalbavancin factor A₀, A₁, B₁, C₀, or C₁.

[0059] In another aspect, the present invention also provides for the de-enrichment of the B₂ component. In one embodiment, the content of factor B₂ is not more than about 5.0 percent HPLC distribution, alternatively not more than about 4.5 percent HPLC distribution, alternatively not more than about 4.0 percent HPLC distribution, alternatively not more than about 3.5 percent HPLC distribution, alternatively not more than about 3.0 percent HPLC distribution, alternatively not more than about 2.5 percent HPLC distribution, alternatively not more than about 2.0 percent HPLC

distribution, alternatively not more than about 1.5 percent HPLC distribution, alternatively not more than about 1.0 percent HPLC distribution, alternatively not more than about 0.5 percent HPLC distribution, alternatively not more than about 0.1 percent HPLC distribution.

[0060] In another aspect, the present invention provides methods of treating and/or preventing microbial infections in a subject in need thereof. The methods can comprise the administration of an effective amount of a N'^{13} , N'^{15} -dialkyl antibiotic compound or composition of the invention to the subject. The invention encompasses the prevention or treatment of gram-positive or antibiotic-resistant bacterial infections, such as a *Bacillus*, *Corynebacteria*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, or *Clostridium* genus infection, in particular *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, Groups A and C *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, or *Clostridium difficile*. Other infections that can be prevented or treated using the N'^{13} , N'^{15} -dialkyl antibiotic compounds, compositions, and methods of the invention include gram negative bacterial infections, such as a *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* (as well as other *Proteobacteria*), *Francisella*, *Helicobacter*, *Hemophilus*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Morganella*, *Moraxella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, and *Yersinia* genus infection, in particular *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, and yeast, such as *Candida albicans*, infections.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0061] Figure 1A depicts the amount of dalbavancin component B_0 versus time in various pharmaceutical compositions, with and without mannitol, at 25 °C.

[0062] Figure 1B depicts the amount of MAG versus time in various pharmaceutical compositions, with and without mannitol, at 25 °C.

[0063] Figure 2A depicts the amount of dalbavancin component B_0 versus time in various pharmaceutical compositions, with and without mannitol, at 40 °C.

[0064] Figure 2B depicts the amount of MAG versus time in various pharmaceutical compositions, with and without mannitol, at 40 °C.

[0065] Figure 3A depicts the amount of dalbavancin component B_0 versus time in various pharmaceutical compositions containing mannitol and/or lactose at 25 °C.

[0066] Figure 3B depicts the amount of MAG versus time in various pharmaceutical compositions containing mannitol and/or lactose at 25 °C.

[0067] Figure 4A depicts the amount of dalbavancin component B₀ versus time in various pharmaceutical compositions containing mannitol and/or lactose at 40 °C.

[0068] Figure 4B depicts the amount of MAG versus time in various pharmaceutical compositions containing mannitol and/or lactose at 40 °C.

[0069] Figure 5 depicts dalbavancin plasma concentration versus time following a single 1000 mg intravenous infusion of dalbavancin.

[0070] Figure 6 depicts isothermal titration calorimetry data for dalbavancin binding to human serum albumin (top) and a graphical representation of the data fitted to a curve determined from a 2:1 binding model of dalbavancin:protein (bottom).

[0071] Figure 7 depicts an electrospray ionization mass spectrum of dalbavancin.

[0072] Figure 8 is a graph of dalbavancin concentration vs. population ratio of dalbavancin multimer to monomer and depicts an increase in population ratio of dalbavancin multimer to monomer with increasing dalbavancin concentration.

[0073] Figure 9 is a graph of pH vs. population ratio of dalbavancin multimer to monomer and depicts an increase in population ratio of dalbavancin multimer to monomer with increasing pH.

[0074] Figure 10 depicts an electrospray ionization mass spectrum of dalbavancin in an ammonium formate 5mM pH 5 solution.

[0075] Figure 11 depicts an electrospray ionization mass spectrum of dalbavancin in an ammonium formate 50 mM pH 5 solution.

[0076] Figure 12 depicts an electrospray ionization mass spectrum of dalbavancin in an ammonium formate 100 mM pH 5 solution.

[0077] Figure 13 depicts an electrospray ionization mass spectrum of teicoplanin (50 µg/mL) in water.

[0078] Figure 14 depicts an electrospray ionization mass spectrum of teicoplanin (100 µg/mL) in water.

[0079] Figure 15 depicts the effect of HSA on the apparent dissociation constant for dalbavancin/tri-peptide binding at 26°C (pH 7.4).

[0080] Figure 16 depicts a comparison of isothermal calorimetry (ITC) data for binding of tri-peptide to vancomycin and dalbavancin under identical conditions, using the same tri-peptide solution.

[0081] Figures 17A and 17B depict the possible interaction of dalbavancin monomers and multimers (including dimers) with tri-peptide ligand and HSA. Figure 17A depicts dalbavancin in monomer-dimer equilibrium in solution, binding as monomer to two separate sites on HSA. Figure

17B depicts ligand binding to dalbavancin dimer in solution and more weakly to dalbavancin monomers attached to HAS

[0082] Figure 18 provides mean dalbavancin plasma concentration-time profiles.

[0083] Figure 19 provides mean dalbavancin plasma concentration-time profiles.

[0084] Figure 20 provides additional mean dalbavancin plasma concentration-time profiles.

[0085] Figure 21 provides a graph of dalbavancin exposure through the relative treatment period vs. creatinine clearance.

[0086] Figure 22 provides a comparison of exposure during the relative treatment period vs. overall exposure.

[0087] Figure 23 provides dalbavancin concentration-time profiles for subjects with normal renal function and subjects with severe renal impairment.

[0088] Figure 24 provides dalbavancin plasma concentration time profiles.

[0089] Figure 25 provides a comparison of dalbavancin exposure through the treatment period.

[0090] Figure 26 provides the structure of antibiotic A 40926 compounds and dalbavancin compounds including the numbering of selected atoms;

[0091] Figure 27 provides the structure of dalbavancin B₀;

[0092] Figure 28 provides the structure of an exemplary *N*¹³, *N*¹³-dimethyl antibiotic compound of the invention;

[0093] Figures 29-31 provide schemes illustrating examples of the invention that verify the structure of an *N*¹³, *N*¹³-dimethyl antibiotic compound of the invention;

[0094] Figures 32-33 provide ESI and HPLC chromatograms verifying the structure of the *N*¹³, *N*¹³-dimethyl antibiotic compound;

[0095] Figure 34 provides the structure of dalbavancin B₂;

[0096] Figure 35 provides an infrared spectrum of dalbavancin B₂ (*N*¹³, *N*¹³-dimethyl dalbavancin B₀);

[0097] Figure 36 provides an ESI-MS spectrum of dalbavancin B₂ (*N*¹³, *N*¹³-dimethyl dalbavancin B₀); and

[0098] Figure 37 illustrates an HPLC trace of a composition of the invention.

[0099] Figure 38 provides a mass spectrum of isoB₀.

[00100] Figure 39 illustrates an HPLC trace of isoB₀.

[00101] Figures 40A-C provides mass spectra of isoB₀.

[00102] Figure 41 provides a ¹H-NMR spectrum of isoB₀.

[00103] Figure 42 provides a ¹³C-NMR spectrum of isoB₀.

[00104] Figure 43 provides the identification of the location of the protons for dalbavancin.

[00105] Figure 44 provides the plasma pharmacokinetics of dalbavancin in thigh-infected mice.

[00106] Figure 45 provides the effect of single doses of dalbavancin on the in vivo killing of *S. pneumoniae* over time.

[00107] Figure 46 provides the effect of single doses of dalbavancin on the in vivo killing of *S. aureus* over time.

[00108] Figure 47 provides the relationship between dalbavancin dosing interval and efficacy against *S. pneumoniae*.

[00109] Figure 48 provides the relationship between dalbavancin dosing interval and efficacy against *S. aureus*.

[00110] Figure 49 provides the relationship between dalbavancin PK/PD parameters and efficacy against *S. pneumoniae*.

[00111] Figure 50 provides the relationship between dalbavancin PK/PD parameters and efficacy against *S. aureus*.

[00112] Figure 51 provides the dose-response curves for dalbavancin against various strains.

[00113] Figure 52 provides the dose-response curves for dalbavancin against *S. pneumoniae* and *S. aureus*.

[00114] Figure 53 provides the dose-response curves for dalbavancin in both normal and neutropenic mice infected with *S. pneumoniae*.

[00115] Figure 54 provides the dose-response curves for dalbavancin in both the lung and thigh infection models.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

[00116] When describing compounds of the invention, pharmaceutical compositions containing such compounds and methods of using such compounds and compositions, the following terms have the following meanings unless otherwise indicated.

[00117] "Antibiotic A 40926 compound" refers to a glycopeptide antibiotic known to those of skill in the art. Exemplary antibiotic A 40926 compounds are described in U.S. Patent Nos. 4,935,238, 4,868,171 and 4,782,042, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entireties.

26
24

[00118] "Dalbavancin compound" refers to a glycopeptide antibiotic described in U.S. Patent No. 5,750,509 and U.S. Patent Application Publication No. 2004/0142883, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entireties. The systematic name of an exemplary dalbavancin compound known to those of skill in the art is ristomycin A aglycone, 5,31-dichloro-38-de(methoxycarbonyl)-7-demethyl-19-deoxy-56-O-(2-deoxy-2-((10-methyl-1-oxoundecyl)amino)-beta-D-glucopyranuronosyl)-38-(((3-(dimethylamino)propyl)amino)-carbonyl)-42-O-alpha-D-mannopyranosyl-*N*¹³-methyl-. Examples include those depicted in Figs. 26 and 27. Dalbavancin compounds include those compounds with optional sugar moieties at the 56 and 42 positions and optional acyl groups, such as fatty acids, on the sugars. Dalbavancin compounds can be derived from the natural antibiotic A-40926 known to those of skill in the art. Exemplary dalbavancin compounds include those described U.S. Patent Application Publication No. 2004/0142883 such as dalbavancin A₀, A₁, B₀, B₁, C₀ and C₁.

[00119] "*N*¹³, *N*¹³-dialkyl antibiotic compound," described in detail in the sections below, refers to a compound of the invention, *i.e.* an antibiotic compound having two alkyl groups on its *N*¹³ nitrogen. A *N*¹³, *N*¹³-dialkyl antibiotic compound of the invention can be derived from an antibiotic A 40926 compound or from a dalbavancin compound such as dalbavancin A₀, A₁, B₀, B₁, C₀ and C₁.

[00120] "*N*¹³, *N*¹³-dimethyl antibiotic compound," described in detail in the sections below, refers to a compound of the invention, *i.e.* an antibiotic compound, having two methyl groups on its *N*¹³ nitrogen.

[00121] "Acyl" refers to a radical -C(O)R, where R is alkyl.

[00122] "Alkyl" refers to monovalent saturated aliphatic hydrocarbyl groups preferably having from 1 to about 11 carbon atoms, more preferably from 1 to 8 carbon atoms, and still more preferably from 1 to 6 carbon atoms. The hydrocarbon chain may be either linear or branched. This term is exemplified by groups such as methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, *iso*-butyl, *tert*-butyl, *n*-hexyl, *n*-octyl, *tert*-octyl and the like. The term "lower alkyl" refers to alkyl groups having from 1 to 6 carbon atoms.

[00123] "Alkylene" refers to divalent saturated aliphatic hydrocarbyl groups preferably having from 1 to 11 carbon atoms and more preferably 1 to 6 carbon atoms which can be linear or branched. This term is exemplified by groups such as methylene (-CH₂-), ethylene (-CH₂CH₂-), the propylene isomers (*e.g.*, -CH₂CH₂CH₂- and -CH(CH₃)CH₂-) and the like.

[00124] "Amino" refers to the radical -NH₂.

[00125] "Alkylamino" refers to the radical -NH-alkyl or -N(alkyl)₂.

[00126] "Aminoalkylamino" refers to a radical of the form -NR-(alkyl)-NR'R" wherein each R, R' and R" independently represent hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, cycloheteroalkyl, substituted cycloheteroalkyl, heteroaryl or substituted heteroaryl group. Preferred R, R' and R" groups include hydrogen and alkyl. Exemplary aminoalkylamino groups are described in U.S. Patent No. 5,750,509, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

[00127] "Carboxy" refers to the radical -C(O)OH.

[00128] "Dialkylamino" means a radical -NRR' where R and R' each independently represent an alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, cycloheteroalkyl, substituted cycloheteroalkyl, heteroaryl or substituted heteroaryl group as defined herein.

[00129] "Halo" or "halogen" refers to fluoro, chloro, bromo and iodo. Preferred halo groups are either fluoro or chloro.

[00130] "Percent HPLC distribution" of a particular component is calculated by comparing the area of the peak corresponding to the particular component to the total chromatographic area.

[00131] "Pharmaceutically acceptable" means approved (by a regulatory agency for investigational or commercial use) of the federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopoeia or other generally recognized pharmacopoeia for use in animals, and more particularly in humans.

[00132] "Pharmaceutically acceptable salt" refers to a salt of a compound of the invention that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound. Such salts include: (1) acid addition salts formed with organic or inorganic acids such as hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, nitric, phosphoric, acetic, trifluoroacetic, trichloroacetic, propionic, hexanoic, cyclopentylpropionic, glycolic, glutaric, pyruvic, lactic, malonic, succinic, sorbic, ascorbic, malic, maleic, fumaric, tartaric, citric, benzoic, 3-(4-hydroxybenzoyl)benzoic, picric, cinnamic, mandelic, phthalic, lauric, methanesulfonic, ethanesulfonic, 1,2-ethane-disulfonic, 2-hydroxyethanesulfonic, benzenesulfonic, 4-chlorobenzenesulfonic, 2-naphthalenesulfonic, 4-toluenesulfonic, camphoric, camphorsulfonic, 4-methylbicyclo[2.2.2]-oct-2-ene-1-carboxylic, glucoheptonic, 3-phenylpropionic, trimethylacetic, *tert*-butylacetic, lauryl sulfuric, gluconic, benzoic, glutamic, hydroxynaphthoic, salicylic, stearic, muconic acid and the like acids; or (2) salts formed when an acidic proton present in the parent compound either (a) is replaced by a metal ion, *e.g.*, an alkali metal ion, an alkaline earth ion or an aluminum ion, or alkali metal or alkaline earth metal hydroxides, such as sodium, potassium, calcium, magnesium, and barium hydroxide, ammonia or (b) coordinates with an organic base, such as aliphatic, alicyclic, or aromatic organic amines, such as methylamine, dimethylaminem, diethylamine, picoline, ethanolamine,

27
28

diethanolamine, triethanolamine, *N*-methylglucamine and the like (see, e.g., U.S. Patent No. 5,606,036).

[00133] Salts further include, by way of example only, sodium, potassium, calcium, magnesium, ammonium, tetraalkylammonium and the like, and when the compound contains a basic functionality, salts of non-toxic organic or inorganic acids, such as hydrochloride, hydrobromide, tartrate, mesylate, acetate, maleate, oxalate and the like. The term "pharmaceutically acceptable cation" refers to a non-toxic, pharmaceutically acceptable cationic counterion of an acidic functional group. Such cations are exemplified by sodium, potassium, calcium, magnesium, ammonium and tetraalkylammonium cations and the like.

[00134] "Pharmaceutically acceptable vehicle" refers to a diluent, adjuvant, excipient or carrier with which a compound of the invention is administered.

[00135] "Solvate" refers to a compound of the present invention or a salt thereof, that further includes a stoichiometric or non-stoichiometric amount of solvent bound by non-covalent intermolecular forces. Where the solvent is water, the solvate is a hydrate.

[00136] "Preventing" or "prevention" refers to a reduction in the risk of acquiring a disease or disorder (*i.e.*, causing at least one of the clinical symptoms of the disease not to develop in a subject that may be exposed to or predisposed to the disease but does not yet experience or display symptoms of the disease). Preferably, prevention refers to the use of a compound or composition in a subject not yet affected by the disease or disorder or not yet exhibiting a symptom of the disease or disorder, for instance a subject not yet infected or not yet exhibiting the symptoms of infection.

[00137] "Subject" includes humans. The terms "human," "patient" and "subject" are used interchangeably herein.

[00138] "Therapeutically effective amount" means an amount of a compound or composition that, when administered to a subject for treating a disease, is sufficient to effect such treatment for the disease. A "therapeutically effective amount" can vary depending on, *inter alia*, the compound, the disease and its severity, and the age, weight, *etc.*, of the subject to be treated.

[00139] "Treating" or "treatment" of any disease or disorder refers, in one embodiment, to ameliorating the disease or disorder (*i.e.*, arresting or reducing the development of the disease or at least one of the clinical symptoms thereof) that exists in a subject. In another embodiment, "treating" or "treatment" refers to ameliorating at least one physical parameter, which may be indiscernible by the subject. In yet another embodiment, "treating" or "treatment" refers to modulating the disease or disorder, either physically (*e.g.*, stabilization of a discernible symptom) or

physiologically (e.g., stabilization of a physical parameter) or both. In yet another embodiment, "treating" or "treatment" refers to delaying the onset of the disease or disorder.

[00140] It is to be understood that compounds having the same molecular formula but differing in the nature or sequence of bonding of their atoms or in the arrangement of their atoms in space are termed "isomers". Isomers that differ in the arrangement of their atoms in space are termed "stereoisomers".

[00141] Stereoisomers that are not mirror images of one another are termed "diastereomers" and those that are non-superimposable mirror images of each other are termed "enantiomers". When a compound has an asymmetric center, for example, when it is bonded to four different groups, a pair of enantiomers is possible. An enantiomer can be characterized by the absolute configuration of its asymmetric center and is designated (*R*) or (*S*) according to the rules of Cahn and Prelog, or can be characterized by the manner in which the molecule rotates the plane of polarized light and is designated dextrorotatory or levorotatory (i.e., as (+)- or (-)-isomers, respectively). A chiral compound can exist as either individual enantiomer or as a mixture thereof. A mixture containing equal proportions of enantiomers is called a "racemic mixture".

[00142] In certain embodiments, the compounds of this invention may possess one or more asymmetric centers; such compounds can therefore be produced as the individual (*R*)- or (*S*)-enantiomer or as a mixture thereof. Unless indicated otherwise, for example by designation of stereochemistry at any position of a formula, the description or naming of a particular compound in the specification and claims is intended to include both individual enantiomers and mixtures, racemic or otherwise, thereof. Methods for determination of stereochemistry and separation of stereoisomers are well-known in the art. In particular embodiments, the present invention provides the stereoisomers of the compounds depicted herein upon treatment with base.

[00143] The present invention provides novel pharmaceutical compositions of dalbavancin, methods of making the pharmaceutical compositions, and methods of treatment of bacterial infections using these novel compositions. In particular, the invention provides stable dalbavancin compositions having bactericidal activity, which may be refrigerated or stored at room temperature for a prolonged period of time, more preferably at least one year at room temperature, more preferably at least two years at room temperature, without significant degradation of the active dalbavancin component.

[00144] The present invention also provides improved dosage regimes and novel compositions of dalbavancin, and improved methods of treatment of antibiotic-resistant bacterial infections. In particular, the invention provides dalbavancin compositions having activity against one or more

antibiotic resistant strains of bacteria, such as MRSA, which may be administered in a dosing regimen of once every 5-7 days or longer.

[00145] Dalbavancin, which is also referred to in the scientific literature as BI 397 or VER001, is a semi-synthetic glycopeptide mixture, the properties of which have been reported in U.S. Pat. Nos. 5,606,036, 5,750,509, 5,843,679, and 5,935,238.

[00146] As used herein, the term "dalbavancin" refers to compositions comprising one or more, preferably two or more, in some cases three or more, in some cases four or more, in some cases five or more closely related homologs, termed "A₀," "A₁," "B₀," "B₁," "C₀," "C₁," "B₂" or "C₂," "D₀" and "D₁," as described below, or monomers, multimers (*i.e.*, dimer or higher order multimer), tautomers, esters, solvates, or pharmaceutically acceptable salts thereof. As used herein, "dimer" or "multimer" refers to either a homodimer or homomultimer, *i.e.*, a dimer or multimer composed of monomers of the same dalbavancin homolog, or a heterodimer or heteromultimer, *i.e.*, a dimer or multimer composed of monomers of at least two different dalbavancin homologs. The factors differ in the structures of the fatty acid side chains of the N-acylaminoglucuronic acid moiety, with the exception of C₂ (a.k.a. B₂). Mass spectrometry of the C₂ component has indicated the presence of an additional methylene group on the terminal amino group. Dalbavancin often includes "MAG," a non-homolog variant described below that lacks the acylglucuronamine moiety. Individually, dalbavancin homologs and MAG are sometimes referred to herein as "dalbavancin components."

[00147] Dalbavancin is prepared by chemical modification of the natural glycopeptide complex A-40,926 as described in Malabarba and Donadio (1999) *Drugs of the Future* 24(8):839-846. The predominant component of dalbavancin is Factor B₀, which accounts for >75% of the whole complex.

[00148] The amount of each of the components present in a dalbavancin composition is dictated by a variety of factors, including, for example, the fermentation conditions employed in the preparation of the natural glycopeptide complex A-40926, which is the precursor to dalbavancin (*see, e.g.*, U.S. Pat. No. 5,843,679), the conditions employed to recover A-40926 from the fermentation broth, the chemical reactions employed to selectively esterify the carboxyl group of the sugar moiety of A-40926, the conditions employed to amidate the peptidyl carboxyl group, the conditions employed to saponify the ester of the carboxyl group of the N-acylaminoglucuronic acid function, the conditions employed to recover dalbavancin from the synthetic mixture, and the like.

[00149] In preferred embodiments, dalbavancin compositions comprise at least about 80 to about 98% by weight of the B₀ component. In particularly preferred embodiments, dalbavancin comprises the following amounts of B₀:

Table 1. Preferred Amounts of B₂ Component in Dalbavancin Composition

Preferred¹	More Preferred¹	Even More Preferred¹
80-98	80-97	80-96
81-98	81-97	81-96
82-98	82-97	82-96
83-98	83-97	83-96
84-98	84-97	84-96
85-98	85-97	85-96
86-98	86-97	86-96
87-98	87-97	87-96
88-98	88-97	88-96
89-98	89-97	89-96
90-98	90-97	90-96

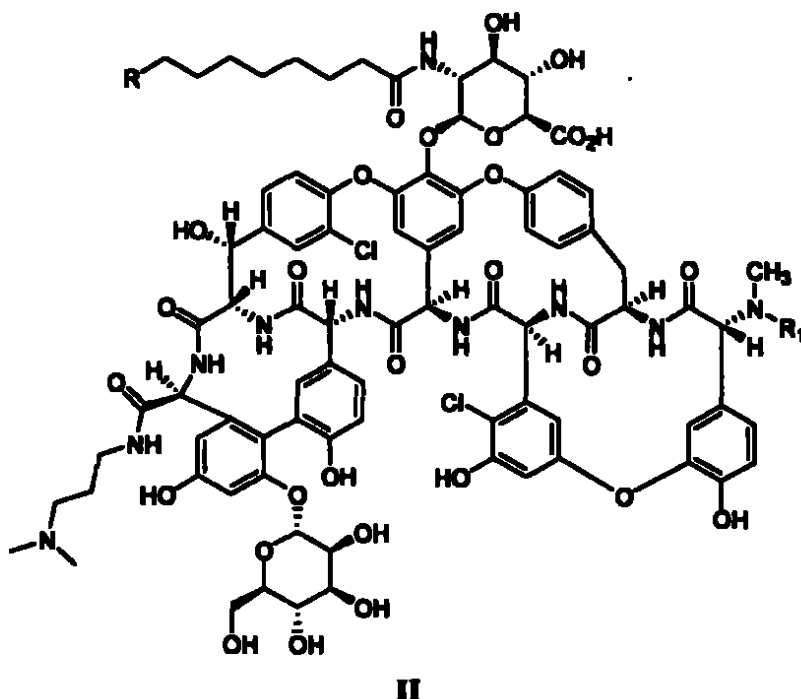
1 each range represents the mole % of B₂ relative to the total dalbavancin components present in the dalbavancin composition including MAG

[00150] In one embodiment, the dalbavancin composition or formulation contains a minimal amount, if any, of Components C₀, C₁, and C₂ (B₂). In another embodiment, the dalbavancin composition or formulation does not contain any of Components C₀, C₁, and C₂ (B₂).

[00151] Individual dalbavancin factors have previously been purified by HPLC and characterized by NMR. In U.S. Patent No. 5,750,509, Malabarba et al. described the antibiotic A 40926 derivative, which was characterized as having a carboxy, (C₁-C₄) alkoxy-carbonyl, aminocarbonyl, (C₁-C₄) alkylaminocarbonyl or hydroxymethyl substituent on the N-acylaminoglucuronyl moiety and a hydroxyl or a polyamine substituent in position 63 of the molecule. The compounds of the invention were found to have high in vitro activity against glycopeptide resistant Enterococci and Staphylococci. Malabarba et al., however, neither recognized combinations of factors that were pharmaceutically beneficial nor identified or characterized the degradation product that lacks the acylglucuronamine moiety. Malabarba et al. never monitored for MAG or produced a sterile form. Malabarba et al. only purified a small amount by HPLC and did not do quantitative mass analysis.

30

[00152] The chemical structure of several of the dalbavancin components is depicted in Formula II below:



Dalbavancin Component	R	R ₁	Molecular Weight
A ₀	-CH(CH ₃) ₂	H	1802.7
A ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	1802.7
B ₀	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	1816.7
B ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	1816.7
B ₂ or C ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	1830.74
C ₀	-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	1830.7
C ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	1830.7
D ₀	-(CH ₃) ₂	H	1788.66
D ₁	-CH ₂ CH ₃	H	1788.66
MAG	-	H	1459.27

[00153] All of the above dalbavancin components are bactericidally active against a number of Gram-positive bacteria. However, one non-homologous dalbavancin component, termed "MAG," which lacks an acylglucoronamine moiety present in other components, is less bactericidally effective, both *in vivo* and *in vitro*, than other dalbavancin components. (See Tables 2 and 3).

MAG is thought to be a decomposition product of one or more of the other dalbavancin components. Accordingly, in a preferred embodiment, the amount of MAG in dalbavancin is less than about 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, or 0.5 mole percent of all dalbavancin components present, including MAG.

Table 2. ED₅₀s of MAG in comparison with dalbavancin and vancomycin against *Staph. aureus* murine septicemias

Microorganism	Compound	MIC (μ g/mL)	ED ₅₀ (mg/kg)
MSSA <i>Staph. aureus</i> Smith 819	MAG	0.5	0.3
	Dalbavancin	0.06	0.05
	Vancomycin	0.5	1.7
MRSA <i>Staph. aureus</i> 3817	MAG	0.5	1.6
	Dalbavancin	≤ 0.03	0.7
	Vancomycin	0.5	1.0

** Treatment: once within 10 min from infection by sc route

39
31**Table 3. Microbiological Activity**

Microorganism	MIC µg/ml	
	MAG	Dalbavancin
L 819 <i>S aureus</i> Smith	0.5-0.5-0.25	≤0.13-0.06- <0.03
L 819 <i>S aureus</i> Smith 50% serum	1-1-1	1-2-2
L 613 <i>S aureus</i> clin. isolate	1-0.5-0.5	0.5-0.06-<0.03
3797 <i>S aureus</i> clin. Isolate GISA	0.5-0.5	2-2
3817 <i>S aureus</i> clin. Isolate	0.5	<0.03
L 147 <i>S epidermidis</i>	0.25-0.13-0.13	≤0.13-<0.03-<0.03
L 49 <i>S pyogenes</i> C203	0.5-0.5-0.25	≤0.13-<0.03-<0.03
L 44 <i>S pneumoniae</i> UC41	1-0.5-0.5	0.25-<0.03-<0.03
L 602 <i>S haemolyticus</i> clin. isolate	>32-32	>32->32
L 149 <i>E faecalis</i>	0.25-0.5-0.5	0.06-0.06
L 562 <i>E faecalis</i> clin. isolate	32->32->32	>32->32->32
L 1666 <i>E. faecium</i> Van-A	>32->32->32	>32->32->32
L 102 <i>B subtilis</i> ATCC	0.13-0.13	<0.03-<0.03
L 47 <i>E coli</i> SKF12140	>32->32->32	>32->32->32
G 16440 <i>E coli</i> iPerperm	8-8-16	16-8-16
L 79 <i>P vulgaris</i>	>32->32->32	>32->32->32
L 4 <i>P aeruginosa</i> ATCC10145	>32->32->32	>32->32->32
L 145 <i>C albicans</i> SKF2270	>32->32->32	>32->32->32

[00154] Additional modifications in the final drug substance originate from the fermentation process, the subsequent chemical steps, or drying. IsoB₀ (RRT 0.76) is a diastereomer of dalbavancin B₀ resulting from epimerization of a labile proton in the dalbavancin core structure. It originates during the deacetylation of the precursor A-40926 with base, forming the diastereomer of A-40,926. This diastereomer is subsequently converted to IsoB₀ in the chemical modification steps that follow. IsoB₀ is well resolved in the HPLC release method and is the only stereoisomer detected in the API. Laboratory data has demonstrated that IsoB₀ is not formed during the basic hydrolysis procedure that converts the ester form (MA-A-1) to dalbavancin. IsoB₀ has been characterized by NMR and MS and has demonstrated *in vivo* biological activity that is comparable to that of dalbavancin B₀.

[00155] The level of IsoB₀ in a dalbavancin composition is less than about 3.5%, alternatively less than about 3.0%, alternatively less than about 2.5%, alternatively less than about 2.0%, alternatively less than about 1.5%, alternatively less than about 1.0%, alternatively less than about 0.5%, alternatively less than about 0.4%, alternatively less than about 0.3%, alternatively less than about 0.2%, or alternatively less than about 0.1%.

[00156] The level of IsoB₀ in a dalbavancin composition may alternatively be between about 0.5% to about 3.0%, alternatively between about 0.5% to about 2.8%, alternatively between about 0.5% to about 2.5%, alternatively between about 0.5% to about 2.3%, alternatively between about 0.5% to about 2.0%, alternatively between about 0.5% to about 1.8%, alternatively between about 0.5% to about 1.5%, alternatively between about 0.5% to about 1.3%, or alternatively between about 0.5% to about 1.0%, or alternatively between about 0.1% to about 0.5%.

[00157] The level of IsoB₀ in a dalbavancin composition is alternatively not less than about 1.0%, alternatively not less than about 1.5%, alternatively not less than about 2.0%, alternatively not less than about 2.5%, alternatively not less than about 3.0%, alternatively not less than about 3.5%, alternatively not less than about 4.0%, alternatively not less than about 4.5%, or alternatively not less than about 5.0%.

[00158] Dalbavancin is thought to inhibit the biosynthesis of the bacterial cell wall by binding to D-alanyl-D-alanine-terminating precursors of peptidoglycans. Dimeric or higher order multimers of dalbavancin may possess further antibacterial properties by interaction of the lipophilic side chains with the cytoplasmic membrane of bacteria. See, for example, Malabarba and Ciabatti, et al. (2001) *Current Medicinal Chemistry* 8:1759-1773. A further elaboration on dalbavancin multimers may be found in U.S. Serial No. 10/714,166, entitled "DALBAVANCIN COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS," filed on November 14, 2003, as Attorney Docket No. 34231-20052.00, the disclosure of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[00159] *In vitro*, nonclinical, and clinical data indicate dalbavancin to be of benefit for the treatment of serious Gram-positive infections caused by MRSA and CoNS, and all streptococcal and non-VanA enterococcal species, including VanB and VanC phenotypes poorly susceptible or resistant to vancomycin.

[00160] Dalbavancin is more active *in vitro* against staphylococci (including some teicoplanin-resistant strains) than teicoplanin and vancomycin. Dalbavancin has better activity against streptococci, including penicillin-resistant strains, than teicoplanin or vancomycin. Dalbavancin is active *in vitro* and *in vivo* against a number of Gram-positive bacteria, including most drug resistant strains.

[00161] Dalbavancin is typically administered to an individual as a dalbavancin composition. As used herein, the term "dalbavancin composition" or "dalbavancin formulation" refers to a composition, typically a pharmaceutical composition comprising dalbavancin, as defined above, and one or more other non-dalbavancin components such as, for example, a pharmaceutically acceptable carrier, a stabilizer, a buffers, or other similar components.

[00162] As shown in Example 1, dalbavancin is effective at dose intervals of one week. Thus, an advantage of dalbavancin versus other treatment options is the ability to administer this antibiotic on a once-weekly basis, thereby maximizing patient compliance and potentially minimizing the need for or decreasing the length of a hospital stay for parenteral antibiotic administration. Less frequent dosing often permits treatment on an out-patient basis, thus decreasing treatment costs. As further shown in Example 1, a second dose of dalbavancin approximately one week after administration of the first dosage, where the second dose is approximately one-half the first dose, unexpectedly provides significant improvement in the efficacy of treatment.

Methods of use

[00163] Previously, various dosing regimens, including single dose and multiple dose regimens, for dalbavancin have been reported. Leighton et al. reported a multi-dose administration with an optimal dose ratio (loading dose (LD)/maintenance dose (MD)) of 10:1. In this study, dose escalation proceeded to 1120 mg single dose (SD) and a multiple dose regimen up to 500 mg BID Day 1 followed by 100 mg daily for 6 successive days. Leighton et al. "Dalbavancin: Phase I Single and Multiple-Dose Placebo Controlled Intravenous Safety, Pharmacokinetic Study in Healthy Volunteers," 41st ICAAC Abstracts, Chicago, IL, September 22-25 2001, Abstract No. 951, p. 25,

[00164] Leighton et al. also described other single and multiple dose administrations. In the single dose studies, reported dose escalation proceeded via a series of 140 mg, 220 mg, 350 mg, 500 mg, 630 mg, 840 mg, and 1120 mg. In the multiple dose phase, the dosing consisted of a loading dose, administered as two equal doses given 12 hours apart, followed by maintenance doses. The starting regimen was a loading dose of 150 mg BID followed by a maintenance dose of 30 mg per day for 6 days. Dose escalation proceeded as follows: 200 mg BID/40 mg, 300 mg BID/ 60 mg; 400 mg BID/80 mg, and 500 mg BID/100 mg. Leighton et al. "Dalbavancin: Phase I Single and Multiple-dose Placebo Controlled Intravenous Safe Pharmacokinetic Study in Healthy Volunteers." 41st ICAAC, Chicago, IL, December 2001, Poster No. 951.

[00165] White et al. reported dosing regimens of single 0.5 hour intravenous infusion of 70 mg, 140 mg, 220 mg, or 360 mg. The multi-dose regimen consisted of 70 mg administered daily for 7 days. White et al. "V-Glycopeptide: Phase 1 Single and Multiple-Dose Placebo Controlled Intravenous Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study in Healthy Subjects." 40th ICAAC, Toronto, Canada, September 17-20, 2000, Poster No. 2196 and Abstract No. 2196. All of the above-mentioned references are hereby expressly incorporated by reference in their entirety.

[00166] Novel methods are provided for administration of dalbavancin to an individual in need of treatment for a bacterial infection. Treatment can include prophylaxis, therapy, or cure. Methods include administration of one or more unit doses of dalbavancin in a therapeutically or prophylactically effective amount.

[00167] As used herein, "therapeutically effective amount" refers to the amount of dalbavancin that will render a desired therapeutic outcome (e.g., reduction or elimination of a bacterial infection). A therapeutically effective amount may be administered in one or more doses. A "prophylactically effective amount" refers to an amount of dalbavancin sufficient to prevent or reduce severity of a future bacterial infection when administered to an individual who is susceptible to and/or who may contract a bacterial infection, e.g., by virtue of a medical procedure or stay in the hospital, or exposure to an individual with a bacterial infection. Dalbavancin is generally administered in a pharmaceutically acceptable carrier.

[00168] Dalbavancin is often provided as a hydrochloride salt, which is freely soluble in water.

[00169] Typically, dalbavancin is administered as a "unit dose" in a dalbavancin formulation which includes an amount of dalbavancin sufficient to provide a therapeutically or prophylactically effective plasma level of dalbavancin for several days, often at least about 5 days, one week, or 10 days, when administered to an individual.

[00170] As used herein, "individual" refers to a vertebrate, typically a mammal, often a human.

[00171] All homologs of dalbavancin described above exhibit a prolonged half-life in plasma, often 9 days or more, although MAG is thought to have a shorter half-life than other homologs. The long half-life permits longer intervals between dosages than vancomycin or teicoplanin. As described in Example 1, weekly dosing of dalbavancin is effective for control of bacterial infections, in contrast to the twice daily dosing schedule which is often used for vancomycin or the once daily schedule generally used for teicoplanin. Less frequent dosing of dalbavancin offers significant treatment advantages over vancomycin and teicoplanin, particularly with regard to improved convenience and patient compliance with the treatment regimen. Surprisingly high doses (i.e., resulting in surprising high and long-lasting serum levels) can be administered, and with less

32
43

frequency than other available treatment options. The novel dosage regimen available for dalbavancin results in improved efficacy because at concentrations required to effect less frequent dosing, dalbavancin exhibits minimal adverse effects *in vivo*, evidencing a large pharmaceutical window, and further because blood levels of dalbavancin are maintained above minimum bactericidal levels for the entire treatment protocol, evidencing a prolonged serum half-life for dalbavancin. The combination of the large pharmaceutical window coupled with prolonged serum half-life permits less frequent dosing of dalbavancin.

[00172] In addition, dalbavancin is preferably formulated with a stabilizer which inhibits degradation of one or more of the components of dalbavancin. In one preferred embodiment, dalbavancin is formulated with a 1:2 weight ratio of mannitol:dalbavancin. In another preferred embodiment, dalbavancin is formulated with a 1:1:4 weight ratio of mannitol:lactose:dalbavancin.

[00173] In some embodiments, a dalbavancin formulation is administered at a dosage that results in therapeutically effective (*i.e.*, bactericidal) plasma levels of the drug for several days, often at least about 5 to about 10 days, often at least about one week. Generally, dalbavancin is maintained in plasma at or above the minimum bactericidal concentration of about 4 mg/l for at least 5 days. Often, dalbavancin is maintained at a plasma level of at least about 5 mg/l, often at least about 10 mg/l, often at least about 20 mg/l, often at least about 30 mg/l, often at least about 40 mg/l, for at least 5 days, often at least about one week or longer. Plasma levels of dalbavancin may be measured by methods that are well known in the art, such as liquid chromatography, mass spectrometry, or microbiological bioassay. An example of a method for quantitating dalbavancin in plasma is provided in Example 5.

[00174] Upper limits for dalbavancin plasma concentration levels are generally dictated by dosages which inhibit unacceptable adverse effects in the patient population treated.

[00175] Dalbavancin compositions may be administered in a single dose or in multiple doses. When administered as a single dose, the dalbavancin composition is preferably formulated to contain sufficient amounts of dalbavancin to effect antibacterial properties *in vivo* for at least 5 days, preferably at least 7 days, and more preferably at least 10 days.

[00176] When multiple doses are employed, dalbavancin can be administered weekly for two or more weeks. In one embodiment, dalbavancin is administered in at least two doses, often in two doses about 5 to about 10 days apart, more often once a week for two weeks. As shown in Example 1, such a dosing regimen provides significant advantages over conventional antibiotic treatment protocols.

[00177] Dalbavancin compositions also may be administered in multiple doses two or more days or at least one week apart or in one or more biweekly doses. In some embodiments, a dalbavancin composition is administered weekly, followed by biweekly, or monthly administration. In some embodiments, dalbavancin is administered at weekly intervals for 2, 3, 4, 5, 6, or more weeks.

[00178] Most advantageously, daily dosing is not required because higher, less frequent doses are used. Single or multiple doses may range, for example, from about 0.1 to about 5 grams. A single dose of about 0.1 to about 4 grams, e.g., about 3 grams, may be administered for various infection treatments. Where multiple doses are administered, for example, weekly, each dose may range, for example, from about 0.25 to about 5.0 grams.

[00179] For embodiments in which a single dose is administered to treat an infection, the amount of the dose may be, for example, about 0.1 to about 5 grams, or about 0.5 to about 4 grams, or about 1 to about 3.5 grams, or about 2 to about 3 grams e.g., about 3 grams. In some embodiments, a single dose of about 1, 1.5, 2, 2.5, or 3 grams is administered for treatment of a bacterial infection. For embodiments in which a single dose is administered for prophylaxis, the amount of the dose may be, for example, about 0.1 to about 3 grams, or about 0.1 to about 1 gram, e.g., about 0.5 or about 0.25 gram.

[00180] In dosing schemes that include multiple dosages, the individual dosages may be the same or different. In some embodiments, a first, higher dose is administered, that is, for example, about 1.5 to 10 times higher, in certain cases 9 times higher, in other cases 8 times higher, in other cases 7 times higher, in other cases 6 times higher, in other cases 5 times higher, in other cases 4 times higher, in other cases 3 times higher, in other cases 2 times higher, than one or more subsequent doses. For example, the first dose may be about 0.5 grams to about 5 grams and the second dose about 0.25 grams to about 2.5 grams, the first dose may be about 0.8 to about 2 g and the second dose about 0.4 to about 1 gram, or the first dose may be about 0.4 to about 3 g and the second dose about 0.2 to 1.5 g.

[00181] In some embodiments, at least two dosages are administered wherein the first dosage includes about twice as much dalbavancin as subsequent dosages. In one embodiment, a first dosage includes about 1 gram of dalbavancin and a subsequent dosage includes about 0.5 gram. In another embodiment, a first dosage includes about 0.5 gram of dalbavancin and a subsequent dosage includes about 0.25 gram.

[00182] In some embodiments, a dalbavancin composition is administered in two doses of equal or different amount two or more days or at least about one week apart. Often, two doses of about 0.2 to about 1.5 grams of dalbavancin are administered about 5 to about 10 days apart, more often about

32
34

1 week apart. In one embodiment, a first dosage of about 1 gram of dalbavancin and a second dosage of about 0.5 gram of dalbavancin are administered about 1 week apart.

[00183] In a multiple dosing regimen, the time between doses may range, for example, from about 5 to about 10 days, often about one week, alternatively about two weeks. Dose frequency may be, for example, two weekly doses, or multiple weekly doses. The dosing interval, or time between doses, can be, for example, any of about 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, or more days. The number of doses given, can be, for example, one, two, three, four, five, six or more doses, each dose after the initial dose being given after the selected dosage interval.

[00184] In a multiple dosing scheme, often the "trough level," or the level of dalbavancin in plasma after a first dose of dalbavancin and just prior to administration of a second dose, is at least about 4 mg/l. Preferably, the trough level at the end of a dosing interval such as about one week is at least about 20 mg/l, more preferably at least about 30 mg/l, and even more preferably at least about 40 mg/l.

[00185] Dalbavancin can be administered parenterally, e.g., intramuscularly (i.m.), intravenously (i.v.) (bolus or slow infusion), subcutaneously (s.c.), intraperitoneally (i.p.), or intrathecally (i.t.). The dosing schedule and actual dosage administered may vary depending on such factors as the nature and severity of the infection, the age, weight, and general health of the patient and the tolerance of a particular patient to dalbavancin, but will be ascertainable to health professionals. In one embodiment, a one gram intravenous dose of dalbavancin is followed by a 0.5 gram intravenous dose one week later.

[00186] Administration and delivery of the drug to the patient, e.g., intravenously, can be done at a controlled rate, so that the concentration in the blood does not increase too quickly or cause precipitation to occur. In some embodiments, dalbavancin is administered at an appropriate rate such that the drug forms a complex with endogenous protein(s) in the bloodstream. Without intending to be bound to a particular theory, it is believed that endogenous protein, such as human serum albumin, can form a complex *in vivo* with one or two molecules of dalbavancin homolog monomers. When a sufficient amount of dalbavancin is present, it is believed that up to two molecules of dalbavancin homolog will bind to the endogenous protein and it is further believed that this complex is formed by binding of separate homolog molecules of dalbavancin at two different binding sites. Alternatively, it is possible that dimeric dalbavancin is binding to a single binding site on the endogenous protein. A further elaboration on the dalbavancin-endogenous protein complexes discussed above may be found in U.S. Serial No. 10/713,924, entitled

"COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING BACTERIAL INFECTIONS WITH PROTEIN-DALBAVANCIN COMPLEXES," filed on November 14, 2003, as Attorney Docket No. 34231-20053.00, the disclosure of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[00187] The infusion duration can be, for example, about 1 minute to about 2 hours, or alternatively, from about 15 minutes to about 2 hours. For example, an infusion duration of about 30 minutes may be used where the dose is about 0.5 to about 1 gram. Intravenous administration under controlled rate conditions can generate concentrations of dalbavancin in the body that are in great excess of what can be achieved in the solution phase at physiological pH *in vitro*. Although not wishing to be limited by theory, this may be due to the formation of a complex of dalbavancin with endogenous protein(s) such as serum albumin, which may increase the solubility of dalbavancin in plasma as compared to *in vitro* studies.

[00188] Formation of a dalbavancin complex *in vitro* or *ex vivo* may permit faster administration, such as at least about 1 minute, at least about 10 minutes or at least about 20 minutes. Such a complex can be achieved by mixing human serum albumin and/or another endogenous protein with dalbavancin, thereby forming the complex *in vitro* or *ex vivo*, and then administering this complex to the treated patient. Alternatively, the human serum albumin or other endogenous protein may be obtained from autologous sources or by expression from a microorganism modified to contain the gene for the protein.

[00189] The amount of dalbavancin administered may be any of the dosages disclosed herein. The dalbavancin dose is generally chosen such that the drug will remain at a therapeutically or prophylactically effective (*i.e.*, bactericidal) plasma level for an extended period of time, often at least 5 days, more often about one week or longer. Administration of a dose of dalbavancin which produces and maintains bactericidal concentrations for at least about one week (or about 5 to about 10 days) is preferred. A bactericidal concentration is defined as the concentration of dalbavancin required to kill at least 99% of the bacteria present at the initiation of an *in vitro* experiment over a 24 hour period. A minimum bactericidal concentration of dalbavancin in plasma is typically about 4 mg/l.

[00190] Examples of indications that can be treated include both complicated and uncomplicated skin and soft tissue infections (SSTI) (also known as complicated and uncomplicated skin and skin structure infections (SSSI)), blood stream infections (BSI), catheter-related blood stream infections (CRBSI), osteomyelitis, prosthetic joint infections, surgical prophylaxis, endocarditis, hospital or community acquired pneumonia, pneumococcal pneumonia, empiric treatment of febrile neutropenia, joint space infections, and device infections (*e.g.*, pace makers and internal cardiac

3A
35

defibrillators). Gram-positive or antibiotic-resistant bacterial infections may be treated, such as a *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, or *Clostridium* genus infection, in particular *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, Groups A and C *Streptococcus*, *Neisseria gonorrhoeae*, or *Clostridium difficile*.

[00191] The invention provides methods for treatment of skin and soft tissue infections (SSTIs). Patients who may benefit from this treatment may have either deep or superficial infections. SSTI may involve deeper soft tissue and/or require significant surgical intervention, such as for example a major abscess, infected ulcer, major burn, or deep and extensive cellulitis. Infected surgical wounds may also be treated. The effectiveness of dalbavancin treating the skin is an unexpected and surprising result because dalbavancin complexes with proteins in vivo (see Example 5).

[00192] The clinical presentation of skin and skin structure infection may vary from mild folliculitis to severe necrotizing fasciitis. The mode of acquisition may also vary with community-acquired skin and skin structure infections, which are often preceded by injuries resulting from occupational exposure or recreational activities, and are usually associated with a greater diversity of pathogens. Hospital-acquired skin and skin structure infections are generally associated with surgical procedures, the development of pressure sores, and catheterization. Post-surgical infections are the third most frequent nosocomial infection and account for 17% of all nosocomial infections reported to the National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS). The most frequent source of infection is the patient's endogenous flora. *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, and *Enterococcus spp.* are the pathogens most frequently isolated from SSTIs.

[00193] Symptoms of SSTI infections may include erythema, tenderness or pain, heat or localized warmth, drainage or discharge, swelling or induration, redness, or fluctuance. Patients that may benefit from treatment with the methods of the invention include those with deep or complicated infections or infections that require surgical intervention, or patients with underlying diabetes mellitus or peripheral vascular disease. These infections are often caused by Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus* or *Streptococcus* species, such as *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus pyogenes*. Methods for treatment of a skin or soft tissue bacterial infection include administering a therapeutically effective amount of dalbavancin to an individual in need of treatment, in an amount and according to a dosing regime as discussed above. In some embodiments, a dalbavancin composition is administered intravenously in two doses, often about 5 to about 10 days apart, more often about 1 week apart. In some embodiments, the first dosage includes at least twice as much dalbavancin as the second dosage. In one embodiment, the first dosage is about 1000 mg and the

second dosage is about 500 mg. In another embodiment, the first dose may be about 1200 mg and the second dose may be about 600 mg.

[00194] The invention also provides methods for prophylactic prevention of the onset of a bacterial infection, for example an infection caused by *Staphylococcus aureus*, or by a *Neisseria* or *Clostridium* genus bacterium. In a prophylactic method of the invention, a prophylactically effective amount of dalbavancin is administered to an individual who may be susceptible to contracting a bacterial infection, for example, through a medical procedure. Often, dalbavancin is administered in an amount sufficient to provide a prophylactically effective plasma level for at least about 1 day, at least about 3 days, at least about 5 days, or at least about one week or longer. Dalbavancin compositions may be administered, for example, parenterally, *e.g.*, via intramuscular (i.m.), intravenous (i.v.), intraperitoneal (i.p.), subcutaneous (s.c.), or intrathecal (i.t.) injection, prior or subsequent to surgery as a preventative step against infection. Dalbavancin compositions may be administered immediately prior or subsequently to, 1 or more days or about one week prior or subsequently to, or during an invasive medical procedure such as surgery or a stay in a medical care facility such as a hospital to prevent infection. A prophylactic method may be used in any situation in which it is possible or likely that an individual may contract a bacterial infection, including situations in which an individual has been exposed to or is likely to be exposed to a bacterially infected individual. For prophylactic methods, dalbavancin compositions may be administered as either a single dose or as two or more doses of equal or different amount that are administered several days to about one week apart. In one embodiment, a dalbavancin composition may be administered prior to or simultaneously with insertion of an intravenous catheter in order to prevent a bloodstream related infection.

[00195] For prophylactic methods, dalbavancin compositions may be administered in a single dose or in multiple doses, according to any of the dosing schemes described above. Often, a dalbavancin composition is administered as a single dose comprising about 0.1 to about 3 grams, or about 0.1 to about 1 gram, *e.g.*, about 0.25 gram or about 0.5 gram. In one embodiment, a single dose of about 0.25 gram is administered intravenously over a time frame of about 2 minutes to about 1 hour, *e.g.*, about 30 minutes. In another embodiment, the dalbavancin composition is administered intravenously simultaneously with administration of another pharmaceutical (*e.g.*, antibiotic) treatment.

[00196] In any of the therapeutic or prophylactic methods described above, the dalbavancin composition may be administered either simultaneously or sequentially with at least one other antibiotic. In some embodiments, at least one other antibiotic that is effective (*e.g.*, bactericidal)

35
36

against one or more Gram-negative bacterial species and/or a Gram-positive bacterial strain against which dalbavancin is not effective is administered in addition to dalbavancin. In some embodiments, dalbavancin and at least one antibiotic that is effective (*e.g.*, bactericidal) against at least one Gram-negative bacterial species is administered as a mixture in the dalbavancin composition.

Pharmacokinetics

[00197] Animal studies of dalbavancin were conducted using mice, rats, rabbits, dogs, and minipigs.

[00198] Various validated methods were used to quantify dalbavancin. Dalbavancin API consists of 5 homologues (A₀, A₁, B₀, B₁, and B₂). Methods based on antibacterial activity measured all microbiologically active dalbavancin components. With chromatographic methods, the major component B₀ was measured in combination with component B₁ (together 90% to 95% of dalbavancin) and the result reported in terms of total dalbavancin. Liquid scintillation counting (LSC) and liquid chromatography with radiochemical detection (LC/RC) allowed for the measurement of dalbavancin and metabolites in plasma, urine, and feces of animals given radiolabeled drug. Whenever both dalbavancin and drug-derived radioactivity were quantified in the plasma of animals given clinically relevant doses, the concentration-time curves for drug and radioactivity were superimposable. This indicates that virtually all of the drug-derived radioactivity in plasma was intact drug.

[00199] The drug was widely distributed throughout the body into all tested organs and tissues after IV dose administration. Dalbavancin penetrated into the skin of rats and minipigs. Dalbavancin kinetics behaved in a predictable manner across species. Plasma clearance (CL) was found to be proportional to species body weight. Additionally, dalbavancin crossed the rat placenta and was found in fetal rat plasma.

[00200] Dalbavancin is not a substrate, inhibitor, or inducer of hepatic cytochrome P450 isoenzymes. The drug is not metabolized *in vitro* by rat, dog, or human hepatic microsomes; rat, dog, or human hepatocytes; or human kidney microsomes. Dalbavancin did not affect the metabolism of marker substrates by isolated human hepatic microsomes. Administration of dalbavancin to rats did not induce any P450 activity.

[00201] Similar dalbavancin metabolite profiles are observed across species. Two (2) metabolites (OH-dalbavancin and MAG) have been observed in the urine of rats, dogs, and humans. Both metabolites are either undetectable or close to the limit of detection (<0.4 mg/L) in human plasma,

have less antibacterial activity than dalbavancin, and contribute little (if anything) to *in vivo* activity. With clinically relevant doses, similar results were generally observed in animal plasma. [00202] The drug has dual routes (renal and fecal) of excretion and is excreted as intact drug and metabolites. Dalbavancin is excreted in the urine and feces of rats, dogs, and humans. Most of the dose is excreted as intact drug in the urine. OH-dalbavancin and MAG are found in the urine as well. Some intact drug is found in animal feces along with trace quantities of metabolites. Human feces contained microbiologically active dalbavancin components. Dalbavancin is also excreted into rat milk. Therefore, dalbavancin is eliminated from the body via metabolism, urinary excretion, and fecal excretion. This would predict that little if any dose adjustments would be required based on patient demographics. Surprisingly, patients with severe renal failure (creatinine clearance CL_{CR} less than 30 mL/min) achieved higher levels than normal renal patients (creatinine clearance CL_{CR} greater than 80 mL/min). The severe patients with a 1 g dose on Day 1 appeared similar to the levels for a normal patient who received 100 mg on Day 1 and 500 mg on Day 8.

Pharmaceutical compositions

[00203] The invention provides pharmaceutical compositions formulated for administration of dalbavancin according to the methods described above. Pharmaceutical compositions of the invention may be in the form of a unit dose of dalbavancin that includes an amount of dalbavancin sufficient to provide a therapeutically or prophylactically effective plasma level of dalbavancin for several days, often at least about 3 days, at least about 5 days, or at least about one week or longer when the composition is administered to an individual, and a pharmaceutically acceptable carrier. Generally, a therapeutically or prophylactically effective plasma level of dalbavancin is at least about 4 mg per liter of plasma. Plasma levels of dalbavancin may be measured by well known methods in the art, such as those described above.

[00204] Dalbavancin may optionally be in a pharmaceutically acceptable form for administration to an individual, optionally as a pharmaceutically acceptable, non-toxic salt.

[00205] Examples of suitable salts of dalbavancin include salts formed by standard reaction with both organic and inorganic acids such as, for example, hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, phosphoric, acetic, trifluoroacetic, trichloroacetic, succinic, citric, ascorbic, lactic, maleic, glutamic, camphoric, glutaric, glycolic, phthalic, tartaric, lauric, stearic, salicylic, methanesulfonic, benzenesulfonic, sorbic, picric, benzoic, cinnamic, and the like acids. Representative examples of bases that can form salts with dalbavancin include alkali metal or alkaline earth metal hydroxides such as sodium, potassium, calcium, magnesium, and barium hydroxide, ammonia and aliphatic,

36
37

alicyclic, or aromatic organic amines such as methylamine, dimethylamine, diethylamine, ethanolamine, and picoline. (See, for example, U.S. Pat. No. 5,606,036.)

[00206] In some embodiments, a pharmaceutically acceptable aqueous formulation of dalbavancin is provided that is suitable for parenteral administration, such as, for example, intravenous injection. For preparing such an aqueous formulation, methods well known in the art may be used, and any pharmaceutically acceptable carriers, diluents, excipients, or other additives normally used in the art may be used. In one embodiment, a pharmaceutically acceptable aqueous formulation for intravenous injection includes 5% dextrose.

[00207] Dalbavancin may be administered parenterally, i.e., the route of administration is by injection under or through one or more layers of the skin or mucous membranes. Since this route circumvents these highly efficient protective barriers of the human body, exceptional purity of a parenteral dosage form free of microorganisms and insoluble particulates must be achieved. The process used in preparing such a dosage form must embody good manufacturing practices that will produce and maintain the required quality of the product in terms of sterility and therapeutic effectiveness. In addition, the form should be stable when stored at room temperature for a practical and convenient dosage form.

[00208] There are several conventional methods generally available for converting bulk drug materials into a dosage form suitable for parenteral administration. These methods are generally outlined in Remington's Pharmaceutical Sciences, eighteenth edition, 1990 ("Remington").

Steam Sterilization

[00209] The USP defines steam sterilization as employing saturated steam under pressure for at least 15 minutes at a minimum of 121 °C in a pressurized vessel. A drug in its solid form may be placed in an autoclave to affect the steam sterilization. A drug in its solution form may be placed directly in an autoclave or contained in a sealed container and placed in an autoclave to affect the same kind of steam sterilization.

Dry Heat Sterilization

[00210] In dry heat sterilization, a bulk drug material is subjected to elevated temperatures at relatively low humidity. Because dry heat is less efficient than moist heat for sterilization, longer exposure times and higher temperatures than those used in steam sterilization is required. The objective is to kill microorganisms by an oxidation process. While establishing exact and correct time-temperature cycles is not routine, typical temperatures used are 140 - 170 °C from 1 to 3 hours.

Sterilization by Radiation

[00211] Sterilization by radiation may employ either electromagnetic radiation or particle radiation. Electromagnetic radiation, comprised of photons of energy, includes ultraviolet, gamma, x-ray, and cosmic radiation. Gamma radiation, emitted from radioactive materials such as cobalt-60 or cesium-137, is the most frequently used source of electromagnetic sterilization. The particle radiation most widely employed for sterilization is the beta particle or electron radiation.

Sterilizing Filtration

[00212] Sterilizing filtration is a process that removes, but does not destroy, microorganisms from a fluid stream. Such filtration is the method of choice for solutions that are unstable to other types of sterilizing processes.

Sterile Freeze-drying (Lyophilization)

[00213] This method employs sterilizing filtration with the subsequent step of separating the sterilized drug from solution by sublimating the solution after the solution is frozen, leaving behind the drug substance. The method typically comprises the following steps:

- 1) dissolve bulk drug in aqueous solution
- 2) sterilize the solution by membrane filtration
- 3) fill the sterilized solution in opened, pre-sterilized vials and place in freeze-drying chamber
- 4) freeze the solution in the vials
- 5) evacuate the chamber to sublime the ice under low temperature
- 6) increase the temperature to room temperature or above to remove the residual water.

Sterile Freeze-Drying (Lyophilization) with addition of sterile water (steam)

[00214] This method employs sterilizing filtration with the subsequent steps of separating the sterilized drug from the solution by freeze-drying (lyophilization), and adding sterile water in the form of steam.

Sterile Precipitation

[00215] This method employs sterilizing filtration with the subsequent step of precipitating the sterilized drug from solution. More specifically, a bulk drug is first dissolved in water at an

37
3.8

elevated temperature (above room temperature), the heated solution is then filtered under aseptic conditions to remove any microorganisms, and the filtered solution is then cooled in order to precipitate the drug from solution. The precipitated drug is then separated from the solution by filtration or centrifugation, and filled into containers by powder filling under aseptic conditions. For such powder filling to be practical, the drug must have good flow properties – the powder should generally be granular, non-crystalline and of uniform particle size.

[00216] A pharmaceutical composition for parenteral administration includes dalbavancin and a physiologically acceptable diluent such as sterile or deionized water, for injection, physiological saline, 5% dextrose, water miscible solvent (*e.g.*, ethyl alcohol, polyethylene glycol, propylene glycol, etc.), non-aqueous vehicle (*e.g.*, oil such as corn oil, cottonseed oil, peanut oil, and sesame oil), or other commonly used diluent. The formulation may additionally include a solubilizing agent such as polyethylene glycol, polypropylene glycol, or other known solubilizing agent, buffers for stabilizing the solution (*e.g.*, citrates, acetates, and phosphates) and/or antioxidants (*e.g.*, ascorbic acid or sodium bisulfite). (See, for example, U.S. Patent No. 6,143,739.) Other suitable pharmaceutical carriers and their formulations are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. As is known in the art, pharmaceutical preparations of the invention may also be prepared to contain acceptable levels of particulates (*e.g.*, particle-free) and to be non-pyrogenic (*e.g.*, meeting the requirements of an injectable in the U.S. Pharmacopeia).

[00217] In one embodiment, a pharmaceutical composition is provided by dissolving a dried (*e.g.*, lyophilized) dose of dalbavancin, often containing a stabilizer or mixture of stabilizers, in an amount of water and preferably deionized water in a volume sufficient for dissolving the lyophile. Typically, the amount of water sufficient for dissolution is approximately 10 mL and the resulting pH of the dalbavancin solution is above 3.0, and about 3.5 to 4.5. This solution is further diluted in a secondary diluent, often containing 5% dextrose, such as an amount contained in a drip bag for intravenous administration, raises the pH of the dalbavancin solution to about 5 to 5.5. In another embodiment, the pH of the dalbavancin solution in a drip bag is about 4.5. The secondary diluent may be deionized and sterile water for injection. In one embodiment, the aqueous diluent is 5% dextrose.

[00218] Pharmaceutical compositions for parenteral administration may be made up in sterile vials containing one or more unit doses of dalbavancin in a therapeutically or prophylactically effective amount as described above, optionally including an excipient, under conditions in which bactericidal effectiveness of dalbavancin is retained. The composition may be in the form of a dry

(e.g., lyophilized) powder. Prior to use, the powder is reconstituted with a physiologically acceptable diluent and then withdrawn via syringe for administration to a patient. A pharmaceutical formulation as described above may be sterilized by any acceptable means including, for example, e-beam or gamma sterilization methods, or by sterile filtration.

[00219] A typical formulation for parenteral administration may include dalbavancin at a concentration such as about 0.1 to about 100 mg, about 0.5 to about 50 mg, about 1 to about 10 mg, or about 2 to about 4 mg of dalbavancin per ml of final preparation.

[00220] In some embodiments, a pharmaceutical composition in accordance with the invention includes a mixture of dalbavancin and one or more additional antibiotics. Preferably, at least one non-dalbavancin antibiotic in the mixture is effective (e.g., bactericidal) against one or more species of Gram-negative bacteria, such as, for example, azithromycin, and/or against one or more Gram-positive bacterial strains against which dalbavancin is not effective, such as, for example, linezolid or daptomycin. The mixture may also include a pharmaceutically acceptable carrier as described above.

[00221] In some embodiments, pharmaceutical compositions of the invention include one or more stabilizing substances which inhibit degradation of one or more of the components of dalbavancin to less active or inactive materials, homologs, or related materials, for example, MAG. As used herein, "stabilizing substance" or "stabilizer" refers to a substance that stabilizes the level of one or more of the constituent components of dalbavancin, for example, B₀, in the composition. A "stabilizing effective amount" refers to an amount of a stabilizer sufficient to enhance long-term stability of one or more components of a dalbavancin composition. In some embodiments, a stabilizing effective amount may be provided by a mixture of two or more stabilizing substances, each of which alone is not present in an amount sufficient to provide a stabilizing effect.

[00222] Examples of stabilizers include, for example, nonionic substances such as sugars, e.g., mono-, di-, or polysaccharides, or derivatives thereof, sugar alcohols, or polyols. Such stabilizing substances include, for example, mannitol, lactose, sucrose, sorbitol, glycerol, cellulose, trehalose, maltose, raffinose, dextrose, low and high molecular weight dextrans, or mixtures thereof.

[00223] In addition to sugars, stabilizers may also be amino acids. Amino acid stabilizers include natural and synthetic amino acids and amino acid derivatives. In a preferred embodiment, the amino acids are glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, phenylalanine, tryptophan, and asparagine. Stabilizers may also be cyclodextrins, cyclic amides such as niacinamide and benzamide, salicylic acid, and its ortho-, meta-, para-substituted hydroxyl acids and esters.

2578

[00224] In addition to adding stabilizers, adjusting the pH of the compounds was found to increase the stability of the composition. The particular pH of the composition that increases or maximizes the stability depends on the type and amount of stabilizer added. The pH may be preferably about 1-7, more preferably 2-6, more preferably 3-5, more preferably 4-5, more preferably approximately 4.5.

[00225] In one embodiment, the pharmaceutical composition includes a weight ratio of 1:2 mannitol:dalbavancin. In another embodiment, the pharmaceutical composition includes a weight ratio of 1:1:4 mannitol:lactose:dalbavancin. Surprisingly, it has been found that a combination of mannitol and lactose provides a greater stabilizing effect than either substance alone. Often, the pH of a pharmaceutical composition of the invention is, for example, about 3 to about 5, for example about 3.5 or about 4.5.

[00226] In some embodiments, one or more procedures may be employed to reduce formation of MAG. For example, freeze drying of dalbavancin in the presence of a stabilizing substance, such as mannitol and/or lactose, may be employed to reduce the amount of MAG formed.

[00227] Storage of dalbavancin compositions is often at lower than ambient temperature, such as at about 5° C, to enhance stability.

Drying

[00228] Acetone removal from high molecular weight natural products can be quite difficult because of it can form adducts with them. Its removal can be accomplished in presence of water that replaces acetone in the solid product. Moreover, the process of drying dalbavancin is more delicate due to the possibility of forming MAG, which depends on pH, temperature, vacuum, and time. In order to minimize MAG formation and speed up the drying process, low endotoxin water is added or sprayed on the product during the drying process to replace acetone. The excess water is later reduced with additional hours of drying.

[00229] Drying is carried out under vacuum (internal temperature at <25°C). When most of the acetone has been removed from the product, about 20 % (w/w) of low endotoxin water is sprayed on the solid product and drying is continued at the same conditions. To follow the drying process, acetone and Karl Fischer (K.F.) analyses are performed, and additional water is sprayed on the solid product until the residual acetone is less than 1.5 %.

Study 25

Drying at 20-30 °C at 50 mbar.

[00230] This procedure was first simulated in the laboratory using a rotary evaporator.

Dalbavancin batch 027 was dried at 30 °C without adding water giving a product which contained 6.4 % of MAG and 3.2 % of acetone. 126 g of this dried dalbavancin batch (batch 027, HCl/Dalba ratio 1.7 mola/mol) was charged in a 1 L round bottomed flask and the solid was sprayed with 25 mL of water every two hours, maintaining the temperature of the water bath at 20-30 °C and the vacuum at 50 mbar. Samples of the dalbavancin were taken at specific times and analyzed for acetone, K.F., and MAG analyses. The data obtained are reported in Table 4A. All of the percentages of MAG reported in this table are the difference between the actual amount and the starting amount.

Table 4A

Time h	T °C	P mbar	water %	Acetone %	Delta MAG %	water sprayed %
0	-	-	1.6	3.2	-	20
2	20-25	50	8.3	2.8	0	20
4	20-25	50	15.6	1.9	0	20
6	20-25	50	23.3	0.9	0	-
8	30	50	22.6	0.56	-	-
10	30	50	21.8	0.43	0	-
12	30	50	20.8	0.22	0	-

This experiment was completed with some additional hours of drying at the same conditions, reducing the water content below 15 %.

Drying at 30 °C at 10 mbar.

[00231] 125 g of Dalbavancin batch 027, MAG 6.4 % (HPLC area %), was dried at 30 °C and 10 mbar for 24 hours by using the same equipment of the previous experiment. The results obtained are reported in Table 4B.

Table 4B

39
40

Time h	T °C	P mbar	KF %	Acetone %	Delta MAG %	water sprayed %
0	-	-	1.6	3.21	-	20
2	30	10	13.0	1.09	0	20
4	30	10	15.08	1.18	0	20
6	30	10	16.8	0.02	0	-
24	30	10	8.89	0.02	0	-

[00232] From these laboratory experiments, it can be concluded that the drying process can be simplified by adding water to the solid product. These results were unexpected since the degradation of dalbavancin to MAG is a hydrolysis step, one would expect that the increase in water would increase the degradation process. In this way, acetone is rapidly removed from the product, thereby reducing the drying time and avoiding the formation of additional MAG. Moreover, it can be observed (Table 4B) that a lower residual pressure gave a significant reduction of the drying process. It is also surprising that the acetone level was reduced in the presence of a large amount of water.

Drying of Dalbavancin in Tumble Drier

[00233] Wet dalbavancin was put into a tumble drier, DR 216, and dried at 29–32 °C (external temperature) with maximum vacuum (< 50 mbar). At the beginning, the internal temperature decreased from 30 to 17–18 °C and then, when it began to increase, a sample of product was taken for analysis (water 17.2 % and acetone 9.5 %). At this point, low endotoxin water (about 20 %, w/w) was sprayed into the drier on the stirred product and additional samples were taken on time for analysis. After two hours, low endotoxin water was sprayed again until the amount of acetone was lower than 0.5 %, (Table 4C).

Table 4C

External temperature 29 - 30 °C .

Pressure = 10-15 mbar

Time h	weight Kg	Int. Temp.	Water added mL (*)	analysis #	water %	Acetone %	MAG area %
0		19.1					0.11
1		17.4					“
2		18.3					“
3		23.5		200201019	17.27	9.52	“
4.5		26.8	500	“	19.59	4.10	0.13
6.5		28.1	500	“	19.60	0.61	0.16
8.5		28.1		“	22.38	0.13	0.12
9.5		28.5		“	19.66	0.12	0.13
11.5		21.9		“	17.68	0.09	0.31
18		29.5		“	14.11	n.d.	0.38

Final weight 2592 g, An. # 200201027: water(K.F.) 13.93 %, acetone 0.12 %, MAG 0.38 %.

(*) water was sprayed in the tumble drier after sampling

Comparison of Drying in the Presence and Absence of Water

[00234] This study is a comparison between dalbavancin batch 027 and 027/R drying processes carried out in the absence (batch 027) and in the presence of water (027/R). Dalbavancin batches 027 (14.6 Kg) and 027/R (8.3 Kg) were dried under vacuum at 25-35 °C (internal temperature) using a tumble drier (DR 216). Batch 027 was dried without adding water. In contrast, four additions of 400 mL each of low endotoxin water were sprayed on batch 027/R. During each drying, samples of dalbavancin were taken at specific times for analysis. The results are reported in Table 5. For batch 027, MAG was only determined at the end of the drying process.

47

Table 5

	Lot 027					Lot 027/R					
hours	temp. (°C)	Press mbar	KF (%)	Acetone (%)	MAG (%)	temp. (°C)	Press mbar	KF (%)	Acetone (%)	MAG (%)	Water added (mL)
0	32	280			0.52 (*)	30	171			0.22 (*)	
2	29	32									
3	-	-				23	57	18	8.7	0.23	
7	-	-				29	1	7.4	3.94	0.44	400
9	-	-				28.4	2	8	2.6	0.48	400
11	-	-				28	4	10	1.5	0.58	400
12.5	-	-				27	12	13.9	1	0.74	400
15	-	-				27.3	9	12	0.45	0.88	-
17	35	0	5.5	2.9							
18	-	-	-	-		27.5	8	11.5	0.28	0.98	-
28	37.8	-	-	-							
68	35.7	0	1.8	3.1	n.a.						
Analysis # 200101408 MAG. 8.48 % KF 1.83% Acetone 3.14%						Analysis # 200101944 MAG 1.81 % KF 11.88% Acetone 0.27%					

(*) An. # 200101382

(*) An. # 200101913

Full Scale Production Data

[00235] Below in Table 6 is a summary of the process and MAG levels between the full scale campaigns of 2002 and 2004.

Table 6

Campaign	2002			2004		
Lot	020004/R	020005/R	020006	DA204001	DA2040002	DA2040003
% MAG	2.3	0.8	1.7	0.4	0.3	0.3

[00236] In the 2002 Process, the dalbavancin product is dried under vacuum at less than 30 °C. At various times, low endotoxin water is sprayed on the product. Drying is continued until the acetone content is less than 0.5%.

[00237] In the 2004 process, dalbavancin API is recovered by centrifugation, washed with cold acetone (0-10 °C), and dried under vacuum (internal temperature at < 25 °C). MAG is the primary degradant of dalbavancin and its formation is dependent on temperature. During the drying

process, water is added in order to displace the acetone to ultimately achieve an acetone content of less than 1.5% (GC). As apparent from Table 5, drying at low temperature in the presence of water led to an unexpectedly lower amount of acetone present (compare 0.27% in Lot 027/R to 3.14% in Lot 027) and an unexpectedly low amount of MAG degradation product (compare 1.81% in Lot 027/R to 6.46% in Lot 027).

[00238] Therefore, a method for drying dalbavancin includes the steps of adding water to the dalbavancin product in order to displace the acetone. A preferred amount of water to be added is about 20 % of the assumed final dry product. Alternatively, the amount of water may be about 15 %, alternatively about 25 %, alternatively about 30 %, alternatively about 40%, alternatively about 45 %, alternatively about 50 % of the assumed final dry product.

[00239] A method for drying dalbavancin may include the steps of drying the dalbavancin product for about 2 hours without the addition of any water at about 100 torr and at a temperature of less than about 25 °C. Low endotoxin water is then sprayed on the product and the product is then dried for about two more hours. The level of acetone is then sampled and checked. If the level is more than about 1.5%, the additional water is sprayed on the product and the product is again dried until the acetone level is less than about 1.5%.

Manufacture

[00240] All bulk solution manufacturing operations take place in a class 100,000. (Grade D) area. Aseptic filling takes place in a class 100 (Grade A) laminar airflow area.

[00241] A suitable manufacturing vessel is charged with about 80% of the Water for Injections theoretical batch volume. The solution is mixed and the temperature is maintained between 15-30°C. The dalbavancin is added and mixed until it is dissolved. At least one stabilizer is added to the solution and mixed until dissolved. Water for injection is added to bring the solution up to final volume and the pH is adjusted, if necessary, with either 0.1N HCl or 1.0N NaOH to an appropriate pH. The bulk solution is sterilized by filtration through two 0.2 micron sterilizing filters in series into a sterilized receiving vessel. (A prefilter can be used if necessary to aid in filter clarity or to reduce particle load to the sterilizing filters). The solution is aseptically filled into sterile/depyrogenated Type I glass vials. Sterile siliconised lyophilisation stoppers are partially inserted to the lyophilisation position and the vials are transferred to the lyophilisation chamber.

[00242] The lyophilisation process is monitored by the use of thermocouple probes for representative vials. Vials are frozen at -45°C and held for 3 hours, after which vacuum is applied. The shelf temperature is adjusted to -25°C. When all thermocouples are -29°C or warmer the shelf

47

temperature is adjusted to 0°C. When all thermocouples are -5°C or warmer the shelf temperature is adjusted to +30°C. When all thermocouples are +27°C or warmer the vials are held for 14 ± 2 hours. The chamber is restored to atmospheric pressure by the introduction of sterile nitrogen which has been filtered through a 0.2 micron filter and the vials are then sealed by collapsing the lyophilisation shelves. Vials are then removed from the chamber and the aluminum seals are applied

[00243] All components and equipment are sterilized by appropriate processes. Vials are washed and sterilized in a hot air oven at a temperature not less than 255°C for not less than 3 hours.

Stoppers are steam autoclaved at a temperature of 123-125°C and a chamber pressure of about 33 psi. The dwell time in the sterile range is typically 50-60 minutes.

[00244] Validation of sterilization processes uses the "overkill" approach for both steam and dry heat sterilization cycles. All sterilization cycles provide a sufficient lethality to provide at least a 10^{-6} probability of microbial survival regardless of the naturally occurring microorganisms. All cycles are designed with lethalties sufficient to provide not less than 12 log reductions. Dry heat cycles will provide a minimum of a 3 log endotoxin reduction.

Stability Studies

[00245] Dalbavancin was found to decompose during the freeze drying process. The addition of a stabilizer was found to decrease the amount of decomposition of the active component B₀ during the stability studies.

[00246] The stability of various lyophilized formulations of dalbavancin at 25 °C and 40 °C over time is shown in Figures 1-4. Under FDA guidelines, a product that is stable for three to six months at 40 °C is assumed to be stable for two years at room temperature. Figures 1A, 2A, 3A, and 4A show the decrease in amount of dalbavancin component B₀, which is one of the bactericidally active dalbavancin components. As discussed above, component B₀ is also one of the major components of most dalbavancin compositions. Figures 1B, 2B, 3B, and 4B show the increase in the amount of MAG, a less active component thought to be a decomposition product of one or more of the other dalbavancin components. Table 7 lists the compositions for each of the formulations used in the stability studies, the results of which are shown in Figures 1-4. Any of these compositions could be used to produce a stable, sterile, particle free dosage form.

Table 7. Compositions of Various Dalbavancin Formulations

Composition	Dalbavancin (mg/vial)	Mannitol (mg/vial)	Lactose (mg/vial)	pH
A	250	62.5	--	3.4
B	250	—	—	3.69
C	250	62.5	—	3.80
D	250	—	—	3.01
E	250	62.5	—	3.01
F	250	—	—	4.5
G	250	62.5	—	4.5
H	250	62.5	—	5.3
I	250	125	—	5.0
J	250	62.5	—	5.0
K	250	125	—	4.5
L	250	62.5	—	4.5
M	250	62.5	62.5	4.5
N	250	—	125	4.5
O	250	125	—	3.3

[00247] As seen in Figures 1B and 2B, at T = 0, there is already a significant amount (greater than 4%) of MAG present for Composition D, which contains dalbavancin with no other non-dalbavancin components and which has not been pH adjusted (pH about 3.01), at 25 °C and 40 °C, respectively. At the higher temperature, the formation of MAG increased at a far greater rate. After 3 and 6 months at 40 °C, Composition D had 21.0 % MAG and 23.7 % MAG, respectively (see Figure 2B). This implies that pure dalbavancin is highly unstable, and that merely freeze-drying the dalbavancin results in significant degradation. In addition, normal drying also results in formation of the MAG degradation product. Storage at -20 °C is required for some formulations of dalbavancin.

[00248] When the pH is increased, without the addition of any other non-dalbavancin components, the stability increased. Composition D was not pH adjusted and had a pH of about 3.01. Composition B was adjusted to pH 3.69. Composition F was adjusted to pH 4.5. As seen in

52
43

Figures 1A and 2A, as the pH was increased, there was less initial degradation of B_0 and less overall degradation over time. Analogously, in Figures 1B and 2B, there was less MAG formation in the compositions that were adjusted to a higher pH, both initially and over time at both temperatures.

[00249] The addition of mannitol was also shown to increase the stability of dalbavancin significantly. The degradation of factor B_0 and increase in MAG over time was also reduced significantly in comparison with Composition D, which was also not pH adjusted but contained no mannitol. As seen in Composition E (62.5 mg mannitol, about pH 3.01), even without any pH adjustment, there was significant improvement in stability, both in the initial freeze-drying process and over time. At time $T = 0$, there is approximately 2% of MAG present at $T = 25^\circ\text{C}$ (see Figure 1A) and $T = 40^\circ\text{C}$ (see Figure 2A), which is less than half the amount of MAG present in Composition D at $T = 0$.

[00250] As the pH was increased and the amount of mannitol was held constant, the stability of the dalbavancin also increased. A comparison of Compositions E, C, and G illustrate that, as the pH was increased from about 3.01 to 3.8 to 4.5, the amount of degradation of dalbavancin also decreased. As seen in Figures 1A and 2A, as the pH was increased, there was less initial degradation of B_0 and less overall degradation over time. Analogously, in Figures 1B and 2B, there was less MAG formation in the compositions that were adjusted to a higher pH, both initially and over time.

[00251] Increasing the amount of mannitol, while keeping the pH constant, also resulted in an increase in stability. For instance, although Compounds L and K, which contain 62.5 mg and 125 mg of mannitol at pH 4.5, respectively, have similar amounts of B_0 at $T = 0$, the change in the percentage of B_0 after 12 months was significantly less for Compound K. A similar pattern can be seen for Compound J and I, which contain 62.5 mg and 125 mg of mannitol at pH 5.0, respectively.

[00252] Although changing the pH of the compositions containing only mannitol did result in changes in the amount of degradation of B_0 , there was no predictable trend. Compounds L, J, and H contain 62.5 mg of mannitol at pH 4.5, 5.0, and 5.3, respectively. The changes in the percentage of B_0 after 12 months was 1.0, 1.2, and 0.7, respectively, at 25°C . Compounds O, K, and I contain 125 mg of mannitol at pH 3.3, 4.5, and 5.0, respectively. The changes in the percentage of B_0 for these compositions after 12 months was 0.5, 0.1, and 0.3, respectively, at 25°C . Notably, after 2 months at 40°C , the amount of component B_0 only decreased by 1.9 % in Compound O and 1.0 % in Compound M (See Figure 4A).

[00253] Although the change in the percentage of B_0 for Compound O (125 mg of mannitol, pH 3.3) is similar to the other differences found for the compositions containing 125 mg of mannitol (see Compositions I and K), as seen in Figure 3A, the amount of initial degradation of B_0 at $T=0$ is significantly less for Compound O (88.3% B_0). This is especially the case when compared with Compound K (pH 4.5) and Compound I (pH 5.0), which had 85.3% B_0 and 85.5% B_0 , respectively. The differences between the amount of B_0 present and the amount of MAG present in Compound O (see Figures 3A and 3B) can most likely be explained by the fact that, as explained previously, B_0 is not the only dalbavancin component that degrades to form MAG.

[00254] Lactose also appears to be a suitable stabilizer for dalbavancin. For Compound N, which contains 125 mg of lactose at pH 4.5, the change in percentage of B_0 over 12 months was only 0.6 at 25 °C. After 2 months at 40 °C, the change in percentage of B_0 was only 1.4. Lactose alone, however, does not appear to stabilize the dalbavancin as well as mannitol. At pH 4.5, the B_0 component of Compound K (125 mg of mannitol) only decreased by 1.0 after 2 months at 40 °C.

[00255] The combination of mannitol and lactose also appears to stabilize dalbavancin and is particularly preferred. Mannitol and lactose have similar stabilizing properties. Mannitol, however, is a diuretic. Therefore, in a preferred embodiment, the amount of mannitol is minimized. Compound M contains 62.5 mg each of mannitol and lactose. As seen in Figure 3A, the change in percentage of MAG over 12 months at 25 °C was only 0.6. In addition, as seen in Figure 4A, the amount of MAG only increased by 2.1% after 3 months at 40 °C. This is less degradation than that seen for Compounds N (125 mg lactose) and K (125 mg mannitol), which both showed an increase in the amount of MAG of 2.9% after 3 months at 40 °C. It was unexpected that a combination of half of each of the amounts of mannitol and lactose used in other formulations would lead to a greater increase in dalbavancin stability.

[00256] Additional stability data for dalbavancin stabilized with mannitol and lactose at approximately pH 4.5 is reported in Tables 8A-D below for various temperatures.

22
44

Table 8A. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 554399 at 40°C/75% TH
(500 mg vial, mannitol and lactose, pH 4.5)

TEST	TIME (MONTHS)			
	0	1	3	6
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	95.4	95.7	92.2	91.6
Component Distribution				
(A ₀ + A ₁)	2.6	2.5	2.4	2.5
B ₀	87.0	86.0	85.4	84.9
(B ₁ + B ₂)	5.8	6.2	6.3	6.4
Degradants				
MAG	1.0	1.5	1.9	2.2
Maximum Individual Unspecified	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total Degradants	1.0	1.5	1.9	2.2
Reconstitution Time	115	57	47	55
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter				
Particles ≥10 microns	Meets USP	—	—	—
Particles ≥25 microns	Meets USP	—	—	—
Moisture	0.4	0.5	0.5	0.6
pH of Reconstituted Solution	4.3	4.6	4.5	4.5
Sterility	Meets USP	—	—	—

n.d. not detected

— not tested at this time point, per stability protocol

Table 8B. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 554399 at 30°C/ 65% RH
(500 mg vial, mannitol and lactose, pH 4.5)

TEST	TIME (MONTHS)					
	0	1	3	6	9	12
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	95.4	97.3	94.2	93.7	94.0	93.8
Component Distribution						
(A ₀ + A ₁)	2.6	2.5	2.5	2.5	2.4	2.4
B ₀	87.0	86.2	85.8	85.3	86.7	85.9
(B ₁ + B ₂)	5.8	6.2	6.4	6.5	5.5	6.4
Degradants						
MAG	1.0	1.1	1.3	1.5	1.7	1.7
Maximum Individual Unspecified	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	n.d.
Total Degradants	1.0	1.1	1.3	1.5	1.8	1.7
Reconstitution Time	115	146	53	40	37	49
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter						
Particles ≥10 microns	Meets USP	—	—	—	—	—
Particles ≥25 microns	Meets USP	—	—	—	—	—
Moisture	0.4	0.4	0.4	0.5	0.6	0.5
pH of Reconstituted Solution	4.3	4.5	4.5	4.4	4.5	4.5
Sterility	Meets USP	—	—	—	—	—

n.d. Not detected

— Not tested at this time point, per stability protocol.

24
45

Table 8C. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 554399 at 25°C/ 60% RH
(500 mg vial, mannitol and lactose, pH 4.5)

TEST	TIME (MONTHS)				
	0	3	6	9	12
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	95.4	94.6	93.2	93.9	92.6
Component Distribution					
(A ₀ + A ₁)	2.6	2.5	2.5	2.5	2.4
B ₀	87.0	86.0	85.9	87.0	86.2
(B ₁ + B ₂)	5.8	6.4	6.3	5.7	6.4
Degradants					
MAG	1.0	1.2	1.2	1.4	1.4
Maximum Individual Unspecified	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total Degradants	1.0	1.2	1.2	1.4	1.4
Reconstitution Time	115	55	68	54	50
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter					
Particles ≥10 microns	Meets USP	—	—	—	Meets USP
Particles ≥25 microns	Meets USP	—	—	—	Meets USP
Moisture	0.4	0.3	0.4	0.4	0.5
pH of Reconstituted Solution	4.3	4.5	4.5	4.6	4.6
Sterility	Meets USP	—	—	—	Meets USP

n.d. Not detected

— Not tested at this time point, per stability protocol.

Table 8D. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 554399 at 5°C
(500 mg vial, mannitol and lactose, pH 4.5)

TEST	TIME (MONTHS)				
	0	3	6	9	12
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	95.4	94.7	92.7	93.7	93.4
Component Distribution					
(A ₄ + A ₁)	2.6	2.5	2.5	2.5	2.4
B ₀	87.0	86.2	86.1	87.6	86.9
(B ₁ + B ₂)	5.8	6.4	6.3	5.7	6.4
Degradants					
MAG	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9
Maximum Individual Unspecified	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total Degradants	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9
Reconstitution Time	115	90	88	75	72
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter					
Particles ≥10 microns	Meets USP	—	—	—	Meets USP
Particles ≥25 microns	Meets USP	—	—	—	Meets USP
Moisture	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4
pH of Reconstituted Solution	4.3	4.5	4.5	4.5	4.6
Sterility	Meets USP	—	—	—	Meets USP

n.d. Not detected

— Not tested at this time point, per stability protocol.

[00257] Data from further long-term stability studies are listed in Tables 9-11. Samples were analyzed by reverse-phase HPLC utilizing binary mobile phase gradient and a UV detection system to determine the stability of the dalbavancin formulation. Dalbavancin content was determined using an external reference standard. The percentage distribution of dalbavancin components was calculated by comparing the area of each single component to the total area of all of the major drug components. The percentage distribution of impurities was calculated by comparing each the area of individual impurity to the total chromatographic area.

46

[00258] Samples were tested for HPLC assay, bioassay, water content, microbial limits, pH, HPLC distribution, or total impurities. The results are shown in Tables 9-11. Stability data for Batch 025 is shown in Tables 9A, 10A, and 11A, which has 1.5% MAG at T=0. Stability data for Batch 020005/R is shown in Tables 9B, 10B, and 11B, which has 0.8% MAG at T=0, as a result of a different drying process described that is described below.

[00259] Dalbavancin demonstrated good stability during storage at -20 °C (see Tables 9A-B) with no significant changes in bioassay, HPLC assay, HPLC distribution, or total impurities. The pH remained unchanged and a slight increase in water content was observed.

[00260] Degradation was observed over 36 months at 5 °C (see Table 10A) as evidenced by an increase in MAG content by about 2.9% and a corresponding decrease in Factor B₀ by about 3.6%. No trend in total impurities was observed and bioassay and pH remain essentially unchanged. Similar results are seen for Batch 020005 (see Table 10B).

[00261] More extensive degradation was observed during storage at 25 °C over 12 months (see Table 11A) with an increase in MAG of about 10.2% and a decrease in factor B₀ of approximately 8.5%. Levels of other factors, related substances, and pH remained unchanged. The water content increased by about 1.6%.

Table 9A. Stability Data for Unformulated Dalbavancin Batch 025 at -20°C (pH 3.5)

TEST	TIME (MONTHS)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
Physical Appearance	—	—	—	—	—	—	—	—
HPLC Assay (anhydrous, free base, % w/w)	92.0	93.3	90.1	88.6	88.4	91.1	89.6	90.3
Component Distribution (HPLC %AUC)								
A ₀ + A ₁	4.0	4.0	4.0	4.0	3.9	3.9	3.9	3.8
B ₁	83.4	83.5	82.1	82.9	84.4	83.8	83.5	82.7
B ₁ + B ₂	7.5	7.4	8.1	8.0	7.4	7.3	7.5	7.9
Related Substances (HPLC %AUC)								
MAG	1.5	1.5	1.3	1.6	1.3	1.5	1.4	1.2
Maximum Individual Unspecified	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Total Impurities	5.1	5.1	5.8	5.2	4.3	4.9	5.2	5.6
Moisture (% w/w)	11.0	13.3	12.1	12.6	12.1	12.8	12.2	14.2
pH	3.0	2.9	3.0	2.9	2.9	2.9	2.9	2.8
Microbial Limits*	<10, <10 cfu/g	—	—	—	—	—	—	—

— Not tested at this time point, per stability protocol.

* Total aerobic count, total combined molds and yeast count

Table 9B. Stability Data for Unformulated Dalbavancin Batch 020005/R at -20°C

TEST	TIME (MONTHS)					
	0	3	6	9	12	18
Physical Appearance	White to tan powder	White to tan powder	White to tan powder	White to tan powder	White to tan powder	White to tan powder
HPLC Assay (anhydrous, free base, % w/w)	92.0	94.4	92.5	94.6	91.0	92.1
Component Distribution (HPLC %AUC)						
A ₀ + A ₁	2.5	2.5	2.5	2.5	2.4	2.5
B ₀	87.1	87.5	86.7	86.6	86.5	87.3
B ₁ + B ₂	6.2	5.6	6.2	6.2	6.6	5.9
Related Substances (HPLC %AUC)						
MAG	0.8	0.9	0.9	0.8	0.9	0.9
Maximum Individual Unspecified	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2
Total Impurities	4.3	4.5	4.6	4.7	4.4	4.4
Moisture (% w/w)	18.2	20.1	20.1	20.3	20.0	19.6
pH	2.4	2.5	2.4	2.5	2.5	2.6
Microbial Limits*	2,1 cfu/g	—	—	—	—	—

— Not tested at this time point, per stability protocol.

* Total aerobic count, total combined molds and yeast count

Table 10A. Stability Data for Unformulated Dalbavancin Batch 025 at 5°C)

TEST	TIME (MONTHS)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
Physical Appearance	—	—	—	—	—	—	—	—
HPLC Assay (anhydrous, free base, % w/w)	92.0	91.0	90.3	91.8	90.5	89.3	88.2	87.3
Component Distribution (HPLC %AUC)								
A ₀ + A ₁	4.0	4.0	3.9	3.9	3.8	3.9	3.8	3.7
B ₀	83.4	83.1	81.3	81.8	83.3	82.2	81.3	79.8
B ₁ + B ₂	7.5	7.4	7.9	7.7	7.2	7.2	7.2	7.5
Related Substances (HPLC %AUC)								
MAG	1.5	1.8	2.0	2.5	2.8	3.3	3.8	4.4
Maximum Individual Unspecified	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
Total Impurities	5.1	5.5	6.9	6.5	5.7	6.7	7.7	9.0
Moisture (% w/w)	11.0	12.3	11.8	13.2	15.0	14.8	14.9	17.6
pH	3.0	3.0	3.0	2.9	2.9	2.9	2.9	2.8
Microbial Limits*	<10, <10 cfu/g	—	—	—	<1,3 cfu/g	—	<1,1 cfu/g	<1, <1 cfu/g

— Not tested at this time point, per stability protocol.
* Total aerobic count, total combined molds and yeast count

Table 10B. Stability Data for Unformulated Dalbavancin Batch 020005/R at 5°C

TEST	TIME (MONTHS)					
	0	3	6	9	12	18
Physical Appearance	White to tan powder	White to tan powder	White to tan powder	White to tan powder	White to tan powder	White to tan powder
HPLC Assay (anhydrous, free base, % w/w)	92.0	92.0	91.7	91.8	89.2	89.7
Component Distribution (HPLC %AUC)						
A ₀ + A ₁	2.5	2.5	2.5	2.4	2.4	2.3
B ₀	87.1	87.1	85.6	85.3	84.6	84.3
B ₁ + B ₂	6.2	5.6	6.2	6.1	6.4	5.5
Related Substances (HPLC %AUC)						
MAG	0.8	1.5	1.9	2.1	2.6	4.1
Maximum Individual Unspecified	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
Total Impurities	4.3	4.9	5.8	6.3	6.6	7.9
Moisture (% w/w)	18.2	17.4	17.2	16.4	15.4	14.2
pH	2.4	2.5	2.4	2.5	2.5	2.5
Microbial Limits*	2,1 cfu/g	—	—	—	<1, <1 cfu/g	—

— Not tested at this time point, per stability protocol.

* Total aerobic count, total combined molds and yeast count

Table 11A. Stability Data for Unformulated Dalbavancin Batch 025 at 25°C/ 60% RH

TEST	TIME (MONTHS)				
	0	1	3	6	12
Physical Appearance	—	—	—	—	—
HPLC Assay (anhydrous, free base, % w/w)	92.0	90.9	87.0	85.2	78.8
Component Distribution (HPLC %AUC)					
A ₀ + A ₁	4.0	3.9	3.8	3.7	3.4
B ₀	83.4	81.6	79.5	76.3	74.9
B ₁ + B ₂	7.5	7.4	7.0	7.3	6.3
Related Substances (HPLC %AUC)					
MAG	1.5	3.6	6.0	8.1	11.7
Maximum Individual Unspecified	0.2	0.2	0.2	0.4	0.3
Total Impurities	5.1	7.1	9.6	12.7	15.4
Moisture (% w/w)	11.0	11.3	12.1	12.9	12.6
pH	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Microbial Limits*	<10, <10 cfu/g	—	—	—	1, <1 cfu/g

— Not tested at this time point, per stability protocol.

* Total aerobic count, total combined molds and yeast count

Table 11B. Stability Data for Unformulated Dalbavancin Batch 020005/R at 25 °C/ 60% RH.

TEST	TIME (MONTHS)			
	0	1	3	6
Physical Appearance	White powder	White powder	White powder	White powder
HPLC Assay (anhydrous, free base, % w/w)	92.0	91.2	87.2	83.3
Component Distribution (HPLC %AUC)				
A ₀ + A ₁	2.5	2.5	2.3	2.3
B ₀	87.1	84.9	82.3	78.7
B ₁ + B ₂	6.2	5.3	5.3	5.8
Related Substances (HPLC %AUC)				
MAG	0.8	3.6	6.1	8.2
Maximum Individual Unspecified	0.2	0.2	0.3	0.7
Total Impurities	4.3	7.3	10.1	13.2
Moisture (% w/w)	18.2	15.2	13.8	12.6
pH	2.4	2.6	2.5	2.5
Microbial Limits*	2.1 cfu/g	—	—	—

— Not tested at this time point, per stability protocol.

* Total aerobic count, total combined molds and yeast count

[00262] Stability tests of the sterilized product were also conducted. Samples were tested for appearance of cake and solution, reconstitution time, pH, HPLC assay, bioassay, water content, sterility, HPLC distribution, and related substances. Results are shown in Tables 12-14.

[00263] The lyophilized product shows good stability when stored at 5 °C with only minor changes in HPLC assay or HPLC distribution. (see Tables 12A and B). As temperature increases (See Tables 13 and 14), there is a decrease in Factor B₀ with a corresponding increase in MAG. The other factors do not appear to be affected by temperature. The product appearance and pH do not appear to be affected by temperature. It is also not possible to determine a clear trend in reconstitution time, considering that the visual inspection of the solubilized product can require some seconds.

50

Table 12A. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 149570 at 5 °C (lyophilized, mannitol, pH 3.5)

TEST	TIME (MONTHS)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	97.3	99.8	100.7	100.2	100.0	100.2	99.3	104.4
Component Distribution								
(A ₀ + A ₁)	3.6	3.6	3.6	3.7	3.6	3.6	3.7	3.7
B ₀	79.4	79.6	80.3	80.1	80.0	80.1	80.0	81.3
Post B ₀ *	12.8	12.3	11.3	11.6	11.6	11.7	11.6	10.6
Degradants								
MAG	0.6	0.6	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7
Reconstitution Time	90	45	40	45	40	40	41	66
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter								
Particles ≥10 microns	—	—	—	—	—	—	—	—
Particles ≥25 microns	—	—	—	—	—	—	—	—
Moisture	0.8	1.4	1.2	nd	1.1	1.6	1.5	1.3
pH of Reconstituted Solution	3.7	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4	3.4	3.5
Sterility	Sterile	—	—	—	Sterile	—	Sterile	Sterile

— Not tested at this time point, per stability protocol.

* Analysis performed with development HPLC method. Dalbavancin B₁ and B₂ were not resolved with this method.

Table 12B. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 442378 at 5 °C (lyophilized, mannitol, pH 3.5)

TEST	TIME (MONTHS)					
	0	3	6	9	12	18
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	101.8	102.9	100.8	99.9	101.4	99.4
Component Distribution						
(A ₀ + A ₁)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
B ₀	85.7	85.5	85.6	85.3	85.3	85.5
(B ₁ + B ₂)	5.5	5.8	5.6	5.7	6.2	5.7
Degradants						
MAG	1.7	1.8	1.6	1.7	1.7	1.9
Maximum Individual Unspecified	n.d.	n.d.	0.1	n.d.	n.d.	n.d.
Total Degradants	1.7	1.8	1.8	1.7	1.7	1.9
Reconstitution Time	75	46	43	43	32	32
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter						
Particles ≥10 microns	Meets USP	—	—	—	Meets USP	—
Particles ≥25 microns	Meets USP	—	—	—	Meets USP	—
Moisture	0.3	0.3	0.4	0.7	0.4	0.6
pH of Reconstituted Solution	3.4	3.4	3.4	3.2	3.4	3.3
Sterility	Sterile	—	—	—	Sterile	—

n.d. Not detected

— Not tested at this time point, per stability protocol.

Table 13A. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 149570 at 25 °C/ 60% RH (lyophilized, mannitol, pH 3.5)

TEST	TIME (MONTHS)					
	0	1	3	6	9	12
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	97.3	99.4	98.3	100.3	99.7	98.7
Component Distribution						
(A ₀ + A ₁)	3.6	3.7	3.6	3.6	3.6	3.7
B ₀	79.4	81.0	79.3	80.0	79.7	78.9
Post B ₀ *	12.8	10.6	12.1	11.1	10.9	11.6
Degradants						
MAG	0.6	0.8	1.1	1.3	1.8	1.8
Reconstitution Time	90	50	45	45	30	40
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter						
Particles ≥10 microns	—	—	—	—	—	—
Particles ≥25 microns	—	—	—	—	—	—
Moisture	0.8	nd	1.6	1.4	nd	1.6
pH of Reconstituted Solution	3.7	3.6	3.6	3.5	3.5	3.5
Sterility	Sterile	—	—	—	—	Sterile

— Not tested at this time point, per stability protocol.

* Analysis performed with development HPLC method. Dalbavancin B₁ and B₂ were not resolved with this method.

Table 13B. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 442378 at 25 °C/ 60% RH (lyophilized, mannitol, pH 3.5)

TEST	TIME (MONTHS)					
	0	3	6	9	12	18
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	101.8	103.9	100.2	98.6	100.7	98.0
Component Distribution						
(A ₀ + A ₁)	2.5	2.5	2.4	2.5	2.4	2.5
B ₀	85.7	85.0	85.5	84.4	84.3	83.9
(B ₁ + B ₂)	5.5	5.8	5.4	5.7	6.1	5.6
Degradants						
MAG	1.7	2.3	2.4	2.8	2.9	3.5
Maximum Individual Unspecified	n.d.	n.d.	0.2	n.d.	n.d.	0.1
Total Degradants	1.7	2.3	2.5	2.8	2.9	3.6
Reconstitution Time	75	45	38	33	25	31
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter						
Particles ≥10 microns	Meets USP	—	—	—	Meets USP	—
Particles ≥25 microns	Meets USP	—	—	—	Meets USP	—
Moisture	0.3	0.7	0.6	0.7	0.7	0.8
pH of Reconstituted Solution	3.4	3.4	3.4	3.3	3.4	3.4
Sterility	Sterile	—	—	—	Sterile	—

n.d. Not detected

— Not tested at this time point, per stability protocol.

Table 13C. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 442378 at 30 °C/ 65% RH (lyophilized, mannitol, pH 3.5)

TEST	TIME (MONTHS)					
	0	1	3	6	9	12
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	100.0	98.5	99.7	100.0	95.3	96.8
Component Distribution						
(A ₀ + A ₁)	2.5	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
B ₀	86.3	85.6	84.7	84.3	83.2	83.0
(B ₁ + B ₂)	5.5	5.5	5.7	5.9	6.3	5.6
Degradants						
MAG	1.7	2.1	2.5	3.0	3.5	4.2
Maximum Individual Unspecified	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
Total Degradants	1.8	2.3	2.9	3.3	3.8	4.5
Reconstitution Time	45	55	31	27	46	26
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter						
Particles ≥10 microns	Meets USP	—	—	—	—	—
Particles ≥25 microns	Meets USP	—	—	—	—	—
Moisture	0.5	0.7	0.9	0.7	0.9	0.9
pH of Reconstituted Solution	3.5	3.6	3.3	3.4	3.3	3.3
Sterility	Sterile	—	—	—	—	—

— Not tested at this time point, per stability protocol.

Table 14A. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 149570 at 40 °C/ 75% RH (lyophilized, mannitol, pH 3.5)

TEST	TIME (MONTHS)			
	0	1	3	6
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	97.3	98.6	94.7	95.1
Component Distribution				
(A ₀ + A ₁)	3.6	3.7	3.5	3.5
B ₀	79.4	79.8	77.1	76.5
Post B ₀ *	12.8	10.5	11.9	10.7
Degradants				
MAG	0.6	2.0	3.7	5.5
Reconstitution Time	90	55	45	40
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter				
Particles ≥10 microns	—	—	—	—
Particles ≥25 microns	—	—	—	—
Moisture	0.8	n.d.	2.0	1.7
pH of Reconstituted Solution	3.7	3.5	3.6	3.5
Sterility	Sterile	—	—	—

— Not tested at this time point, per stability protocol.

* Analysis performed with development HPLC method. Dalbavancin B₁ and B₂ were not resolved with this method.

53

Table 14B. Stability of Dalbavancin for Injection Lot 442378 at 40 °C/ 75% RH (lyophilized, mannitol, pH 3.5)

TEST	TIME (MONTHS)			
	0	1	3	6
Physical Appearance	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid	White to off white to pale yellow solid
HPLC Assay	101.8	101.5	98.6	91.8
Component Distribution				
(A ₀ + A ₁)	2.5	2.4	2.4	2.2
B ₀	85.7	84.2	82.0	80.6
(B ₁ + B ₂)	5.5	5.8	5.6	5.2
Degradants				
MAG	1.7	3.2	5.3	6.6
Maximum Individual Unspecified	n.d.	0.3	0.2	0.5
Total Degradants	1.7	3.8	5.6	7.4
Reconstitution Time	75	46	46	41
Appearance of Solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution	Clear to pale yellow solution
Particulate Matter				
Particles ≥10 microns	Meets USP	—	—	—
Particles ≥25 microns	Meets USP	—	—	—
Moisture	0.3	0.6	0.8	0.8
pH of Reconstituted Solution	3.4	3.4	3.4	3.4
Sterility	Sterile	—	—	—

n.d. Not detected

— Not tested at this time point, per stability protocol.

Photostability

[00264] Dalbavancin for injection (500 mg vials) were also evaluated for photostability in labeled vials. Ten labeled vials were introduced into a photostability chamber, along with a dark control consisting of ten labeled vials wrapped with aluminum foil. The test samples were exposed to not less than 1.2 million lux hours and an integrated near ultraviolet energy of not less than 200 watt hours/meter². Samples were evaluated for appearance, appearance of solution, pH, moisture, and HPLC assay. Results of this evaluation are presented in Table 15.

TABLE 15. Immediate Pack Photostability Results for 500 mg/vial Drug Product

Test	Results	
	Light Exposed	Dark Control
Appearance	White to off-white solid	White to off-white solid
Appearance of Solution	Pale yellow solution	Pale yellow solution
Assay (anhydrous, free base)	91.8%	92.8%
Moisture Content	0.3%	0.3%
pH	4.5	4.5
Reconstitution Time (sec)	43	68
Component Distribution (%AUC)		
– A ₀	0.7%	0.7%
– A ₁	1.7%	1.8%
– B ₀	86.0%	86.2%
– B ₁	4.2%	4.3%
– B ₂	1.9%	2.0%
Related Substances (%AUC)		
– C ₀	0.3%	0.3%
– C ₁	0.1%	0.1%
– D ₀	0.2%	0.2%
– D ₁	0.3%	0.3%
– IsoB ₀	0.9%	1.0%
– MAG	1.2%	1.1%
– Trichloro	0.5%	0.5%
– RRT 0.85	0.1%	n.d.
Total Impurities (%AUC)	5.4%	5.0%

n.d. not detected

[00265] Comparison of the light exposed and dark control samples shows that the light exposed samples remain comparable, with slight changes in potency, API component levels, and total impurities.

[00266] The light exposed samples demonstrated the presence of a very low level of an unspecified impurity at RRT 0.85, which was not detected in the dark control samples. Evaluation of this component by HPLC/MS has indicated that it is the mono-chlorinated derivative of the dalbavancin B homologues.

[00267] Based on these results, Dalbavancin for Injection is considered photostable in its immediate pack.

54

Improved efficacy and reduced side effects

[00268] Weekly dosing of dalbavancin at high dosage levels (*i.e.*, resulting in surprising high and long-lasting serum levels) shows a surprisingly good safety profile, similar to, or better than, that observed with the standard therapy of lower doses of conventional antibiotics administered daily or even 2-4 times daily, as demonstrated by the Examples herein. A surprisingly high dosage (*i.e.*, resulting in surprising high and long-lasting serum levels) of dalbavancin may be administered, with less frequency than other antibiotics, and without adverse side effects, enabling improved efficacy and patient compliance.

[00269] As discussed in Example 1, treatment with dalbavancin results in a low incidence of adverse events. Serious adverse events include any adverse drug experience occurring at any dose that results in death, is life-threatening, results in hospitalization or prolongation of existing hospitalization, or persistent or significant disability or incapacity. In the Phase II trial described in Example 1, 90% of adverse reactions, such as diarrhea, nausea, hyperglycemia, limb pain, vomiting, and constipation, were mild to moderate in severity. Use of dalbavancin in the trial in Example 1 resulted in no serious adverse events related to study drug treatment.

Kits

[00270] The invention also provides kits for use in methods of treatment or prophylaxis of bacterial infections. The kits include a pharmaceutical composition of the invention, for example including at least one unit dose of dalbavancin, and instructions providing information to a health care provider regarding usage for treating or preventing a bacterial infection. Instructions may be provided in printed form or in the form of an electronic medium such as a floppy disc, CD, or DVD, or in the form of a website address where such instructions may be obtained. Often, a unit dose of dalbavancin includes a dosage such that when administered to an individual, a therapeutically or prophylactically effective plasma level of dalbavancin is maintained in the individual for at least 5 days. In some embodiments, a kit includes two unit dosages to be administered at least 5 days apart, often about one week apart, often including a first dosage of dalbavancin that is about 1.5 to about 3 times higher than the second dosage. Dalbavancin is often included as a sterile aqueous pharmaceutical composition or dry powder (*e.g.*, lyophilized) composition.

[00271] Suitable packaging is provided. As used herein, "packaging" refers to a solid matrix or material customarily used in a system and capable of holding within fixed limits a dalbavancin composition suitable for administration to an individual. Such materials include glass and plastic

(e.g., polyethylene, polypropylene, and polycarbonate) bottles, vials, paper, plastic, and plastic-foil laminated envelopes and the like. If e-beam sterilization techniques are employed, the packaging should have sufficiently low density to permit sterilization of the contents.

[00272] Kits may also optionally include equipment for administration of dalbavancin, such as, for example, syringes or equipment for intravenous administration, and/or a sterile solution, e.g., a diluent such as 5% dextrose, for preparing a dry powder (e.g., lyophilized) composition for administration.

[00273] Kits of the invention may include, in addition to dalbavancin, a non-dalbavancin antibiotic or mixture of non-dalbavancin antibiotics, for use with dalbavancin as described in the methods above.

[00274] In the examples below, the following abbreviations have the following meanings. If an abbreviation is not defined, it has its generally accepted meaning.

AcOH	=	acetic acid
AcONa	=	sodium acetate
aq.	=	aqueous
AST	=	aspartate amino transferase
ALT	=	alanine amino transferase
BV	=	bed volume
CV	=	coefficient of variation
d	=	diameter
D	=	dalton
DCC	=	dicyclohexylcarbodiimide
DMEPA	=	3-(dimethylamino)-propylamine
DMSO	=	dimethyl sulfonyl fluoride
eq	=	equivalents
EU	=	endotoxin units
g	=	gram
GC	=	gas chromatography
HCl	=	hydrochloric acid
H ₂ O	=	water
HOBT	=	1-hydroxybenzotriazole hydrate
HPLC	=	high performance liquid chromatography
H ₂ SO ₄	=	sulfuric acid
IPA	=	isopropylamine
IU	=	international unit
KF	=	potassium fluoride
Kg	=	kilogram
L	=	liter
LC/MS/MS	=	liquid chromatography/mass spec/mass spec
LDH	=	lactate dehydrogenase

A
SS

LSC	=	liquid scintillation counting
m ³	=	cubic meter
MeOH	=	methanol
mg	=	milligram
mL	=	milliliter
mol	=	molar
MW	=	molecular weight
N	=	normal
NaOH	=	sodium hydroxide
NMP	=	N-methyl-2-pyrrolidone
QTD	=	quantitative tissue distribution
R _t	=	retention time
sd	=	standard deviation
TEA	=	triethylamine

[00275] The following examples are intended to illustrate but not limit the invention.

EXAMPLES

Example 1. Efficacy and Safety of Once Weekly Dalbavancin In Deep Skin and Soft Tissue Infections

[00276] This randomized, controlled study evaluated the safety and efficacy of two dose regimens of dalbavancin. Adult patients with skin and soft tissue infections (SSTI) involving deep skin structures or requiring surgical intervention were randomized to three groups: Study arm 1 received 1100 mg of dalbavancin via intravenous injection (IV) on day 1; Study arm 2 received 1g of dalbavancin IV on day 1 and 500 mg of dalbavancin IV on day 8; Study arm 3 received "standard of care." Clinical and microbiological response and adverse events were assessed.

Populations for analysis

[00277] There were 62 patients randomized into the study; all received at least one dose of study medication. Four study populations were evaluated for safety and efficacy and were defined as follows: The intent-to-treat (ITT) population included all patients who received at least one dose of study drug (all randomized study subjects). The microbiological intent-to-treat (MITT) population were all ITT patients who had a culture-confirmed Gram-positive pathogen at baseline. The clinically-evaluable population were defined as those who 1) fulfilled all study entry criteria, 2) had no change in antimicrobial therapy for Gram-positive infection following Day 4, except for oral step-down therapy (only applied to standard of care group), 3) returned for the follow-up (FU) assessment visit (unless a treatment failure), and 4) did not receive a non-protocol approved

concomitant antimicrobial (unless a treatment failure). The microbiologically-evaluable population was the subset of clinically-evaluable patients who had a culture-confirmed Gram-positive pathogen at baseline.

[00278] The study populations are shown in Table 16.

Table 16. Study Populations for Dalbavancin SSTI Treatment

Populations	Study arm 1 Dalbavancin 1100mg day 1	Study arm 2 Dalbavancin 1000mg day 1, 500mg day 8	Study arm 3 "Standard of care"
Randomized ITT	20	21	21
Treated	20 (100%)	21 (100%)	21 (100%)
Completed Study	18/20 (90%)	20/21 (95.2%)	21/21 (100%)
Clinically eval at EOT	16/20 (80%)	17/21 (81%)	21/21 (100%)
Clinically eval at FU	13/20 (65%)	17/21 (81%)	21/21 (100%)
MITT	14/20 (70%)	13/21 (61.9%)	14/21 (66.7%)
Micro eval at EOT	13/20 (65%)	11/21 (52.4%)	14/21 (66.7%)
Micro eval at FU	11/20 (55%)	11/21 (52.4%)	14/21 (66.7%)

ITT - intent-to-treat

MITT - subset of ITT population with culture confirmed Gram-positive infection

EOT - end of treatment

FU - follow up

[00279] The median age of the subjects was 50-55 years (range 18-86 years). There were no apparent differences in age across the treatment arms. There were differences in gender across treatment arms, but overall the study enrolled equal numbers of men and women. The patient population was predominantly Caucasian. These results were consistent for both the ITT and clinically evaluable populations.

[00280] 62 patients were enrolled, 20 in Study arm 1 and 21 each in Study arms 2 and 3. The most common comparators for standard of care were clindamycin, ceftriaxone, vancomycin and cefazolin. Mean duration of treatment in Study arm 3 was 15 days.

5b

Baseline pathogens and susceptibility

[00281] Of the 62 ITT patients, 66% (14 single-dose dalbavancin, 13 two-dose dalbavancin, 14 standard of care) had a pretherapy Gram-positive pathogen isolated (MITT population). The most common pathogen was *S. aureus*. The distribution of pathogens at baseline is shown in Table 17.

Table 17. Baseline Gram-positive Pathogens and Dalbavancin MIC Range for the MITT Population

Number with Pathogen (MIC)	Single dose Dalbavancin (1100 mg) (N=14)	Two-dose Dalbavancin (1000/500 mg) (N=13)	Standard of Care Regimens (N=14)
All <i>S. aureus</i>	13 (0.12)	11 (0.12)	10 (0.016-0.25)
Methicillin-sensitive	7	6	8
Methicillin-resistant	6	5	2
Group B streptococcus	0	2 (0.016)	2 (0.016)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	1 (0.016)	1 (0.016)
Miscellaneous <i>Streptococcus</i> and nontypeable strains	3 (0.016)	2 (0.016)	4 (0.016)

Clinical and microbiological responses

[00282] The effectiveness of the three treatment regimens was determined by assessing the patients' clinical response and the documented or presumed microbiological responses. The primary efficacy endpoint was clinical response at the follow-up visit for the clinically evaluable population. Clinical response, for both EOT and FU visits, was categorized as success (cure or improvement) or failure (including indeterminate results). Patients classified as successes must not have received additional systemic antibacterial treatment for their infection. Failure was defined as persistence of one or more local or systemic signs and symptoms of SSTI such that treatment with new or additional systemic antibacterial agents was required for the SSTI.

[00283] Microbiological outcome, a secondary efficacy variable, was assessed in the subpopulation of patients who had microbiologically documented SSTI (*i.e.*, at least one identified baseline pathogen). A microbiologic response was assessed for each Gram-positive pathogen identified at baseline (*i.e.*, eradication, presumed eradication, persistence, presumed persistence).

For patients for whom follow-up cultures were not performed, the microbiologic responses for baseline pathogens were presumed on the basis of the clinical response. Microbiologic response by patient at the EOT and FU visits was graded as success (*i.e.*, all Gram-positive organisms eradicated or presumed eradicated) or failure (*i.e.*, at least one Gram-positive organism persisted or presumed to have persisted, multiple pathogens with partial eradication). At both the EOT and FU visits, colonization and superinfection were assessed. At the FU visit, a patient's bacteriological response could also include recurrence.

Clinical efficacy

[00284] Clinical success rates are shown in Table 18. In the clinically-evaluable population, 61.5% of patients in the single-dose dalbavancin, 94.1% in the two-dose dalbavancin, and 76.2% in the standard of care group were classified as successes at the time of the FU assessment. In an exploratory subanalysis of those patients categorized with deep or complicated SSTI at baseline, two-dose dalbavancin therapy also provided a higher clinical success rate (93.8%), compared with the single-dose dalbavancin and standard of care therapies, 58.3% and 73.7%, respectively.

[00285] Similar success rates at both the EOT and FU assessments were found in the supportive ITT and microbiologically-evaluable populations with a consistent trend towards a more favorable response following treatment with two-dose dalbavancin (Table 17). For the MITT population, clinical success rates at the FU assessment for those with methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) were 50% (3/6) for single-dose dalbavancin, 80% (4/5) for two-dose dalbavancin, and 50% (1/2) for patients treated with a standard of care regimen.

Table 18. Clinical Success Rates by Analysis Population and Treatment Group

Population	Single-dose (1100 mg) Dalbavancin	Two-dose (1000/500 mg) Dalbavancin	Standard of Care Regimens
ITT at EOT	13/20 (75.0)	19/21 (90.5)	17/21 (81.0)
ITT at FU	12/20 (60.0)	19/21 (90.5)	16/21 (76.2)
MITT at EOT	10/14 (71.4)	12/13 (92.3)	10/14 (71.4)
MITT at FU	7/14 (50.0)	12/13 (92.3)	9/14 (64.3)
Clinically evaluable at EOT	13/16 (61.5)	16/17 (94.1)	17/21 (81.0)
Clinically evaluable at FU	8/13 (61.5)	16/17 (94.1)	16/21 (76.2)
Microbiologically evaluable at EOT	10/13 (76.9)	10/11 (90.9)	10/14 (71.4)
Microbiologically evaluable at FU	6/11 (54.5)	10/11 (90.9)	9/14 (64.3)

Microbiologic efficacy

[00286] The success rates of the different treatment regimes with respect to different pathogens is shown in Table 19. For the microbiologically-evaluable population, eradication/presumed eradication rates at the FU assessment for all organisms were 58.3% (7/12) for single-dose dalbavancin, 92.3% (12/13) for two-dose dalbavancin, and 70.6% (12/17) for patients in the standard of care group. For isolates that persisted, there was no change in dalbavancin MIC. At FU, *S. aureus* eradication rates were higher for the two-dose dalbavancin group (90%) compared with single-dose dalbavancin (50%) and standard of care (60%) treatments. Similar findings were observed for the MITT population; two-dose dalbavancin eradicated 80% of MRSA isolates (Table 19).

Table 19. Success Rates by Pathogen for Microbiologically ITT Population at FU Assessment

	Single-dose (1100 mg) Dalbavancin	Two-dose (1000/500 mg) Dalbavancin	Standard of Care Regimens
Total organisms	7/16 (43.8%)	14/16 (87.5%)	12/17 (70.6%)
All <i>S. aureus</i>	5/13 (38%)	9/11 (82%)	6/10 (60%)
Methicillin-sensitive	2/7 (29%)	5/6 (83%)	5/8 (63%)
Methicillin-resistant	3/6 (50%)	4/5 (80%)	1/2 (50%)
Miscellaneous streptococcus species	2/3 (67%)	4/4 (100%)	5/7 (71%)

[00287] For the microbiologically-evaluable and MITT populations, the microbiological success rates at EOT and FU are summarized in Table 20. Comparable microbiologic success rates were reported at both visits for patients treated with two-dose dalbavancin and standard of care regimens (approximately 64% to 77%), whereas those given a single dose of dalbavancin had lower rates of success (<40%). The microbiologic success rates at EOT/FU in the microbiologically-evaluable population paralleled clinical response findings: 38.5%/27.3% for single-dose dalbavancin, 72.7%/72.7% for two-dose dalbavancin, and 71.4%/64.3% for standard of care therapy. Similar findings were observed for the MITT population (data not shown).

Table 20. Microbiologic Success Rates

	Single-dose (1100 mg) Dalbavancin	Two-dose (1000/500 mg) Dalbavancin	Standard of Care Regimens
ITT population			
EOT	5/14 (35.7)	10/13 (76.9)	10/14 (71.4)
FU	3/14 (21.4)	9/13 (69.2)	9/14 (64.3)
Microbiologically evaluable population			
EOT	5/13 (38.5)	8/11 (72.7)	10/14 (71.4)
FU	3/11 (27.3)	8/11 (72.7)	9/14 (64.3)

Pharmacokinetic analysis

[00288] For patients randomized to the dalbavancin treatment groups, 5 ml of blood was obtained on Day 8 for determination of dalbavancin plasma concentrations. For patients randomized to receive a 500 mg dalbavancin dose on Day 8, blood was obtained just prior to administration of the second dose. Additional 5 ml blood samples were obtained on Days 10 and 24 for patients were randomized to the single-dose dalbavancin group and on Days 20 and 34 for those who received two doses of dalbavancin.

[00289] Dalbavancin plasma concentrations were determined using validated liquid chromatography and mass spectrophotometer methods. The lower limit of quantitation was 500 ng/ml for plasma.

[00290] Mean dalbavancin concentrations collected on Study days 8, 10, and 24 in the single-dose regimen were 31.1 ± 7.1 , 25.2 ± 4.8 , and 10.2 ± 3.5 mg/l (mean $\pm$ SD), respectively. Dalbavancin concentrations following the two-dose regimen on Study days 8 (prior to the second dose), 20, and 34 were 30.4 ± 8.2 , 21.2 ± 10.0 , and 9.0 ± 4.4 mg/l, respectively. As expected, all patients had dalbavancin concentrations of greater than 20 mg/l through the first week following the first dose, and levels above 20 mg/l were maintained for an additional week with an additional dose of 500 mg IV on day 8. Generally, minimum bactericidal concentrations are about 4 to 10 mg/l.

Safety evaluation

[00291] Each patient who received at least one dose of study drug (ITT population) was evaluated for drug safety through monitoring of adverse events (AE), including abnormal clinical laboratory test results and vital signs. AE were rated by the investigator as to their severity (mild, moderate, severe, life-threatening), and by the relationship to the study drug (not related, unlikely related, possibly related, or probably related).

[00292] A summary of the AE data is presented in Table 21. The majority of adverse reactions (90%) were considered mild to moderate in severity. All serious adverse reactions (8 events in 5 patients) were unrelated to study drug treatment. Approximately 59% of all patients who reported at least one treatment-emergent AE (19 single-dose dalbavancin, 16 two-dose dalbavancin, 21 standard of care) experienced an event that was categorized by the investigator as possibly or probably related to study drug. Specifically, drug-related AEs were reported in 11 (55%) single-dose dalbavancin, 10 (48%) two-dalbavancin, and 12 (57%) standard of care patients. The most frequently reported drug-related AE in both the dalbavancin and standard of care treatment groups were diarrhea and nausea. A summary of types of AEs observed for the different treatment groups is presented in Table 22.

[00293] No dalbavancin-treated patient discontinued treatment prematurely due to an AE. Three of 21 (14%) patients on a standard of care regimen discontinued treatment prematurely due to an AE, including one patient who developed urticaria on Day 1 which was probably drug related and two patients who had AE unrelated to study drug (superinfection with *P. aeruginosa* and elevated vancomycin trough level).

Table 21. Summary of Adverse Event (AE) Data

	Single-dose dalbavancin (N=20)	Two-dose dalbavancin (N=21)	Standard of care (N=21)
≥ 1 AE	95%	76.2%	100%
%AE severe	15%	9.5%	4.8%
≥ 1 AE possibly/probably related to treatment	55%	48%	57%
AE leading to discontinuation of study medication	0	0	14.3%
≥ 1 severe AE	2 (10%)	2 (9.5%)	1 (4.8%)

Table 22. Most Common Adverse Events

	Single-dose dalbavancin (N=20)	Two-dose dalbavancin (N=21)	Standard of care (N=21)
Diarrhea	20%	9.5%	28.6%
Nausea	10%	28.6%	9.5%
Hyperglycemia	5%	14.3%	19%
Limb Pain	10%	9.5%	9.5%
Vomiting	10%	14.3%	4.8%
Constipation	5%	4.8%	14.3%

Discussion

[00294] This open-label, randomized Phase II trial shows that dalbavancin is effective for the treatment of adults with SSTI. The majority of enrolled patients had deep or complicated infections (>90%) and infections that required surgical intervention (~70%), while approximately 45% had underlying diabetes mellitus.

[00295] Two weekly doses of dalbavancin had a numerically higher clinical response rate than either a single-dose of dalbavancin or the standard of care regimen. Data from both ITT and clinically-evaluable populations suggests that a regimen of two sequential weekly injectable doses of dalbavancin (1000 mg, 500 mg weekly) is effective in the treatment of SSTIs. The standard of care group was treated for a median duration of 13 days. At follow-up, 94% of clinically-evaluable patients treated with two-dose dalbavancin were considered clinical successes versus 76% of those given a standard of care regimen and 61.5% of patients receiving single-dose dalbavancin.

[00296] *S. aureus* was the most frequently isolated organism at baseline. In this trial, approximately 83% of patients were infected with *S. aureus* and 38% of all *S. aureus* strains were MRSA. Most infections (80%) were caused by a single pathogen. The MICs for dalbavancin against Gram-positive isolates, including MRSA, ranged from 0.016 to 0.25 mg/L.

[00297] Microbiological success rates paralleled those of clinical response for the clinically-evaluable population. For all organisms combined, treatment with the two-dose weekly dalbavancin regimen provided higher eradication rates at the 2 week post-therapy assessment (92%) compared with single-dose dalbavancin (58%) and standard of care therapies (71%). Overall, rates of *S. aureus* eradication were observed in 90%, 50%, and 60% of patients, respectively. For the MITT population, rates of eradication for MRSA were 80% for the two-dose dalbavancin regimen versus 50% for both the single-dose dalbavancin and standard of care therapies.

27
97
A

[00298] Concentrations of dalbavancin obtained at the end of the single-dose and two-dose weekly treatment periods (Day 10 or Day 20, respectively) were similar suggesting little drug accumulation following the second weekly dose. The higher rate of clinical success observed with the two-dose regimen is suggestive of time-dependent killing wherein sustained levels of drug or drug exposure were provided with two doses of dalbavancin separated by one week. Dalbavancin plasma levels measured at the end of the weekly dosing interval were substantially greater than the reported MIC₉₀ for pathogens responsible for the majority of SSTIs (<0.03 to 0.5 mg/L), including those found in this trial. These levels were also above the minimum bactericidal concentrations of 4 to 10 mg/l.

[00299] The overall rate of adverse reactions was similar for both dalbavancin regimens and the standard of care group. Gastrointestinal drug-related adverse events (*i.e.*, diarrhea and nausea) were most commonly reported across the three treatment groups. The majority of these events were mild and self-limited. No dalbavancin-treated patient was withdrawn from the study early due to an adverse reaction, nor were any serious adverse events attributable to the glycopeptide reported, yet 14% of the standard of care group withdrew due to adverse effects. The novel dosage regimen thus had reduced adverse side effects in comparison to the standard of care. The data from this trial found no evidence that dalbavancin induces any degree of clinically significant hepatotoxicity or nephrotoxicity.

[00300] The two-dose dalbavancin regimen appears effective for treatment of patients with complicated SSTIs. Dalbavancin at both doses was well tolerated in this clinical trial, with an adverse event profile similar to that of the standard of care group.

Example 2. Efficacy and Safety of Once Weekly Dalbavancin in the Treatment of Catheter-Related Blood Stream Infection (CR-BSI)

[00301] This study evaluated the safety and efficacy (clinical and microbiological) of a weekly dosing regimen of dalbavancin in the treatment of adults with catheter-related blood stream infection (CR-BSI) due to gram-positive bacterial pathogens, relative to the standard care of treatment, vancomycin.

Methodology

[00302] Patients with CR-BSI due to suspected or known Gram-positive pathogen(s) who met the inclusion/exclusion criteria were randomized to one of two treatment arms in this open-label,

comparative, multi-center study. Dalbavancin was administered once weekly in weekly dalbavancin and comparator (vancomycin) was administered daily in vancomycin. Catheter removal was required for patients with *Staphylococcus aureus* infection; catheter management was left to the Investigator's discretion for patients with coagulase-negative staphylococci (CoNS) infection. Efficacy was clinically based on the improvement or resolution of clinical signs and symptoms of CR-BSI such that no additional antibacterials were warranted, and microbiologically on the eradication or presence of the baseline or other pathogens. Safety and dalbavancin plasma concentrations were also evaluated.

Population for Analysis

[00303] Approximately 80 patients were planned (40 each for treatment arms 1 and 3); 67 patients were analyzed (33 in weekly dalbavancin and 34 in vancomycin). Seven (7) patients from daily dalbavancin were included in safety analyses only. Seventy-five (75) patients were randomized and 74 were treated at 13 sites in the United States; 64 patients completed the study. Demographic characteristics were generally similar across study arms. Mean age for patients in weekly dalbavancin was 54 years (range 20-78 years) and in vancomycin was 57 years (range 19-85 years). Males and females were equally represented overall; there were slightly more males in weekly dalbavancin and more females in vancomycin. Most patients were Caucasian (>65%), were categorized as having probable CR-BSI, and had non-tunneled catheters. For the microbiological ITT population, the most common pathogens for both treatment arms were CoNS and *S. aureus*. Of the *S. aureus* isolates, 5/11 (45.4%) and 9/12 (75.0%) were identified as methicillin-resistant (MRSA) for study arms 1 and 3, respectively.

Diagnosis and Main Criteria for Inclusion

[00304] Patients with documented Gram-positive bacteremia defined as at least one blood culture positive for *S. aureus*, or at least two positive blood cultures for all other organisms (with at least one of the cultures from a percutaneously drawn sample) were included. In addition, patients were also enrolled who met all other inclusion criteria, and also met each of the two conditions listed below:

1. At least two of the following signs of bacteremia: core temperature $>38.0^{\circ}\text{C}$ or $<36.0^{\circ}\text{C}$, measured rectally, orally (added 0.5°C to the measured temperature), tympanically or via a central catheter; WBC count $>12,000/\text{mm}^3$ or $<4,000/\text{mm}^3$ or differential count

showing >10% band forms; tachycardia (pulse rate >100 bpm); tachypnea (respiratory rate >20. breaths/minute); transient hypotension (systolic blood pressure <90 mm Hg)

2. No apparent source for the clinical manifestation of bacteremia other than the catheter (may have local signs and symptoms at the catheter site).

Treatment

[00305] The treatment lasted for 14 days for patients with *S. aureus* infection, and 7 to 14 days for all other pathogens. Because of the long half-life of dalbavancin, the duration of study drug therapy was assumed to be 7 days for each dose of dalbavancin given in weekly dalbavancin. Dalbavancin was administered intravenously with a 1000 mg loading dose on Day 1 and a 500 mg dose on Day 8. Vancomycin was administered intravenously with a 1000 mg dose every 12 hours (or dose-adjusted based on drug levels).

Criteria for Evaluation

[00306] Efficacy was evaluated based on clinical and microbiological responses. The primary outcome parameter was overall response at the test-of-cure (TOC) visit in the microbiological intent-to-treat (ITT) population. Safety was evaluated by the collection and analysis of data on adverse events (AEs), clinical laboratory tests, physical examinations, vital signs, and ECGs. Dalbavancin plasma concentrations were determined on up to seven occasions (prior to and after the first dose on Day 1, on Day 4 $\pm$ 2 days, before and after the second dose on Day 8, at end of treatment (EOT) and at TOC. Due to the elimination of arm 2 during the study, only demographic data and safety data from those patients are described; efficacy was not evaluated.

Statistical Methods

[00307] Efficacy, safety, and dalbavancin concentration data are presented using descriptive statistics. For the primary efficacy analysis, 95% confidence intervals were also determined, and for prognostic factor analyses using the primary efficacy variable, logistic regression was used.

Efficacy Results

[00308] For the primary efficacy analysis, overall response in the microbiological ITT population at TOC, patients who received dalbavancin in weekly dalbavancin (87.0%, 95% CI: 73.2, 100.0) had a higher success rate than patients who received vancomycin (50.0%, 95% CI: 31.5, 68.5).

[00309] For the secondary efficacy analyses, overall success, clinical success, and overall and clinical success by pathogen, by category of infection, by catheter status at baseline, and by type of catheter for the microbiological ITT and evaluable populations at EOT and TOC were higher in the dalbavancin study arm compared with the vancomycin study arm. By-patient microbiological success was similar for the treatment arms at EOT, but was higher for the dalbavancin study arm at TOC. For CoNS, by-pathogen microbiological success was greater in the dalbavancin study arm at both EOT and TOC. By EOT, most signs and symptoms at the catheter site were resolved for both study arms.

Safety Results

[00310] Adverse events (AEs) were reported by 71 patients (95.9%). The number of patients reporting AEs was similar across study arms, although more AEs were reported in the dalbavancin groups than in the vancomycin group.. The most common AEs were diarrhea, constipation, anemia, and hypotension. Most AEs were considered by the Investigator to be mild or moderate in intensity. Adverse events considered to be related (possibly or probably) to study drug were evenly distributed across study arms. One (1) patient (3%) in the dalbavancin study arm had an unrelated, non-serious AE that led to discontinuation of dalbavancin; no AEs led to withdrawal from the study. Three (3) patients (8.8%) in the vancomycin study arm had AEs that led to discontinuation of comparator; 2 AEs led to withdrawal from the study. The distribution of SAEs was similar among treatment groups; no SAE in the dalbavancin study arm and one SAE in the vancomycin study arm was considered to be related to study drug. There were 5 deaths in this study. All AEs that resulted in death were unrelated to study medication. There were no clinically meaningful laboratory abnormalities in any study arm. Few laboratory values were reported as AEs. None were SAEs or led to discontinuation of study drug.

[00311] Increased diastolic blood pressure was the most common abnormal clinically significant change across all treatment groups. Hypertension was reported as an AE for 3/74 patients (4.1%, 2 patients on dalbavancin, 1 patient on vancomycin); only 1 patient (receiving dalbavancin) had increased blood pressure as an AE considered related to study medication. Dalbavancin did not exhibit any impact on heart rate, atrioventricular conduction or intra-ventricular conduction. The average difference of effect on QTc values was 7 msec greater for the dalbavancin group in comparison with the vancomycin group. No significant difference was observed between treatments for frequency of outliers during drug therapy.

[00312] Therefore, dalbavancin given as an initial IV dose of 1000 mg followed 1 week later by a second IV dose of 500 mg appears well tolerated and highly effective for the treatment of CR-BSI caused by Gram-positive pathogens, with superior response rates to vancomycin

Example 3. Pharmacokinetics and Renal Excretion of Dalbavancin in Healthy Subjects

[00313] The primary objectives of this study were to characterize the pharmacokinetics of dalbavancin and to calculate the extent of renal excretion in healthy subjects receiving a therapeutic dose of the drug. This was an open label, non-comparative, study.

Study drug treatment

[00314] Healthy male or female subjects between 18 and 65 years of age were administered a single 1000 mg IV dose of dalbavancin infused over 30 minutes.

[00315] Six subjects, one female and five male, were enrolled, received study medication, and completed all aspects of the study. Three subjects were Caucasian and three subjects were African-American. Mean age was 29.8 years (range 22 to 63). Mean height was 68.6 inches (range 63 to 75) and mean weight was 179.6 lbs (140 to 244).

Pharmacokinetics

[00316] Blood and urine (24-hr collections) were collected on study days 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, and 42. Blood samples were drawn into heparinized tubes and centrifuged. Plasma was separated and stored frozen at -20°C until time of assay. Plasma and urine samples were assayed for dalbavancin using validated LC/MS/MS methods. The lower limit of quantitation of the assay was 500 ng/mL for urine and plasma.

[00317] Dalbavancin pharmacokinetic parameters were estimated by non-compartmental methods using the WinNonlin™ software (Pharsight Corporation). The peak concentration (C_{max}) values were obtained directly from the observed data. The area under the plasma concentration-time curve (AUC) was calculated using the linear trapezoidal rule. Clearance (CL) was computed as dose/AUC. The elimination half life ($t_{1/2}$) was estimated by linear regression of the log-linear portion of the log concentration versus time curve. Estimates of the volume of distribution (V_z) was calculated using the regression parameters, while the volume of distribution at steady state (V_{ss}) was calculated from the area under the first moment curve (AUMC) multiplied by the dose

and divided by AUC. The cumulative amount of dalbavancin excreted in urine was determined as the integrand of the urine excretion rate (AURC). CL_R , or renal clearance, was calculated as the ratio: $CL_R = AURC/AUC$.

[00318] Plasma concentrations of dalbavancin versus time are shown for all subjects in Figure 5. Pharmacokinetic parameters are presented in Table 23. Concentrations were similar across all subjects. Peak plasma concentrations were approximately 300 mg/L and were achieved immediately following the end of infusion. Dalbavancin shows an apparent volume of distribution of more than 10 L and is assumed to be well distributed in the extracellular fluid.

[00319] Dalbavancin was slowly eliminated with a $t_{1/2}$ of 9-12 days. The total drug clearance was 0.0431 ± 0.0074 L/hr. The estimated fraction of drug excreted unchanged into urine was 42% of the administered dose, and renal clearance was estimated as 0.018 L/h. The variability observed across subjects was low with a coefficient of variation of less than 22% across all pharmacokinetic parameters.

Table 23. Pharmacokinetic parameters

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

Safety assessments

[00320] Adverse events were recorded and assessed for severity and relationship to study drug. Laboratory data (chemistry panel, CBC with differential, urinalysis) were collected and assessed for changes from baseline and out-of-range values. ECG, physical examination, and vital signs were obtained, and changes from baseline were assessed.

[00321] Dalbavancin was well-tolerated in this study. No subject deaths or serious adverse events were reported during this study and no subject was prematurely withdrawn from study due to an AE.

[00322] All volunteers reported at least one AE, all of mild intensity. Three volunteers reported AEs that were possibly related to study medication: elevated ALT (value 46 IU/L, upper limit of

62

normal 40 IU/L) in one subject; eosinophilia (value $0.5 \times 10^3/\mu\text{L}$, upper limit of normal $0.4 \times 10^3/\mu\text{L}$), elevated LDH (value 303 IU/L, upper limit of normal 90 IU/L), elevated ALT (value 54 IU/L, upper limit of normal 40 IU/L), elevated AST (value 42 IU/L, upper limit of normal 40 IU/L) all in one subject; and tinnitus in one subject.

[00323] No trends were seen for post-baseline hematology, chemistry, vital signs, and ECG results.

Discussion

[00324] A single 1000 mg IV dose of dalbavancin was well-tolerated. Following a single intravenous infusion of 1000 mg, plasma concentrations of dalbavancin above 45 mg/l are maintained for at least seven days. This is above concentrations known to be bactericidal (4-32 mg/l). This supports the use of dalbavancin as a once-weekly regimen. The urinary elimination profile indicates that renal excretion is an important elimination pathway, with approximately 40% excreted in urine. This finding is consistent with observations in animals. Since the kidneys are not the exclusive elimination route, a dosing adjustment for dalbavancin may not be necessary in renally impaired patients.

Example 4. Pharmacokinetics of Dalbavancin Subjects with Renal Impairment

[00325] These were open label studies conducted to examine the safety and pharmacokinetics of intravenous dalbavancin when administered to subjects with mild, moderate and severe renal impairment.

Study drug treatment

[00326] Male and female subjects between ages 18 and 80 were eligible for enrollment. Subjects had to be within -10% to + 50% of ideal body weight for their sex, height, and body frame.

Pharmacokinetics

[00327] Serial blood samples were collected before the dose and through at least 2 weeks after the end of infusion and assayed for dalbavancin using a validated LC-MS/MS method.

[00328] Dalbavancin pharmacokinetic parameters were estimated by non-compartmental methods. The peak concentrations (C_{max}) were obtained directly from the observed data. The area under the plasma concentration-time curve (AUC) were calculated using the linear trapezoidal rule.

[00329] Pharmacokinetic parameters of subjects with healthy renal impairment and subjects with the most severe renal impairment (Severe RI) are presented in Table 24.

Table 24. Pharmacokinetic parameters

Pharmacokinetic Parameter	Dosing Regimen				
	1000 mg	1120 mg	1000 mg + 500 mg	500 mg Severe RI [^]	1000 mg Severe RI [^]
AUC (mg.h/L)	24453 +/- 3711	25790 +/- 2447	33000*	24376 +/- 6615	~ 48000*
AUC7 (mg.h/L)	13412 +/- 2120	13644 +/- 1305	12000*	6860 +/- 1613	~ 14000*
AUC14 (mg.h/L)	17737 +/- 2325	20207 +/- 2122	23000*	10986 +/- 2817	~ 22000*
AUC42 (mg.h/L)	23137 +/- 3326		33000*	.	~ 38000*
C_{max} (mg/L)	340 +/- 68	325 +/- 41	300*	137 +/- 22	~ 300*
C7day (mg/L)	40.9 +/- 5.2 [®]	55.4 +/- 8.1	40*	~ 30 - 40	~ 57*
C14day (mg/L)	21.3 +/- 2.5 [®]	22.8 +/- 1.9	40*	.	~ 40*

[^] Preliminary clinical data

* Estimated using parameters directly referenced, or extrapolated from plots

· Based on simulated data or extrapolated based on another study; not directly referenced in an abstract

AUC = drug exposure as estimated by the area under the plasma concentration-time curve;

AUC7 = drug exposure through 7 days post-dose or through treatment period;

AUC14 = drug exposure through 14 days post-dose or through treatment period; AUC42 = drug exposure through 42 days post-dose or through treatment period;

C_{max} = maximum observed drug concentration in plasma;

C7 = drug concentration 7-days post-dose, prior to administration of another possible dose;

C14 = drug concentration 14 days post-dose, prior to administration of another possible dose.

Discussion

[00330] For patients with severe renal impairment, a single dose of 500 or 1000 mg of dalbavancin is administered to the subject. As apparent from Table 24, after 14 days, a patient with severe renal impairment given a single dose of 1000 mg has a AUC14 (mg.h/L) of approximately 22000, which is unexpectedly very similar to normal patients on the two dose regimen of 1000 mg + 500 mg (AUC14 mg.h/L of 23000).

[00331] For patients with mild renal insufficiency, no dosage adjustment of dalbavancin was required. Dalbavancin concentrations and pharmacokinetic parameters were similar in subjects

X
63

with mild renal impairment and subjects with normal renal function. In addition, dalbavancin was well-tolerated in subjects with normal or mildly impaired renal function. See Dowell, J. et al. "Dalbavancin Dosage Adjustments Not Required for Patients with Mild Renal Impairment" presented at the 2003 ECCMID Meeting, Glasgow (Clinical Microbiology and Infection, Volume 9 (Supplement 1) page 291; 2003) and Stogniew, M. et al. "Pharmacokinetic Attributes of Dalbavancin: Well Distributed and Completely Eliminated with Dual Routes of Elimination" Presented at the 2003 ECCMID Meeting, Glasgow (Clinical Microbiology and Infection, Volume 9 (Supplement 1) page 291-292; 2003) both of which are hereby expressly incorporated by reference in their entirety.

Example 5. Renal Impairment and End-Stage Renal Disease

[00332] A major pathway for dalbavancin elimination is the excretion of both intact and OH-dalbavancin into urine, and it is likely that the drug will be used in patients with various degrees of renal impairment. Because of this, the safety and pharmacokinetics of dalbavancin in subjects with various degrees of renal impairment was examined in Clinical Studies VER001-3, VER001-11 and VER001-13.

[00333] Clinical Study VER001-3 was terminated early (5 subjects enrolled; 3 subjects received dalbavancin) when it was determined that the dosage being examined (70 mg) was too low compared to the larger weekly dosage that was being proposed for clinical study. Clinical Study VER001-13 examined subjects with mild and moderate renal impairment and Clinical Study VER001-11 examined subjects with severe renal impairment and subjects with end-stage renal disease (ESRD). Matched control subjects were enrolled in all studies. Renal impairment was defined by estimated creatinine clearance: mild = 51-79 mL/min, moderate = 31-50 mL/min, and severe ≤ 30 mL/min. Subjects with ESRD were dependent on dialysis through the course of the study (3 times weekly). Single doses of 1000 mg IV dalbavancin were examined in subjects with mild and moderate renal impairment, doses of 500 mg dalbavancin were studied in subjects with ESRD, and single doses of 500 and 1000 mg were studied in subjects with severe renal impairment.

[00334] Dalbavancin was well tolerated in each of these renal impairment studies. Similar percentages of subjects reporting adverse events were observed in each of the study groups. The majority of the reported adverse events were mild or moderate in severity and unrelated to study medication. There were no clinically meaningful laboratory derangements in any of the study subjects while receiving dalbavancin.

[00335] In Clinical Study VER001-13, dalbavancin administration to subjects with normal renal function and subjects with mild renal impairment resulted in comparable concentration-time profiles over the 60 day sampling interval. Through the relative treatment period, 7-days postdose, concentration-time profiles were comparable among subjects with normal renal function, and subjects with either mild or moderate renal impairment. A small increase in concentrations was observed in subjects with moderate renal impairment beyond Day 14, when concentrations were relatively low and below 40 mg/L. Dalbavancin plasma concentration-time profiles in these subjects following 1000 mg dalbavancin are shown in Fig. 18. Dalbavancin pharmacokinetic parameters are shown in Table 25. No dosage adjustment is required for patients with mild or moderate renal impairment ($CL_{CR} > 30$ mL/min). The findings from this study are consistent with patients studied in the population pharmacokinetic analysis ($CL_{CR} > 50$ mL/min).

[00336] Dalbavancin was administered to subjects with normal renal function, subjects with severe renal impairment, and ESRD subjects in Clinical Study VER001-11. Dalbavancin concentration-time profiles observed in this study are shown in Fig. 19. Concentrations were similar among subjects with normal renal function and subjects with either severe renal impairment or ESRD through the first 12 hours, but a small and gradually increasing difference was observed in subjects with severe renal impairment. Concentrations were increased by $\leq 40\%$ through the first week post-dose, and differences continued to increase through the remainder of the profile. Subjects with ESRD were divided into subjects receiving dalbavancin before or after their first dialysis session. No difference in concentration-profiles was noted between these two subgroups. Concentrations in subjects with ESRD were, however, similar to subjects with normal renal function, indicating compensation in renal insufficiency due to regularly scheduled dialysis (3-times/week). Levels in dialysate corresponding to this level of drug dialysis were too small to measure.

[00337] Dalbavancin pharmacokinetic parameters in subjects with severe renal impairment and subjects with ESRD (VER001-11) are compared to subjects with mild or moderate renal impairment (VER001-13) in Table 25. Single doses of 500 and 1000 mg were studied in subjects with severe renal impairment; concentrations and exposures were consistent with dose proportionality (Fig. 20, Table 25). Individual drug exposures within the relative treatment period (AUC_{0-24h}) were generally consistent across individual CL_{CR} , with only a small increase in exposure observed for subjects with severe renal impairment (Fig. 21). Differences in exposures were much greater when examined across the entire concentration-time profile. Area under the plasma concentration-time curve extrapolated through infinity ($AUC_{0-\infty}$) was increased 97% in

2
64

subjects with severe renal impairment. Subjects with ESRD had only a 45% increase in $AUC_{0-\infty}$, reflecting some compensation in renal insufficiency with regularly scheduled dialysis.

[00338] Based on the pharmacokinetic parameters and simulations based on the data, a dosage adjustment is recommended for patients with severe renal impairment. The intent of the dosage adjustment is to match concentrations and exposures during the two-dose relative treatment period (14 days), while minimizing the overall exposure of drug. A total of 9 simulated dosage regimens were examined in subjects with severe renal impairment. The results of these simulations are summarized in Fig. 22, showing the exposure during the relative treatment period versus the overall exposure. A dose of 750 mg dalbavancin followed one week later by 250 mg dalbavancin is the recommended dosage adjustment for patients with a $CL_{cr} < 30$ mL/min. This dosage regimen maintains concentrations above 20 mg/L, matches the treatment exposures observed for subjects with normal renal function, and minimizes the overall exposure. Fig. 23 shows dalbavancin concentration-time profiles simulated for i) subjects with normal renal function receiving 1000 mg (Day 1) + 500 mg (Day 8), ii) subjects with severe renal impairment receiving 1000 mg (Day 1) + 500 mg (Day 8), and iii) subjects with severe renal impairment receiving the recommended dosage adjustment of 750 mg (Day 1) + 250 mg (Day 8). Patients receiving regular dialysis therapy (2 to 3 times weekly) have some compensated clearance of drug by dialysis and do not require a dosage adjustment.

Table 25. Dalbavancin Pharmacokinetic Parameters for Healthy and Renally Impaired Subjects FOLLOWING A single dose of dalbavancin

Mean (± SD)	Mild Renal Impairment (N = 6)	Moderate Renal Impairment (N = 6)	Normal Renal Function (N = 9)	Severe Renal Impairment (N = 6)	Severe Renal Impairment (N = 4)	ESRD Predialysis (N = 3)	ESRD Postdialysis (N = 3)	Normal Renal Function (N = 6)	Normal Renal Function (N = 3)
Study	VER001- 13	VER001-13	VER001-13	VER001- 11	VER001- 11	VER001-11	VER001-11	VER001-11	VER001-2
Dose (mg)	1000	1000	1000	500	1000	500	500	500	1120
C _{max} (mg/L)	266.8 (42.3)	330.7 (55.7)	248.8 (33.0)	136.5 (21.6)	315.3 (89.7)	140.7 (26.4)	145.8 (71.5)	137.3 (39.5)	325 (41)
AUC _{0-∞} (mg·h/L)	9714 (1406)	11050 (2023)	8992 (1382)	6077 (1392)	10653 (1474)	6089 (1768)	4969 (1153)	5245 (1661)	13644 (1305)
AUC ₀₋₂₄ (mg·h/L)	15333 (1884)	18060 (3065)	13765 (1906)	10412 (2658)	18698 (1780)	10620 (2881)	8500 (2297)	7971 (2422)	20287 (2122)
AUC ₀₋₄₈ (mg·h/L)	27047 (4084)	37865 (7123)	24561 (5232)	24074 (6613)	44497 (11483)	19772 (5065)	15987 (6030)	12219 (3298)	25790 (2447)
CL (L/h)	0.0376 (0.0048)	0.0273 (0.0045)	0.0422 (0.0079)	0.0222 (0.0064)	0.0238 (0.0068)	0.0264 (0.0063)	0.0190 (0.0113)	0.0429 (0.0092)	0.0437 (0.004)
V _{ss} (L)	16.3 (3.3)	14.7 (2.1)	18.5 (3.6)	13.2 (2.9)	14.2 (0.8)	12.8 (3.4)	14.6 (3.2)	15.0 (4.2)	8.49 (1.05)
t _{1/2} (h)	389 (59)	432 (43)	417 (108)	454 (102)	469 (103)	376 (63)	347 (78)	333 (91)	149 (3.6)

Example 6. Hepatic Impairment

[00339] Dalbavancin is eliminated by both renal and non-renal pathways and dalbavancin will likely be used in patients with various degrees of hepatic impairment. The safety and pharmacokinetics of dalbavancin in subjects with various degrees of hepatic impairment was examined in Clinical Study VER001-12. The study enrolled otherwise healthy subjects with mild, moderate, or severe hepatic impairment (Child-Pugh scores 5 to 6, 7 to 9, and 10 to 15, respectively) and matched control subjects with normal hepatic function. Subjects were given a single 1000 mg IV dose of dalbavancin on Day 1 followed by a 500 mg IV dose of dalbavancin on Day 8.

[00340] Concentrations and exposures of dalbavancin did not increase with increasing degrees of hepatic impairment (Fig. 24). Dalbavancin administration to subjects with normal hepatic function and subjects with mild hepatic impairment resulted in comparable concentration-time profiles over the 60 day sampling interval. Dalbavancin administration to subjects with moderate hepatic impairment and subjects with severe hepatic impairment resulted in slightly decreased observed concentrations when compared to subjects with normal hepatic function. The drug was well tolerated across all groups.

[00341] The exposure to dalbavancin for subjects with normal hepatic function and subjects with mild hepatic impairment was comparable (Table 26). A trend towards a decrease in dalbavancin exposure and an increase in CL was evident for subjects with moderate hepatic impairment and subjects with severe hepatic impairment. Overall, the intersubject variability of the pharmacokinetic parameters was low and generally below 30% and although dalbavancin pharmacokinetic parameters were statistically different between the higher and lower hepatic impairment groups, the ranges of the exposure parameters significantly overlapped (Fig. 25).

[00342] Changes in dalbavancin pharmacokinetic parameters appeared to be influenced by the drug's distribution volume. Volumes of distribution increased in the same proportional or inversely proportional manner as CL and AUC. The drug terminal elimination half-life was virtually unchanged across the groups. Subjects with moderate and severe hepatic impairment, who have significantly more ascites and edema, have larger volumes of drug distribution and subsequently slightly lower drug exposures.

[00343] There was overlap in concentrations through the profiles across groups, with mean concentrations remaining above 20 mg/L in all groups through the intended treatment duration of 14 days. There was also overlap in drug exposure across the groups (Fig. 25). Even with a decrease in mean exposure, subjects with severe hepatic impairment still had a drug exposure

through the relative treatment period (14 days) that exceeded parameters required for therapy. No dosage adjustment of dalbavancin is required for patients with any degree of hepatic impairment.

Table 26. Dalbavancin Pharmacokinetic Parameters for Healthy and Hepatically Impaired Subjects FOLLOWING 1000 MG dalbavancin ON Day 1 and 500 MG dalbavancin on Day 8

Mean ($\pm$ SD)	Mild Hepatic Impairment (N=6)	Moderate Hepatic Impairment (N=6)	Severe Hepatic Impairment (N=5)	Normal Hepatic Function (N=9)
C_{max1} (mg/L)	331.7 (80.6)	227.2 (37.5)	199.0 (30.4)	278.3 (52.6)
C_{max2} (mg/L)	177.0 (62.4)	122.7 (27.2)	118.9 (23.9)	166.3 (42.9)
AUC_{0-24h} (mg.h/L)	11146 (3478)	7710 (1099)	7561 (1540)	10577 (2493)
AUC_{0-48h} (mg.h/L)	21158 (5808)	14826 (1925)	14112 (2911)	20473 (4883)
AUC_{0-168h} (mg.h/L)	33117 (6479)	23628 (3527)	21639 (5940)	33851 (8184)
CL (L/h)	0.0466 (0.0084)	0.0647 (0.0098)	0.0736 (0.0202)	0.0466 (0.0110)
V_{ss}	18.1 (5.2)	24.4 (3.0)	25.2 (4.0)	18.3 (3.7)
$t_{1/2}$ (h)	323 (27)	320 (24)	322 (68)	321 (24)

Example 7. Protein Binding of Dalbavancin using Isothermal Titration Microcalorimetry

[00344] Binding of dalbavancin to proteins was measured by isothermal titration microcalorimetry (ITC) in 20 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4 at 25 and 37 °C using a Microcal VP-ITC instrument. In a typical experiment, 25 x 10 μ l of protein (~150 μ M) was injected into a calorimeter cell containing dalbavancin solution (~5 μ M). Actual protein and dalbavancin concentrations were determined by measuring absorbance at 280 nm. Control experiments included injections of protein into buffer (in the absence of dalbavancin) to account for the heats of dilution of protein under identical conditions. For comparison, similar experiments with some necessary modifications were performed using teicoplanin.

[00345] Experiments with dalbavancin were conducted with each of the following proteins: human albumin; dog albumin; rat albumin; bovine albumin; and human α -glycoprotein. Teicoplanin was studied with human albumin and α -glycoprotein. A comparison of binding affinities at two different temperatures is shown in Table 27.

8
66

Table 27. Comparison of apparent binding affinities (K_a , $\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)

	25 °C	37 °C
<u>Dalbavancin</u>		
Human albumin	1.35 (± 0.2)	1.33 (± 0.15)
Rat albumin	3.1 (± 0.5)	2.8 (± 1.8)
Dog albumin	0.62 (± 0.09)	0.50 (± 0.13)
Bovine albumin	1.38 (± 0.14)	
α -glycoprotein	1.84 (± 0.36)	4.8 (± 2.3)
<u>Teicoplanin</u>		
Human albumin	0.96 (± 0.08)	
α -glycoprotein	0.07 (± 0.01)	

The $\pm$ errors quoted are the standard deviations obtained from the fitting routine.

[00346] Integrated heat effects, after correction for heats of dilution, were analyzed by non-linear regression using a simple single-site binding model with the standard Microcal ORIGIN software package. Raw data ($\mu\text{cal/sec}$) for each injection were integrated to give the total heat effect per addition, then divided by amount of injectant to give kcal/mole of injectant. The same integration was applied for control dilution effects, and this was subtracted from the actual titration data. This provided a differential of the binding curve in which the extent of binding is proportional to the total heat liberated (or absorbed). This was then analyzed by non-linear regression methods in terms of various standard binding models. The simplest model assumes simple non-competitive binding equilibrium, and gives three parameters:

$K_a (=1/K_{\text{diss}})$ is the binding association (dissociation constant)

ΔH = the enthalpy of binding (the size of signal related to binding)

N = number of binding sites (assuming the binding model is correct)

[00347] Assuming non-competitive binding, N is the (relative) number of moles of injectant required to saturate all the available binding sites in the sample. For the dalbavancin experiments, dalbavancin is the "sample" and the protein (HSA, etc.) is the "injectant." These preliminary results indicate that the binding is relatively weak and, because of the poor solubility of dalbavancin, it is difficult to determine the binding stoichiometry (N) unambiguously. However, as seen in Figure 6, in all cases, the data fits well with $N < 1$ (i.e., less than one to one protein to dalbavancin).

Consequently, a value of $N=0.5$ means that it only takes half as many moles of protein to bind all the dalbavancin as would be expected. In other words, each protein apparently binds two dalbavancin molecules. It is possible that dalbavancin forms a dimer that binds 1:1 with a protein.

Results of binding stoichiometry modeling suggests that two dalbavancin molecules are bound to one molecule of protein, unlike teicoplanin, which exhibits 1:1 binding.

[00348] Table 28 presents the calculated percent bound for antibiotic concentrations in the range 1-500 μM , assuming physiological concentrations of human serum albumin ($6 \times 10^{-4} \text{ M}$) and α -glycopeptide ($1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$). To relate this to the clinical situation, the peak concentration of dalbavancin in man is approximately 300 mg/L, or 165 μM .

Table 28. Calculated percent Binding of Teicoplanin and Dalbavancin to Plasma Proteins

Concentration of antibiotic (μM)	Dalbavancin	Teicoplanin
Human albumin		
1	98.8	98.3
10	98.8	98.3
100	98.7	98.0
165	98.6	ND
250	98.5	ND
500	98.0	ND
Human α-glycoprotein		
1	73.0	9.6
10	68.2	9.1
100	26.2	6.0
165	16.9	ND
250	11.4	ND
500	5.9	ND

ND= Not done

[00349] In these experiments, the binding of dalbavancin to human serum albumin exceeds 98%. The fraction bound is fairly constant across the selected range of dalbavancin concentrations, i.e. 1-500 μM . This range encompasses the therapeutic concentrations in man. Binding of dalbavancin to α -glycoprotein is much greater than that of teicoplanin. Dalbavancin demonstrates high capacity and low affinity for plasma proteins of different origin, with similar K_d values across proteins from all species tested. These results help to explain some of the unique pharmacokinetic characteristics of dalbavancin. The binding and formation of a 2:1 dalbavancin:protein complex also explains the prolonged half-life, and the apparent volume of distribution, which approximates extracellular water volume. The low affinity helps explain the observed *in vivo* activity, which greatly exceeds what would be expected for a compound with a free fraction close to 1%. The high capacity for plasma proteins helps to explain the relatively high plasma concentrations achieved in spite of poor solubility of the compound at physiological pH.

Example 8. Pharmacokinetic Attributes and Tissue Distribution of Dalbavancin in Rats

67

[00350] Two studies were performed in rats administered a single IV infusion of 20 mg/kg [³H]-dalbavancin. Excreta and more than 40 different tissues were collected through 70 days post-administration, and the tissue distribution and pharmacokinetics of drug-derived radioactivity were determined.

[00351] HPLC-purified [³H]-dalbavancin was used for these studies. Radiolabeled drug was produced via tritium exchange and purified by HPLC.

Rat mass balance study

[00352] Mass balance studies were conducted to determine the excretion pattern of dalbavancin following a single intravenous (IV) infusion of dalbavancin in male rats.

[00353] Fifteen male Sprague-Dawley rats received a single IV dose of ³H-dalbavancin (20 mg/kg, 100 µCi/rat). Following dose administration, urine and feces were collected at 24 hour intervals to 14, 36, and 70 days after the dose (3 rats/final collection time). Water and methanol cage washes were also collected. Carcasses were analyzed at the end of the collection period. All samples were analyzed for total radioactivity content by liquid scintillation counting (LSC).

[00354] Following IV administration of ³H-dalbavancin in rats, drug-derived radioactivity was eliminated in both urine (~ 2/3 of excreted radioactivity) and feces (~ 1/3 of excreted radioactivity). Approximately half of the radioactivity administered was eliminated in the urine and feces within the first week, which is consistent with a plasma t_{1/2} of approximately 1 week. At 70 days post dose, only 4.5% of the dose remained in the carcass. Negligible radioactivity was recovered in the cage washes. Virtually all of the administered radioactivity was accounted for (urine, feces, carcass, cage washes, and tritium exchange) during the study.

Rat quantitative tissue distribution (QTD) study

[00355] Quantitative tissue distribution studies were conducted to assess the tissue distribution of dalbavancin following a single IV infusion of dalbavancin to male rats.

[00356] Forty-one male Sprague-Dawley rats received a single IV infusion of ³H-dalbavancin (20 mg/kg, 50 µCi/rat). Rats (3 per time-point) were euthanized at 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 336, 840, 1176 and 1680 hours post dose for collection of blood, plasma, and tissues (including carcass). All samples were analyzed by LSC.

[00357] Concentration-time profiles were determined for more than 40 tissues, including kidney, liver, spleen, blood, plasma, lung, and skin. Concentrations and t_{1/2} values of drug-derived

radioactivity in tissues, including skin, were comparable to those observed in plasma. Dalbavancin was found to be rapidly and extensively distributed with all tissues having quantifiable concentrations of drug-derived radioactivity within 12 hours after post-infusion. Most tissues reached maximum concentration (C_{max}) within 24 h after the dose. Recovered radioactivity after 5 days was <5% of the dose in any single tissue. By 70 days after the dose, only the carcass retained > 1% (2.34%) of the administered radioactivity. Thus, dalbavancin did not accumulate in any single tissue, organ, or blood cellular component. Concentrations of radioactivity in the CNS were low but detectable in this healthy animal model. Dalbavancin was found to penetrate the skin with concentrations of drug-derived radioactivity that were as high as or higher than in plasma. Blood to plasma ratio of drug-derived radioactivity remained relatively constant over time and was <1.

[00358] As part of the QTD studies, bile samples were collected from bile duct cannulated rats (4 animals) through 384 h (16 days) post-dose. Almost 11% of the dose was recovered in the bile over 384 h after the dose. This represents the majority of the drug-derived radioactivity found in feces.

Example 9. Pharmacodynamic Activity of Dalbavancin

[00359] The goal of antimicrobial therapy is to provide active concentrations at the site of infection for an adequate period of time to eradicate invading pathogens. The primary method for assessing antimicrobial activity in vitro is determination of the minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC). However, these parameters only measure net effects for a prescribed incubation period and do not characterize the time course of antimicrobial activity. The MBC does not determine if the rate and extent of bactericidal activity can be enhanced by increasing concentrations of drug. Furthermore, MIC determinations do not measure whether there are inhibitory effects on bacteria that persist after drug removal.

[00360] An increasing number of studies suggest that the rate of bactericidal activity, its dependence on concentration or the time of exposure, and the presence or absence of a postantibiotic effect more clearly describe the time course of antimicrobial activity and are important pharmacodynamic parameters for determining optimal dosing regimens. For example, bacterial killing by beta-lactam antibiotics shows little concentration dependence and the extent of killing is due primarily to the duration of exposure. In addition, beta-lactams produce short or no postantibiotic effects (PAE) with gram-negative bacilli. Thus, one would predict that dosing regimens that maintain drug levels above the MIC for a sufficient period of time would demonstrate the best efficacy. This has been confirmed in several animal models. On the other hand, fluoroquinolones exhibit concentration-dependent killing and produce prolonged in-vivo

68

postantibiotic effects. One would predict that the amount of drug rather than the frequency of dosing would be the important determinant of efficacy for these drugs. This has also been confirmed in several animal models. More importantly, the magnitude of the pharmacokinetic/pharmacodynamic parameter required for efficacy for both beta-lactams and fluoroquinolones has been similar in animal infection models and human infections.

[00361] The following studies were designed to characterize the in-vivo pharmacodynamic characteristics of dalbavancin. The impact of the dosing regimen on the in vivo efficacy of dalbavancin in the experimental thigh infection model in neutropenic mice was determined. Studies were also performed to investigate [1] which pharmacokinetic parameter (peak serum level, area under the concentration-versus-time curve (AUC), the duration of time serum levels exceed the MIC) best predicts efficacy of dalbavancin and [2] whether the magnitude of the PK/PD parameter required for efficacy is similar among common gram-positive bacteria including penicillin-resistant pneumococci and methicillin-resistant *S. aureus*. Lastly, the effect of infection site on the activity of dalbavancin against both *S. pneumoniae* and *S. aureus* in both the thigh and pneumonia infection models was determined.

Study Organisms and MICs to Dalbavancin

[00362] The study organisms and their MICs to dalbavancin are listed in Table 29. MICs were determined in MHB by standard NCCLS microdilution techniques. MHB was supplemented with 3% lysed horse blood for MIC determinations with *S. pneumoniae*. All MICs were performed at least in duplicate.

Table 29. In Vitro Activity of Dalbavancin Against *S. pneumoniae* and *S. Aureus* Strains.

Organism	Dalbavancin MIC/MBC (mg/L)	Penicillin MIC (mg/L)	Methicillin MIC (mg/L)
<i>S. pneumoniae</i> strain			
1199	0.004	1.0	-
1293	0.004	2.0	-
1325	0.008	2.0	-
1329	0.008	2.0	-
10813	0.03	0.008	-
<i>S. aureus</i> strain			
25923	0.12/0.50	-	0.12
33591	0.12/0.25	-	>8.0
31005	0.06/0.25	-	0.12
MRSA	0.12/0.25	-	>8.0
Smith	0.06/0.50	-	0.12

[00363] Five pneumococcal and six staphylococcal organisms were utilized. The dalbavancin MICs for the pneumococci ranged from 0.004 to 0.03 mg/L. The range of MICs for the *S. aureus* isolates were more narrow and higher than those against pneumococci, ranging from 0.06-0.12 mg/L.

Pharmacokinetics

[00364] The plasma pharmacokinetics of dalbavancin in thigh-infected neutropenic Swiss ICR mice are shown in Figure 44. Neutropenia in this and all other studies was produced by injections of cyclophosphamide, 150 mg/kg 4 days prior to study, 100 mg/kg 1 day prior to study and 100 mg/kg every 48 h after start of infection until end of study. Neutrophil counts remained less than $100/\text{mm}^3$ for the duration of study. Doses of 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 mg/kg were studied. Drug was administered by intraperitoneal injection of 0.2 ml volume. Blood was removed from groups of three mice by retroorbital aspiration into heparinized capillary tubes at 0.5, 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72, and 96 hours after dosing. Plasma was separated, and dalbavancin plasma concentrations were measured using a microbiologic assay with *Bacillus subtilis* as the test organism. Peak levels were observed by 4-6 hr. The half-lives of dalbavancin were determined by linear least-squares regression. AUC was calculated by the trapezoidal rule from mean concentrations. The AUC was estimated at 24, 36, 48, 72, 96 hr and extrapolated to infinity. The 24h AUC was calculated as the 6-day AUC divided by 6. Dalbavancin exhibited linear pharmacokinetics. The half-life was prolonged and varied from 7.6 to 13.1 hours.

Protein Binding

[00365] The impact of drug binding to serum and serum proteins was investigated by comparing the MIC of dalbavancin for two strains of *S. aureus* in broth, infected mouse serum human serum, and albumin (Table 30). MICs for both strains in broth was 0.12 mg/L. The MICs (arithmetic) in 95% mouse serum increased to 32 mg/L. MICs in mouse serum ultrafiltrate rose to only 0.5 mg/L suggesting that the great majority of the difference in the MICs was do to protein binding. Similar study with human serum and albumin resulted in an increase to only 8 mg/L. Based upon the MIC difference between broth and mouse serum, the degree of protein binding was estimated to be 99.6%. This degree of binding was considered in subsequent pharmacodynamic analyses. The degree of binding in human serum would be estimated to be 96%.

82
69

Table 30. Impact of Serum, Serum Ultrafiltrate, and Human albumin on the In Vitro Activity of Dalbavancin Against Selected *S. aureus* Strains.

Organism	MIC Broth	MIC 95% Mouse Serum	MIC 95% Human Serum	MIC 95% Human Albumin	MIC 95% Mouse Serum Ultrafiltrate
<i>S. aureus</i> strain					
25923	0.12	32	8.0	8.0	0.5
MRSA	0.12	32	8.0	8.0	0.5

Infection Models

[00366] The murine thigh-infection model was used for all organisms throughout the various studies. In this well-established model, approximately 10^6 cfu of the study organisms are injected into one or both thighs (in 0.1 ml) two hours before starting therapy. The number of organisms in the thigh at the start of therapy in the following studies varied from $10^{7.15-7.59}$ cfu/thigh. The murine lung-infection model was used only with a single isolate of either *S. pneumoniae* or *S. aureus*. In this model, mice are infected by a intranasal inoculation of (approximately $10^{8.5}$ cfu/ml) of 50 μ l via the nares of anesthetized mice. Treatment begins 2-hrs after inoculation at which time the mice had $10^{7.4-7.6}$ cfu/lung.

In Vivo Time Kill

[00367] The effect of a single doses of dalbavancin on the in-vivo killing of a strain of *S. pneumoniae* and *S. aureus* over time are shown in Figures 45 and 46. Each point represents the mean of 4 thighs. Five dose levels, ranging 16-fold were used. The dose levels used in the study against *S. aureus* ranged from 5 to 80 mg/kg. The dose levels used in study against *S. pneumoniae* ranged from 0.625 to 10 mg/kg. The extent of killing both species was extensive (> 2 log with the highest doses studied). However, the extent and rate of killing of the pneumococcal isolate was greater than the staphylococcal strain. Study with the two highest doses of dalbavancin resulted in killing of *S. aureus*. Three of the five dose levels used in study against *S. pneumoniae* reduced the burden of organisms nearly four log in the thighs of infected mice

Dosing Regimen Studies

[00368] In these studies, multiple dosing regimens varying the dose and dosage interval were administered intraperitoneally in 0.2 ml volumes to groups of mice for 144 h (6 days). The dosing intervals chosen were 12, 24, 36, and 72 hours. Five different doses (two-fold increases) were used.

Study against *S. aureus* utilized total dose (mg/kg/6d) levels ranging from 30 to 480 mg/kg/6d. Study against *S. pneumoniae* utilized total dose levels (mg/kg/6d) ranging from 0.6125 to 10 mg/kg/6d. Figures 47 and 48 illustrate the dose-response curves for dalbavancin at the different dosing intervals for the strain of *S. pneumoniae* and *S. aureus* in the thighs of neutropenic mice. Each point represents the mean of 4 thighs. In general, increasing the dosing interval resulted in a slight shift of the dose response curves to the left indicating more efficacy with the regimens for which large doses were administered infrequently.

[00369] Each of the dose-response curves was also mathematically characterized using a maximum effect model. This methodology uses the Hill equation to estimate by non-linear regression the maximum effect (Emax), the dose (P50) required to obtain 50% of the Emax, and the slope of the dose-response relationship. From these parameters we could then calculate the dose required to produce a net bacteriostatic effect over the 144 hour treatment period as well as the doses necessary to produce a 1 and 2 log reduction in organism burden. The static dose and the dose associated with a 1 and 2 log kill for each of the drug organism combinations and the various dosing regimens are shown in Table 31.

Table 31. Dalbavancin Dosages Required to Achieve a Net Static Effect, 1 and 2 Log Kill for Four Different Dosing Intervals in a *S. pneumoniae* and *S. aureus* Infection Model.

Organism	q 12 h			q 24 h			q 36 h			q 72 h		
	SD mg/kg (95%CI)	1 log kill mg/kg (95%CI)	2 log kill mg/kg (95%CI)	SD mg/kg (95%CI)	1 log kill mg/kg (95%CI)	2 log kill mg/kg (95%CI)	SD mg/kg (95%CI)	1 log kill mg/kg (95%CI)	2 log kill mg/kg (95%CI)	SD mg/kg (95%CI)	1 log kill mg/kg (95%CI)	2 log kill mg/kg (95%CI)
BP18813	2.3 (1.9-2.7)	2.8 (2.3-3.3)	3.3 (2.8-4.2)	1.34 (1.14-1.57)	1.34 (1.34-1.74)	1.75 (1.47-2.03)	1.26 (1.16-1.36)	1.33 (1.41-1.65)	1.81 (1.67-1.95)	0.71 (.64-.88)	0.77 (.59-.95)	0.82 (.62-1.02)
SA29213	88 (8-152)	-	-	26 (-39-91)	267 (-488-934)	-	15 (-14-44)	36 (-34-108)	122 (-117-361)	10 (-18-38)	31 (-55-117)	128 (-238-486)

dose presented as total dose over 6 days (mg/kg).

[00370] Increasing the dosage regimen from 12 to 36 hours in study against *S. pneumoniae* did not result in an appreciable change in the doses associated with the three microbiologic endpoints. However, efficacy with the 72 h dosing interval required less drug. A similar relationship was observed in study against *S. aureus*. The only dosing regimens that produced a 1 and 2 log kill against *S. aureus* were the 36 and 72 h intervals.

Pharmacodynamic Parameters Correlating with Efficacy

[00371] We determined which PK/PD parameter correlated best with efficacy by relating the number of bacteria in thigh at the end of 144 hours of therapy with [1] the peak/MIC ratio, [2] the

JP
70

AUC/MIC ratio, and [3] the percentage of the dosing interval that serum levels exceed the MIC for each of the dosage regimens studied. The PK/PD parameter values for those doses not specifically studied were extrapolated from the values of the nearest studied doses. The relationship between log cfu per thigh and the peak/MIC ratio, the 24-hour AUC/MIC ratio and the percentage of time serum levels exceeded the MIC are illustrated in Figure 49 for *S. pneumoniae* and Figure 50 for *S. aureus*. Each point represents the mean of four thighs. For both organisms a strong correlation was observed with the 24-hr AUC/MIC and peak/MIC ratios. However, regression of the data with the 24 h AUC/MIC ratio resulted in the strongest correlation. The data illustrated in these figures were also analyzed by the same maximum dose-response model mentioned above, except that the different PK/PD parameters were used in place of the dose. The R² represents the coefficient of determination observed for the relationship between efficacy and each PK/PD parameter. The coefficient of determination (or R²) represents the percentage of the variance in bacterial numbers that can be attributed to each PK/PD parameter and was high for both AUC/MIC and Cmax/MIC.

PK/PD Parameter Magnitude or Target

[00372] To determine if the AUC/MIC required for a static effect was similar for multiple pathogens, we studied the in vivo activity of 24- and 72-hourly dosing regimens of dalbavancin against 5 strains of *S. pneumoniae* and 6 strains of *S. aureus* after 6 days of therapy. The dose-response curves for dalbavancin against these various strains are shown in Figures 51 and 52. In Figures 51 and 52 the dose is represented by the free drug mean 24 h AUC/MIC ratio over the 6 day period of study. In general, the shape of the dose-response curves was similar for all strains. The location of the dose-response curve was related to the MIC of the organism. However, the dose response curves for the pneumococcal organisms are shifted slightly to the left. This curve shift suggests less drug was necessary for effect against pneumococci than staphylococci. The static dose, 1 log and 2 log kill and the associated free drug 24-hr AUC/MIC and Cmax/MIC are shown in Table 32. The extent of bacterial killing was relatively similar for most strains. All strains exhibited more than a 4 log₁₀ drop in cfu over the 6 day study.

Table 32. Dalbavancin Efficacy Against *S. pneumoniae* and *S. aureus*.

Organism	MIC/MBC (mg/L)	Static Effect		1 Log Kill				2 Log Kill	
				mg/kg/ 24h	24AUC/ MIC	24AUC/ MBC	mg/kg/ 24h	24AUC/ MIC	24AUC/ MBC
q 24 h regimen									

SP119 9	0.004	0.40	16.0		0.49	19.4		0.57	22.7	
SP129 3	0.004	0.44	17.4		0.55	21.7		0.65	25.9	
SP132 5	0.008	1.46	29.0		1.6	31.8		1.73	34.5	
SP132 9	0.008	0.90	18.0		1.18	23.5		1.45	26.7	
SP108 13	0.03	1.34	7.5		1.54	8.7		1.75	9.9	
Mean ± SD		0.91±0.44	17.4±6.9		1.1 ± 0.47	21±7.4		1.23±0.5 2	24.3±8.2	
SA259 23	0.12/0.25	42.7	216	32	51.2	250	60	60	289	69.3
SA335 91	0.12/0.25	22.3	96.2	46	27.7	121	58.3	33.5	157	74.3
SA310 05	0.06/0.12	49.3	483	242	-	-	-	-	-	-
MRSA	0.06/0.25	37.7	374	90	45.3	452	109	53.5	519	125
SA Smith	0.12/0.25	33.5	156	75	50.7	248	119	73.5	361	173
Mean ± SD		37.1±9.1	265±143	101±72	43.7 ± 9.5	268±119	86.6±27.6	58±14	332±131	110±42
q 72 h region en		mg/kg /72h								
SP132 5	0.008	0.83	6.0		0.99	8.8		1.16	17.6	
SP129 3	0.004	1.01	14.1		1.28	18		1.68	23.8	
SP119 9	0.004	0.72	10.3		0.85	12.1		0.99	35.3	
SP139 6	0.008	0.52	4.0		0.61	4.3		0.69	4.8	
SP10 813	0.03	0.71	1.4		0.77	1.6		0.82	1.6	
Mean ±SD		0.77±0.18	7.2±4.5		0.93±0. 24	9.0±5.8		1.13±0. 36	16.6±12.3	
SA25 923	0.12/0.50	160	274	66	185	317	76.1	214	367	88.1
SA33 591	0.12/0.25	74	123	59	93	160	76.6	114	195	94
MRS A	0.06/0.25	43	147	35.3	62	202	48.8	85	292	70
SA Smith	0.12/0.25	59	96	46.1	95	163	78.0	148	254	22
SA30 7109	0.06/0.50	31	94	11.3	34	108	12.9	37	121	14.6

2
27

SA31 005	0.06/0.12	67.7	223	112	94.6	325	163	127	364	217
Mean ±SD		72±41	160±67	55±31	94±46	213±8.14	75.9±45. 2	120±54	266±88	101±61

[00373] For the dalbavancin regimens utilizing every 24 h dosing, the free drug 24 h AUC/MIC value associated with a static effect against *S. pneumoniae* and *S. aureus* were 17.6 ± 6.9 and 265 ± 143 , respectively. The dose response curves were steep and the 24 h AUC/MIC values associated with a 1 and 2 log kill were not appreciably higher. Therapy against pneumococci, based upon the 24 h AUC/MIC, required 12 to 23 fold less drug, as suggested by the dose response curves. For *S. aureus* the MBC was 2 to 4-fold higher than the MIC. If one considers the AUC/MBC for *S. aureus*, the values would be only 4 to 8-fold higher than for *S. pneumoniae*.

[00374] For the regimens that utilized less frequent dosing (every 72 h), the free drug 24 h AUC/MIC values associated with a static effect against *S. pneumoniae* and *S. aureus* were 7.2 ± 4.5 and 160 ± 67 , respectively. The PK/PD magnitudes necessary to achieve the three in vivo microbiologic endpoints (static dose, 1 and 2 log kill) were lower for the more widely spaced dosing regimens. When dalbavancin was dosed every 72 h, the 24 h AUC/MIC values associated with the various endpoints were 1.3 to 2.4 fold lower than when drug was dosed every 24 h.

[00375] Penicillin-resistance in *S. pneumoniae* and methicillin-resistance in *S. aureus* did not impact the 24 h AUC/MIC required for dalbavancin efficacy.

Impact of Neutrophils on Activity of Dalbavancin

[00376] To determine the effect of neutrophils on the activity of dalbavancin, we compared the dose-response curves with 24-hour dosing of the drug in both normal and neutropenic mice infected with *S. pneumoniae*. The subsequent dose response curves are shown in Figure 53. Each point represents the mean value from 4 thighs. The static dose, and the doses associated with a 1 and 2 log kill were calculated from the parameters estimated by non-linear regression using the Hill equation. The doses (mg/kg/6 d) required to achieve these endpoints in both normal and neutropenic mice are shown in Table 33. The presence of neutrophils resulted in a 1.7- to 2.1-fold reduction in the doses necessary for efficacy. However, these differences were not statistically significant.

Table 33. Impact of Neutrophils on the In Vivo Efficacy of Dalbavancin Against *S. pneumoniae*.

	SD mg/kg (95%CI)	1 log kill mg/kg (95%CI)	2 log kill mg/kg (95%CI)
Normal	2.03 (1.99-2.07)	2.35 (2.26-2.44)	2.66 (2.56-2.76)
Neutropenic	4.13 (0.23-8.0)	4.38 (0.28-8.50)	4.62 (0.32-8.90)

Impact of Infection Site on Activity of Dalbavancin

[00377] To determine the impact of infection site on the activity of dalbavancin, we compared the dose-response curves with the 24-hour dosing of the drug in both the thigh and lung infection models (Figure 54). Both *S. pneumoniae* and *S. aureus* were utilized in these models. The dose-response curves in the two models utilizing *S. pneumoniae* were nearly identical. In similar study against *S. aureus* the dose response curve in the lung model is shifted to the left suggesting less drug was necessary for efficacy at this site of infection. However, the confidence intervals in the staphylococcal study were large and these differences were not significant.

Conclusions

[00378] The above studies have characterized the in-vivo pharmacodynamic activity of dalbavancin against a variety of pathogens. These can be summarized as follows.

- Dalbavancin produced in vivo bactericidal activity against both *S. pneumoniae* and *S. aureus* in both the thigh and lung infection modes.
- The efficacy of dalbavancin was dose-dependent.
- The dose-dependent PK/PD parameters, 24 h AUC/MIC and C_{max}/MIC, were strongly correlated with the in vivo activity of dalbavancin. Regression of the dose-response data with the 24 h AUC/MIC parameter resulted in the highest coefficients of determination. Therapy with the most widely spaced dosing intervals was more effective in these models.
- The 24 h AUC/MIC values associated with microbiologic effect were similar among the strains within the species studied. Beta-lactam resistance in *S. pneumoniae* and *S. aureus* did not impact dalbavancin in vivo activity.
- Efficacy against *S. pneumoniae* required lower 24 h AUC/MIC values than against *S. aureus*. This may in part be explained by the species differences in MIC and MBC.
- Efficacy against *S. pneumoniae*, whether based upon a net static effect, 1 or 2 log kill required a free drug AUC/MIC over the 6 days of therapy near 100 in these infection models. Efficacy against *S. aureus*, similarly based, required a free drug AUC/MIC over the 6 days of near 1000.
- Neutropenia had minimal impact on in vivo dalbavancin activity.

②
72**Example 10. Quantitative determination of dalbavancin in plasma by HPLC-MS/MS**

[00379] A HPLC-MS/MS method was developed for quantitative measurement of dalbavancin in plasma, as described below.

Preparation of dalbavancin calibration and quality control standards

[00380] Stock solutions of dalbavancin were prepared by dissolving dalbavancin in deionized water to prepare a 1000 µg/ml solution, followed by serial dilutions in deionized water to prepare 500, 50 and 10 µg/ml solutions.

[00381] Calibration standards of 100, 60, and 40 µg/ml dalbavancin concentration were prepared by spiking human plasma with appropriate volumes of a 1000 µg/ml dalbavancin stock solution prepared as described above. Calibration standards of 20 and 10 µg/ml concentration were prepared by spiking human plasma with appropriate volumes of a 500 µg/ml dalbavancin stock solution, and a calibration standard of 0.5 µg/ml was prepared by spiking human plasma with an appropriate volume of a 10 µg/ml stock solution.

[00382] Quality control standards of 90 and 30 µg/ml dalbavancin were prepared by spiking human plasma with an appropriate volume of a 1000 µg/ml dalbavancin stock solution prepared as described above. A quality control standard of 1.5 µg/ml was prepared by spiking human plasma with an appropriate volume of a 50 µg/ml solution.

Preparation of internal standard working solution

[00383] A 30 µg/ml working solution of internal standard BI-K0098, which is the diethyl-amino-propyl-amino derivative of A-40926, was prepared as follows. Approximately 10mg of BI-K0098 was dissolved in approximately 10 ml of mobile phase A (80% of 10mM Ammonium Formate/Formic Acid, pH 3 (v/v), 10% of Acetonitrile (v/v), and 10% 2-Propanol (v/v)) to make a 1000 µg/ml internal standard stock solution. The stock solution (300 µl) was then diluted to a volume of 10 ml with mobile phase A to make a 30 µg/ml internal standard solution.

Preparation of samples for analysis

[00384] Samples were prepared as follows for quantitative determination of dalbavancin concentration in plasma. To 50 µl of calibration or quality control standards prepared as described

above, 100 µl of internal standard working standard solution was added and mixed. The mixture was permitted to equilibrate for five minutes at room temperature, followed by addition of 250 µl of acetonitrile. The mixture was then vortexed for 10 seconds, followed by centrifugation for 1 minute at about 10,000 rpm on an ALC micro-centrifuge 4214. Supernatants were transferred to clean tubes and evaporated to dryness in a Savant Speed-Vac System at about 40 °C. Samples were then resuspended in 150 µl of mobile phase A.

Analytical method

[00385] 50 µl samples prepared for analysis as described above were injected into a Phenomenex Jupiter C₁₈ column (50 x 2 mm, C₁₈ 5 µm 300 Å), and analyzed under gradient HPLC conditions at a flow rate of 0.3 ml/min. The gradient conditions were: initial, 80% mobile phase A/20% mobile phase B (20% 10mM Ammonium Formate/Formic Acid, pH 3 (v/v), 40% Acetonitrile (v/v), 40% 2-propanol (v/v)); 1 minute, 20% mobile phase A/80% mobile phase B; 2 minutes, 20% mobile phase A/80% mobile phase B; 2.5 minutes, back to initial conditions.

[00386] The HPLC system was coupled to a PE SCIEX API-2000 triple quadrupole mass spectrometer, with turbo ion spray operating in a positive ionization mode. Air was used to generate a spray in the ion source. Probe temperature was set at 500° C with nitrogen as curtain gas. Multiple reactions monitoring (MRM) was employed using nitrogen as collision gas. The analytes were detected by monitoring the following ion transitions: 909.3 Da → 1429.3 Da for dalbavancin, and 923.3 Da → 1457.3 Da for the internal standard (BI-K0098). To avoid mass spectrometer contamination, a post-column flow diversion in the first minute and 2.5 minutes after the beginning of the chromatographic run was performed.

[00387] Software Sample Control 1.4 was used for the acquisition of data analysis and software MacQuan 1.6 was used for the integration of chromatographic peaks and statistical data evaluation.

Calibration curves

[00388] Linearity of the assay method was assessed by assaying calibration standards to generate a calibration curve. The concentration of dalbavancin in a plasma sample was determined by calculating the peak area ratio between dalbavancin and the internal standard.

[00389] Calibration curves for dalbavancin concentrations over an analytical range of 0.5-100 µg dalbavancin/ml of human plasma were constructed using the equation $y = A + Bx$ (weighted 1/x), where A represents intercept of the curve, B represents the slope of the curve, x represents the dalbavancin concentration of calibration standard (µg/ml), and y represents the peak area ratio of

dalbavancin to internal standard. Three separate calibration curves were constructed. The results showed that dalbavancin/internal standard area ratio and dalbavancin concentrations varied linearly over the analytical range. The lower limit of quantitation (LLOQ) was 0.5 µg dalbavancin per ml of human plasma. The slopes for the calibration curves were reproducible and their correlation coefficients were greater than 0.9995.

Stability of dalbavancin in plasma

[00390] The stability of dalbavancin in plasma samples was tested by analyzing three replicates quality control standards of human plasma samples, prepared as described above, at two different concentrations, 1.5 and 90 µg/ml. Detectable dalbavancin concentration was stable after three cycles of freeze-thaw treatment. Dalbavancin concentration in processed samples was stable after 24 hours at room temperature. No reduction in dalbavancin concentration with respect to time zero samples was observed.

Example 11. Dalbavancin Mass Spectroscopy Analysis.

[00391] The nature of dalbavancin multimers in solution was investigated and the conditions influencing the population ratio of dalbavancin multimer to dalbavancin monomer were determined by electrospray ion mass spectroscopy (ESI-MS).

[00392] Experiments were performed using an Applied Biosystem API III+ mass spectrometer equipped with a TurboIonSpray source, a Triple Quadrupole analyzer, operating in positive ion mode. The optimized conditions are reported in Table 34 below.

Table 34: Instrumental Conditions for Dalbavancin Analysis on Applied Biosystem API III+ Mass Spectrometer.

IonSpray source:		MS analyzer:	
IonSpray voltage	5000 V	Interface plate voltage	650 V
Orifice plate voltage	80 V	Q0 road offset voltage	40 V
Curtain gas flow	0.6 L/min	Q1 park mass	1000
Nebulizer gas flow	1.2 L/min	Q1 resolution	120.8
Liquid flow	5 µL/min	Q1 delta mass	0.2
Interface heater	60°C	Q1 road offset voltage	27 V
		Lens 7 voltage	-50 V
		Q2 road offset voltage	-50 V

Scan conditions		Q3 park mass	1000
(Q1 scan):		Q3 resolution	110
		Q3 delta mass	0
Step	0.1 amu	Q3 road offset voltage	-70 V
Dwell time	1 msec	Lens 9 voltage	-250 V
		Faraday plate voltage	-250 V
		Channel electron multiplier voltage	-3800 V

Dalbavancin in solution

[00393] Instrumental parameters were tuned on a dalbavancin solution containing 0.1 mg/ml of dalbavancin dissolved in a 8:2 water:isopropanol solution. A spectrum of dalbavancin in solution was acquired in the range of 500-2000 amu following direct injection of the solution. The resulting spectrum, as seen in Figure 7, indicates the presence of dalbavancin multimers. As a non-limiting example, one trace of the spectrum is attributable to a homomultimer of B₀, which is present as a $(2nM + y^{+3})$ ion species, where n is a positive integer indicating the multiplicity of the homomultimer, e.g., $n = 1$ when the multimer is a homodimer and $n = 2$ when the multimer is a homotetramer, M indicates the mass of the monomer, $y = n$ and $+3$ indicates a plus three ion charge. For example, the homodimer of B₀ is provided when $n = 1$, $y = 1$, and $M = \text{mass of } B_0$. This homodimer species is assigned to a $(2M + 3)$ ion trace in the mass spectrum.

Influence of dalbavancin concentration on the population ratio of dalbavancin multimer to monomer

[00394] The influence of dalbavancin concentration on the population ratio of multimer to monomer was evaluated by mass spectroscopy using the conditions described above. The spectra were acquired by direct infusion of dalbavancin solutions at concentrations of 20, 40, 60, and 80 µg/mL. The intensities of the main peaks were reported as a function of dalbavancin concentration and the population ratios of dalbavancin multimer to monomer were determined, as shown in Figure 8.

[00395] The data indicate that the population ratio of dalbavancin multimer to dalbavancin monomer increases with increasing concentration. This may help to explain the high drug loading capacities that may be administered to an individual. The role of multimer as a depot of monomer may decrease the tendency of higher concentration samples to form precipitates and enhance the concentrations which may be administered to an individual. The presence of multimers may also allow rapid administration of a dose of dalbavancin to an individual.

X
74

[00396] A non-limiting example of a method of determining the population ratio of dalbavancin multimer to monomer is provided, for example, by determining the ratio between peak intensities of ions A and B as shown in Figure 7. Dividing the intensity of peak A by the intensity of peak B provides one measure of the population ratio of dalbavancin multimer to monomer.

Influence of pH on the population ratio of dalbavancin multimer to monomer

[00397] The influence of solution pH on the population ratio of dalbavancin multimer to monomer was evaluated at the instrumental conditions described above and at the following solution pH values: 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, and 5.5. The population ratio of dalbavancin multimer to monomer was determined at each of the pH values and plotted against pH, as seen in Figure 9. It was determined that the population ratio of dalbavancin multimer to monomer increases with increasing pH.

[00398] While not to be limited to theory, it is believed that ionic groups, such as a carboxylate group on a first dalbavancin monomer, aid in the stabilization of dalbavancin multimers by forming ionic interactions with oppositely charged ions, such as tertiary nitrogen groups, on a second dalbavancin monomer. Such ionic interactions can be influenced by pH. It is believed that the increasing tendency of dalbavancin to be present as a multimer at higher pH is indication that ionic interactions are important in multimer stabilization. In particular, it is believed that dalbavancin multimers are destabilized at lower pH, presumably due to interruption of the ionic interactions contributing to multimer stability as certain functional groups, such as carboxylate groups, may be protonated at lower pH values.

Influence of solution ionic strength on the population ratio of dalbavancin multimer to monomer

[00399] The influence of solution ionic strength on the population ratio of dalbavancin multimer to monomer was determined by mass spectrometry. The mass spectra were obtained in electrospray positive mode on a Finnigan LCQ^{Deca} ion trap instrument previously tuned and calibrated in electrospray mode using Ultramark 1621, caffeine and MRFA (L-metionyl-arginyl-phenylalanyl-arginine). All the mass spectra were recorded using the conditions listed in Table 35. The sample parameters that were investigated are listed in Table 36.

Table 35. MS Conditions

Sample Inlet Conditions:	
Capillary Temperature (°C):	200
Sheat Gas (N ₂ arbitrary units):	40
Sample Inlet Voltage Settings:	
Polarity:	positive
Source Voltage (kV):	4.70
Capillary Voltage (V):	34
Tube Lens Offset (V):	-60
Full Scan conditions:	
Scan range (amu):	500-2000
Number of microscans:	3
Maximum ion time (ms):	200
Zoom Scan conditions:	
Scan range (amu):	1218-1228
Number of microscans:	5
Maximum ion time (ms):	50

Table 36. Sample Parameters

Sample	µg/mL	Solvent	pH
Dalbavancin	100	COO ⁻ NH ₄ ⁺ 5 mM	5
	100	COO ⁻ NH ₄ ⁺ 50 mM	5
	100	COO ⁻ NH ₄ ⁺ 100 mM	5

[00400] Sample water solutions were infused at 10 µL/min via a Harvard syringe pump and the mass spectra were obtained as seen in Figures 10-12.

[00401] The obtained spectra indicate that the population ratio of dalbavancin multimer to monomer is influenced by ionic strength. An increase in buffer concentration was found to correspond to a decrease in multimer mass traces and hence a decrease in dalbavancin multimer to monomer population ratio.

[00402] As mentioned, it is believed that ionic interactions are important in dalbavancin multimer stability. The fact that increasing ionic strength was correlated with decreasing intensity of multimer mass traces substantiates the role of ionic interactions in multimer stability. However, as multimer mass traces were present even at higher ionic strengths, another, second, interaction may be involved in multimer stabilization.

[00403] While not bound to any theory, it is believed that hydrophobic interactions are important in stabilizing the multimer species of dalbavancin. If the stabilization of these non-covalent dalbavancin multimers was solely due to ionic interactions, it would be expected that an increase in ionic strength would result in total loss of multimer mass species. That is, it would be expected that as the ionic strength of the solution increases, the ionic interactions stabilizing the multimer would

75

be disrupted by the increased population of ions in solution, with which the monomers would more readily associate. Consequently, the solution ionic strength would drive the multimers to disassociate into monomer components and the resulting mass spectra would be free of any multimer mass traces. However, even at high solution ionic strength (such as 100 mM ammonium formate), the presence of dalbavancin multimers is detected in the mass spectrum. Accordingly, the multimers of dalbavancin are deemed to be stabilized, at least in part, by hydrophobic interactions.

Structurally similar compound

[00404] It is believed that the improved efficacy of Dalbavancin is due at least in part to its ability to form multimers. It is thought that this unique characteristic is not shared even by very structurally similar compounds. A compound with a chemical structure similar to Dalbavancin was investigated by mass spectroscopy analysis for its ability to form multimers. The mass spectra were obtained in electrospray positive mode on a Finnigan LCQ^{Deca} ion trap instrument previously tuned and calibrated in electrospray mode using Ultramark 1621, caffeine and MRFA (L-metionyl-arginyl-phenylalanyl-arginine). All the mass spectra were recorded using the conditions listed in Table 37. The sample parameters that were investigated are listed in Table 38. Sample water solutions were infused at 10 μ L/min via a Harvard syringe pump and mass spectra were obtained as seen in Figures 13 and 14.

Table 37. Mass Spectra Conditions

Sample Inlet Conditions:	
Capillary Temperature (°C):	200
Sheat Gas (N ₂ arbitrary units):	40
Sample Inlet Voltage Settings:	
Polarity:	positive
Source Voltage (kV):	4.70
Capillary Voltage (V):	34
Tube Lens Offset (V):	-60
Full Scan conditions:	
Scan range (amu):	500-2000
Number of microscans:	3
Maximum ion time (ms):	200
Zoom Scan conditions:	
Scan range (amu):	1218-1228
Number of microscans:	5
Maximum ion time (ms):	50

Table 38. Sample Parameters

Sample	µg/mL	Solvent	pH
Teicoplanin	50	H ₂ O	n.a.
	100	H ₂ O	n.a.

n.a. = not adjusted

[00405] A similar glycopeptide antibiotic (teicoplanin) does not show multimeric complexes in solution at various concentrations. This supports the indication that structurally similar compounds fail to form multimeric species in solution, and that this phenomenon may play an important role in the activity of the dalbavancin.

Example 12. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry of protein-dalbavancin complexes

[00406] 10 µl HSA, 0.150 mM was mixed with 10 µl dalbavancin solution (from 0.075 mM, 0.15 mM, 0.3 mM and 1.5 mM) and incubated for 60 min at 37°C. The samples were prepared for analysis using the dried droplet technique. Spectra were obtained on a BRUKER FLEX III, tof mass spectrometer previously tuned and calibrated using standard bovine serum albumin, acquiring and averaging spectra generated by 200 laser shots. Matrix: 9 parts of DHB-9 (2,5-dihydroxybenzoic acid) saturated in acetonitrile/H₂O (50:50), 1 part of sinapinic acid saturated in

76

acetonitrile/H₂O (50:50). 0.5 ul of sample solution and 0.5 ul of matrix solution were mixed and placed on the laser target.

[00407] Dalbavancin binds to the protein as the monomer (1 HSA + 1 dalbavancin). At very high dalbavancin to protein ratios (1:2, 1:10), the presence of complexes containing 2 molecules of dalbavancin per protein molecule can be observed.

Example 13. Isothermal Titration Calorimetry of Binding of Dalbavancin to *N,N'*-diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala in the presence of Human Serum Albumin

[00408] The binding of dalbavancin to *N,N'*-diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala, a peptide analog of cell-wall targets of dalbavancin, was investigated by isothermal titration calorimetry (ITC) in the presence of HSA over a range of concentrations (up to 600 μ M) at 25°C, with some additional measurements at 37°C. HSA increased the solubility of dalbavancin and reduced its binding affinity for the tri-peptide ligand. Results were compared with those for vancomycin. The observed effects plateaued at relatively low HSA concentrations, consistent with a non-competitive binding model that allows binding of ligand to dalbavancin both free in solution and (more weakly) to the dalbavancin-HSA complex.

[00409] Preliminary experiments demonstrated that, in the absence of serum proteins, dalbavancin and vancomycin show similar binding profiles: both give exothermic binding to *N,N'*-diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala, but no evidence of binding to dipeptide (D-Ala-D-Ala) or to Lys-D-Ala-D-Lactate. For dalbavancin/tri-peptide interaction, the data were consistent with binding with $K_{diss} = 1-10 \mu$ M, depending on temperature, similar to vancomycin under the same conditions. In the presence of HSA, the solubility of dalbavancin is significantly increased and the binding affinity for tripeptide is reduced in a manner consistent with competitive or non-competitive binding by HSA for the antibiotic. The experiments described in this Example were designed in order to: (a) compare dalbavancin/tri-peptide measurements at different temperatures (25 and 37°C) and different HSA concentrations; (b) use these data to construct a binding model to compare with observed numbers.

[00410] Dalbavancin was supplied by Biosearch Italia. Other reagents were from Sigma: vancomycin hydrochloride (Sigma V-2002, fw 1485.7), *N,N'*-diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (Sigma D-9904, fw 372.4), human albumin (HSA; Sigma A-3782; mw 69,366).

[00411] Antibiotics and peptides were dissolved in aqueous buffer (20mM Na phosphate, 150mM NaCl, pH 7.4) containing HSA, with gentle stirring immediately before each experiment. Peptide concentrations were determined by weight. Dalbavancin concentrations were determined either by weight or by UV absorbance using the molar extinction coefficients $\epsilon = 12430$ (dalbavancin, $A_{280}^{1\%} = 68.42$), $\epsilon_{280} = 6690$ (vancomycin). HSA concentrations were determined by UV absorbance (HSA, $\epsilon_{280} = 37,700$; $A_{280}^{1\%} = 5.44$). Spectra were recorded at room temperature in 1cm pathlength quartz cuvettes using Shimadzu UV-160A or UV-1601 spectrophotometers, with samples diluted quantitatively with buffer if necessary to give absorbance in the 0.1-1 A range.

[00412] Isothermal titration calorimetry was performed using a Microcal VP-ITC instrument at 25 °C and 37 °C using standard operating procedures. See, e.g., Wiseman et al., *Anal. Biochem.* (1989) 179, 131-137; Cooper, et al., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A-Math. Phys. Eng. Sci.* (1993) 345, 23-35; Cooper, A, Isothermal Titration Microcalorimetry in C. Jones, B. Mulloy and A. H. Thomas (Eds.), *Microscopy, Optical Spectroscopy, and Macroscopic Techniques*. Humana Press, Totowa, NJ, (1994) p 137-150; Cooper, A., Microcalorimetry of Protein-protein Interactions in J. E. Ladbury and B. Z. Chowdhry (Eds.); *Biocalorimetry: The Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. Wiley, (1998) p 103-111; and Cooper, A., *Curr. Opin. Chem. Biol.* (1999) 3, 557-563. Samples were degassed gently prior to loading to prevent bubble formation in the calorimeter cell. Each experiment typically comprised 25 x 10 μ l injections of peptide solution (≈ 1 mM) into the calorimeter cell (volume ≈ 1.4 ml) containing antibiotic solution (≈ 20 -100 μ M). Control experiments involved injection of ligand into buffer under identical conditions to determine heats of peptide dilution, and these values were used for correction of raw binding data prior to analysis. Dalbavancin/tri-peptide binding experiments were repeated several times at each temperature. ITC binding data were analyzed using standard Microcal ORIGIN™ software to determine the apparent number of binding sites (N), the binding affinity ($K_{\text{app}} = 1/K_{\text{d,app}}$) and enthalpy of binding (ΔH).

TABLE 39

Thermodynamic data for binding of tri-peptide binding to dalbavancin and vancomycin determined by ITC assuming a simple non-cooperative binding model: effects of temperature and HSA.

T	N	K _{app}	K _{diss}	ΔH	ΔS	[HSA]
°C		M ⁻¹	μM	kcal/mol	eu	μM

26
77

<u>Deba-</u> <u>vancin</u>	10	0.59	6.70E+0	1.49	-10.28	-9.60	0
			5				
	10	0.59	9.20E+0	1.09	-8.95	-4.30	0
			5				
	10	0.59	6.85E+0	1.46	-10.30	-9.60	0
			5				
	10	0.58	6.24E+0	1.60	-10.30	-9.90	0
			5				
	25	0.6	3.13E+0	3.19	-10.10	-8.90	0
			5				
	25	x	3.30E+0	3.03	-11.30	-12.60	0
			5				
	25	x	3.20E+0	3.13	-11.70	-14.00	0
			5				
	25	x	2.80E+0	3.57	-14.30	-23.00	0
			5				
	25	0.57	3.03E+0	3.30	-12.60	-17.00	0
			5				
	25	0.74	3.19E+0	3.13	-11.20	-12.50	0
			5				
	25	0.54	3.93E+0	2.54	-12.90	-17.60	0
			5				
with HSA	25	0.37	1.18E+0	8.47	-26.40	-65.50	13.6
			5				
with HSA	25	0.35	1.18E+0	8.47	-27.80	-70.10	13.6
			5				
with HSA	25	0.68	3.50E+0	28.57	-20.00	-46.20	34.2
			4				
with HSA	25	0.83	2.76E+0	36.23	-16.90	-36.50	80.7
			4				

WO 2006/078277				PCT/US2005/014355			
with HSA	25	1.38	3.49E+0	28.65	-18.60	-41.70	104
			4				
with HSA	25	0.9	3.10E+0	32.26	-21.05	-50.00	288
			4				
with HSA	25	1.242	2.84E+0	35.21	-19.50	-44.90	430
			4				
with HSA	25	0.86	2.18E+0	45.87	-15.00	-30.40	601
			4				
	37	0.82	1.30E+0	7.69	-12.50	-16.80	0
			5				
	37	0.6	1.10E+0	9.09	-17.40	-33.20	0
			5				
with HSA	37	0.179	1.25E+0	80.00	-98.60	-299.00	482
			4				
with HSA	37	0.5	9568	104.52	-26.60	-67.60	516
<u>Vancomycin</u>	10	1.1	6.90E+0	1.45	-9.49	-6.80	0
			5				
	25	0.91	3.40E+0	2.94	-10.70	-10.60	0
			5				
	25	0.97	3.60E+0	2.78	-12.90	-17.80	0
			5				
with HSA	25	1.05	2.90E+0	3.45	-10.09	-8.80	513
			5				

[00413] ITC experiments on the binding of tri-peptide to dalbavancin in the absence of HSA give consistent data for binding affinities, with average K_{diss} in the region of 1.4, 3.1, and 8.4 μ M at 10, 25, and 37 °C respectively (Table 39). Binding is exothermic. Concentration calculations here indicate that N is closer to 0.5 under these conditions. This is consistent with the binding of one tri-peptide molecule per dalbavancin dimer under these conditions. These binding affinities and enthalpies of binding are comparable to those observed with vancomycin under the same conditions

(Table 39, and D. McPhail, A. Cooper, *J. Chem. Soc.-Faraday Trans.* (1997) 93, 2283-2289.). Note also that vancomycin undergoes ligand-induced dimerization at higher concentrations.

[00414] Addition of HSA to the dalbavancin mixtures reduces the apparent binding affinity between tri-peptide and dalbavancin, though the binding is apparently more exothermic (Table 39). The HSA concentration dependence for this at 25 °C is shown in Figure 15. After an initial rise (weakening) in apparent K_{dlm} up to 35 μ M HSA, it remains relatively constant for higher HSA concentrations approaching physiological levels (600 μ M). The plateau level at high concentrations of HSA ($K_{dlm} \approx 35 \mu$ M) corresponds to around 10-12x weaker binding affinity than in the absence of HSA. A similar reduction is seen at 37 °C.

[00415] The HSA effect was not due to interaction with the tri-peptide. Control ITC experiments for binding of vancomycin to tri-peptide in the presence of HSA gave results comparable to those seen in the absence of HSA (see Table 39). This indicates that neither the peptide nor the closely related antibiotic, vancomycin, interact with HSA in solution. It follows that any effect of HSA on dalbavancin/tri-peptide interaction must be due to interaction between HSA and dalbavancin.

[00416] Although not wishing to be bound by theory, the above data are consistent with a non-competitive binding model. This model assumes that the tri-peptide ligand (L) can bind to dalbavancin (D) both in the free state and (possibly with different affinity) in the dalbavancin-HSA complex.



Apparent (observed) ligand binding dissociation constant (non-competitive):

$$K_{app,L} = [total D][L]/[total DL complex]$$

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

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

[00417] This shows a hyperbolic dependence of $K_{app,L}$ on free HSA concentration that agrees well with the observed data (Figure 15). At high [HSA] this reaches an asymptotic (plateau) value

$$K_{app,L} = K_{LDHSA} \text{ (for large [HSA])}$$

[00418] This suggests that the binding affinity for tri-peptide is around 35 μ M when dalbavancin is bound to HSA, compared to 3 μ M for free dalbavancin (25 °C figures).

[00419] Further mechanisms may be suggested in terms of whether dalbavancin is acting as a monomer or a dimer in its interactions with peptides or proteins. Direct comparison of dalbavancin with vancomycin (which shows unambiguous 1:1 binding at these low concentrations) shows that binding is complete at lower molar ratios (lower N) for dalbavancin (Figure 16). This is consistent with a 2:1 dalbavancin:peptide complex.

[00420] However, in the presence of HSA, the apparent N values increase (Table 39), and may be more consistent with 1:1 complexation. Although not wishing to be bound by theory, the model shown in Figure 17, showing the possible interaction of dalbavancin monomers and dimers with tri-peptide ligands and HSA, is consistent with these observations. Figure 17A depicts dalbavancin as in monomer-dimer equilibrium in solution (predominantly as dimer), but binding as monomer to two separate sites on HSA. This is consistent with the $N = 0.5$ values observed by ITC for binding of serum proteins to dalbavancin (Example 3). Figure 17B depicts ligand binding to the dalbavancin dimer in solution, and (more weakly) to the dalbavancin monomers attached to HSA. This is consistent with the non-competitive binding of dalbavancin to both tri-peptide and to HSA, with variable apparent stoichiometries.

[00421] In sum, this Example shows that HSA reduces the binding affinity of dalbavancin for tri-peptide ligand in a manner consistent with a non-competitive mechanism and that dalbavancin bound to HSA retains its ability to bind tri-peptide ligands, albeit with reduced affinity. These results are also consistent with a model in which dalbavancin is in monomer-multimer equilibrium, predominantly multimeric in solution, with strong affinity of multimers for peptide ligand. Dalbavancin monomers, both free and bound to serum albumin, may also bind peptides with a reduced affinity.

Example 13. A-40926 and Dalbavancin Preparations**Preparation of A-40926**

[00422] A-40926, the natural glycopeptide produced by fermentation, was the starting material for producing Dalbavancin. It was produced by a *Nonomura sp* ATCC 39727 as a mixture of A-40926 and its acetyl derivative (see U.S. Patent No. 4,935,238 and B. Golstain et al. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, Dec. 1987, p.1961-1966). The acetyl derivative was first deacetylated to A-40926. After deacetylation, A-40926 was purified by column chromatography on polyamide as described below. The following description is representative of the current production method. The amounts reported here are about 1/4 of the amounts usually worked in an industrial preparation.

Deacetylation of A-40926

[00423] 10 m³ of fermentation broth (23 °C) containing a total of about 1 g/L of A-40926 and its acetyl derivative were adjusted, under stirring, at pH 11.4 with NaOH 30 %. Stirring was continued for 6 hours, then the temperature was reduced to 15 °C and the broth was microfiltered (Koch Protosep IV Microfilter with a 0.12 m² ceramic membrane 0.1µ). During microfiltration, water was continuously added to the retentate in order to obtain, at the end of the process, a permeate of 20-25 m³ and a retentate of 4.5-5 m³ (one half of the starting value).

[00424] The permeate, which contained A-40926, was analyzed by HPLC. When the deacetylation was completed, the pH of the permeate solution was adjusted at pH 7 with 30 % sulfuric acid (stored at 20 °C). In this example, 25 m³ of filtered broth containing 6.62 Kg of A-40926 (268 mg/L) was obtained. The deacetylation yield was 66.2 %. If the microfiltration process was carried out for longer time and higher extraction volume than those employed in this process, the yield can be increased up to 90 %.

Purification of A-40926 on polyamide column

[00425] After extraction, A-40926 contained in filtered broth was purified on a polyamide column, as described below. The amount reported in this description is about 1/10 of the amount usually worked in an industrial preparation and is representative of the current production method.

[00426] 500 L of polyamide resin SC6 (from Macherey Nagel) were suspended in demineralized water and loaded into a column. The resin was then conditioned at pH 6-6.5 by eluting the column with at least 2 BV (bed volume) of a buffer solution prepared by dissolving 4 Kg of sodium carbonate in 800 L of water and adjusting the pH of the resulted solution with acetic acid.

[00427] The A-40926 filtered broth (9000 L; assay 0.275 mg/L; A-40926 2475 g; pH 6±0.2; temperature 10±3 °C) was loaded into the column at about 5 g of activity per liter of resin (activity/resin ratio of 5-8 g/L was usually used). The column was washed with the following solutions: 3 BV (1500 L) of a solution at pH 6 prepared by dissolving 7.5 Kg of sodium carbonate in 1500 L of demineralized water and adjusting the pH with acetic acid; 4 BV (2000 L) of a solution at pH 8 prepared by dissolving 10 Kg of sodium carbonate in 2000 L of demineralized water and adjusting the pH with acetic acid; 1.5 BV (750 L) of a solution at pH 9 prepared by dissolving 4 Kg of sodium carbonate in 750 L of demineralized water and adjusting the pH with acetic acid.

[00428] A-40926 was recovered from the column by eluting with 4 BV (2000 L) of a buffer solution at pH 10 prepared by dissolving 10 Kg of sodium carbonate in 2000 L of demineralized water and adjusting the pH with acetic acid. The fractions containing purified A-40926 (concentration of A-40926 greater than 0.5 g/L and HPLC area % of the main component (Bo+B₁) greater than 80 %) were collected, neutralized with 1N HCl, and analyzed by HPLC. About 2000 L of final clear solution were obtained.

[00429] The resin used for the purification was regenerated with 1.5 BV of 1:1 mixture of isopropanol / 5 % NaOH followed by a washing with 5 BV of demineralized water.

A-40926 concentration

[00430] The solution coming from the column was subject to several rounds of dilution/concentration steps to eliminate most of the inorganic salts in the solution. The solution was concentrated to 80 L by nanofiltration using a membrane with a cut-off of 250 D, diluted with 80 L of demineralized water, and re-concentrated at the starting volume (80 L) by nanofiltration. This operation was repeated at least 5 times. The pH of the final solution (80 L, pH 7.5) was adjusted at pH 6.3 with 23 % HCl. The solution was then diluted with 80 L of acetone, and its pH was adjusted again at pH 2.6 with 23 % HCl.

Decoloring

[00431] 680 g of charcoal PA 200 C (~0.3g/g A-40926) was added under stirring to the solution obtained in the above step (160 L). Stirring was continued for at least 30 minutes at room temperature, then about 0.5-0.6 Kg of filter aid (DIF-BO) was added. The mixture was filtered through a filter cartridge. The clear solution obtained was concentrated under *vacuo* (45 °C) in order to reduce the acetone below 10 %. The final volume was about 100 L. The pH was then

*
80

adjusted at 6.7 with aq. NaOH, and the concentration step was continued using the usual nanofilter until the A-40926 concentration was around 100 g/L. 20 L concentrated solution was obtained (A-40926 1884 g, 94.2 g/L).

Precipitation and drying

[00432] The previous solution was diluted under stirring with 20 L of acetone, and its pH was adjusted at 5.1 with 10 % HCl. To this solution additional 5 volumes of acetone (100 L) were added to complete the A-40926 precipitation. If water content was not <15% at this point, additional acetone was added. After 2 hours the suspension was centrifuged, and the solid was washed with 3 x 10 L of fresh acetone. The mother liquors were analyzed and discharged after having ascertained the absence of product.

[00433] Solid A-40926 was dried under reduced pressure at 30-35 °C in a static drier until the residual acetone was below 2 % and the water was less than 10 %. The product was then sieved through a 50 mesh sieve obtaining 2.08 Kg of purified A-40926 (HPLC assay 81.4 %; water 6.2 %; sulphated ashes 4.8 %). The yield, starting from the activity loaded on the column, was 68.4 %.

Synthesis of Dalbavancin

[00434] Dalbavancin (BI-397) was prepared from the natural glycopeptide A-40926 through a three-step synthesis as described in Malabarba and Donadio (1999), *Drugs of the Future*, 24(8):839-846. Specifically, A-40926 was first subject to an esterification step to make MA, which was then subject to an amidation step to make MA-A-1. A final hydrolysis step then converted MA-A-1 into dalbavancin.

Esterification step (Step 1)

[00435] The following description is representative of the current method in use.

Preparation of H₂SO₄ 96%/MeOH (Solution A)

[00436] In a 15 L round bottomed flask equipped with a mechanical stirrer and a thermometer, 2.28 L of H₂SO₄ 96% (~300 mL of H₂SO₄ 96% per Kg of A-40926 powder) was added drop wise to 7.9 L of MeOH. An external ice bath was used to maintain the temperature between 0 and 5 °C.

Reaction procedure

[00437] Starting material A-40926 (7.6 kg; batch 019, assay 85.09 %; activity 6.46 kg; 3.73 mol) was suspended in a 140 L glass-lined reactor in MeOH (46 L), and the resulting suspension was cooled at $0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. At this temperature the suspension was treated with the previously prepared Solution A ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$). The resulting solution was stirred at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 22-26 hours while the reaction (a reaction aliquot diluted 100 times with 1:1 acetonitrile/water mixture) was monitored by HPLC analysis every two hours. The esterification was considered complete when the residual A-40926 was less than 5 % and diester was not more than 10 % as HPLC area %.

Ester (MA) Isolation

[00438] When the reaction was complete, the mixture was cooled at $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) and diluted with a same volume of cold water (54 L) maintaining the temperature below $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. The product (MA) was precipitated by adjusting the pH of the solution at 5.5 (± 0.2) by slowly adding 10.2 L of triethylamine (TEA). Stirring was continued for an additional hour at $0\text{--}2\text{ }^{\circ}\text{C}$, then the solid obtained was centrifuged, washed with water (10 L per Kg of A-40926) and finally with MeOH (3 L of MeOH per Kg of starting A-40926) previously cooled at $10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Washing with water was done primarily to remove sulphates from MA.

[00439] Mother liquors and washings were separately analyzed and discharged if contained less than 1-2 % of activity. The product was dried *in vacuo* (50 mmHg) at $35\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (external temperature) until the residual water was less than 10 %. 7.6 Kg of MA (5.63 kg activity, 3.23 mol) was obtained as a brownish powder.

[00440] The analysis showed the following values of HPLC area %: MA 89.8,

[00441] A-40926 3.2, Diester derivative 5.9. The HPLC assay was 74.2 %, activity 5.637 Kg; 3.23 mol; yield = 86.5 %. This material was used in the following step without any further purification.

Amidation step (Step 2)

[00442] The following description is representative of the current production method.

Preparation of the DMSO / HCl mixture (Solution B)

[00443] DMSO (1.6 L) was placed into a 10 L round bottomed flask, equipped with a mechanical stirrer and a thermometer, and cooled with an ice bath below $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. HCl 37% (1 L) was then slowly added under stirring maintaining the temperature of the mixture below $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Amidation procedure (production of MA-A-I)

[00444] Starting material MA 5.95 kg (assay 76.3 %, KF 8.9 %; 2.68 mol) was slowly dissolved under stirring in 19.2 L of 1:1 DMSO / MeOH mixture (~1.6 L DMSO and 1.6 L MeOH per Kg of MA powder) at room temperature. After 1 hour of stirring 709 mL of 3-(dimethylamino)-propylamine (DMEPA, MW 102.1; density = 0.812 g/mL; 5.63 mol; 1.96 mols per mol of starting MA) and 325 g of 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBT·H₂O; MW 153.1; 2.04 mol; 0.71 mol per mol of starting MA) were added to the reaction mixture. Stirring was continued until a complete solution was obtained, then the mixture was adjusted at pH 3-3.1 (measured after diluting an aliquot of the reaction 10 times with water) by slowly adding about 2.0 L of Solution B (DMSO/HCl).

[00445] A dicyclohexylcarbodiimide (DCC) solution, prepared by dissolving 1.03 Kg of DCC (4.99 mol; MW 206.3; 1.74 mol per mol of MA) in 4.1 L of 1:1 DMSO/MeOH mixture, was added to the stirred reaction mixture in 10 minutes. Stirring was continued for 5 hours, then additional 51.5 g of solid DCC (0.25 mol) was added to the reaction mixture in order to lower the residual MA under 5%, maintaining the level of isoureas lower than 4-5 %. Isoureas are a group of by-products produced by further reaction of Dalbavancin with the excess of DCC.

[00446] Typically after 2 additional hours (7 hours total) the reaction was completed. At the end the mixture was diluted with water (60 L) to lower the DMSO concentration to 15 % (v/v) and adjusted at pH 2.3 with HCl 1N (0.85 L) to destroy any residual DCC.

Hydrolysis of MA-A-1 to Dalbavancin (Step 3)

[00447] After 30 minutes the mixture was adjusted at pH 12.0-12.1 with 15 % NaOH (8 L). Stirring was continued for 4 hours maintaining the mixture at this pH with small additions of NaOH 15%. After this time the residual MA-A-1 was less than 0.2 % as HPLC area %.

[00448] The mixture was then acidified at pH 3.0 with 1N HCl (19 L), and the suspension was filtered to remove the dicyclohexylurea formed. The solid cake was washed on the filter with demineralized water (2x20 L). Washings and filtrate were gathered together, obtaining a clear solution which was analyzed by HPLC. 152.8 L of solution containing 21.74 g/L of Dalbavancin (total activity 3322 g; 1.828 mol, yield = 68.2 %) was obtained.

Purification of dalbavancin

[00449] The following description is representative of the current production method.

[00450] The 152.8 L of solution obtained from the hydrolysis step and containing 3322 g of Dalbavancin activity was split into two parts and each one was purified separately on the same

chromatographic column containing 400 L of polyamide. In these two purification runs the activity/resin ratio were 4.3 and 4.0 g/L respectively.

Polyamide column preparation

[00451] The glass-lined column (internal diameter = 40 cm, h = 320 cm) containing 400 L of polyamide resin was cleaned according to the resin regeneration procedures (see below) and conditioned with 2 BV (800 L) of demineralized water acidified with 4 L of AcOH (pH = 3.2).

Purification of the first portion

[00452] The first portion of 76.4 L of starting solution was diluted with H₂O (56 L) in order to lower the DMSO content under 5% (v/v), and acidified to pH 2.78 with 1 N HCl (3.4 L). This solution was then loaded onto the column at a flow rate of 150 L/h. After loading, the resin was washed with the following solutions: 4 BV (1600 L) of H₂O acidified with AcOH (8 L), pH = 3.2; 5 BV (2000 L) of AcONa 0.1 M, pH = 8.2; 1 BV (400 L) of H₂O acidified with AcOH (1 L), pH = 3.2. Dalbavancin was eluted with 4 BV (2400 L) of H₂O/MeOH (8:2) acidified with AcOH (6 L), pH = 3.4.

[00453] During the elution step, 22 fractions of 50-60 L each were collected and analyzed by HPLC. Fractions from 9 to 25 (concentration of Dalbavancin higher than 0.5 g/L and HPLC area % of (B₀+B₁) ≥ 80%) were pooled together, obtaining 969 L of solution with 1.56 Kg of Dalbavancin (yield = 93.9 %). This solution was then concentrated by nanofiltration, obtaining 125.7 L of solution with 1.38 Kg of Dalbavancin. 850 L of permeate, containing 145 g of impure Dalbavancin (8.7 %), were neutralized and discharged.

Resin regeneration

[00454] Before re-using the resin was washed with the following solutions: 2.5 BV (1000 L) of 1:1 MeOH /water acidified with acetic acid (2.5 mL/L); 2.5 BV (1000 L) of 1:1 0.5 % NaOH / isopropanol; 10 BV (4000 L) of demineralized water. The resin was then re-equilibrated with BV (800 L) of water acidified with acetic acid (2.5 mL/L).

Purification of the second portion

[00455] The second portion of the starting solution coming from the hydrolysis step (76.5 L) was diluted with H₂O (56 L) to lower the DMSO content under 5% (v/v) and acidified to pH 2.87 with 3.0 L of 1 N HCl. The portion was then purified as previously described in the purification of the

27.
82

first portion. The pooled fractions (vol. = 972 L, Dalbavancin 1.54 Kg, yield = 92.7 %) were concentrated by nanofiltration, obtaining 133 L of solution with 1.46 Kg of activity. 850 L of permeate, containing 73 g of Dalbavancin (4.3 %), was discharged.

[00456] The concentrated solutions coming from the two purification steps were re-analyzed and pooled together giving 258 L of solution containing 2840 g of purified Dalbavancin. The purification yield was 86 %. The total yield, starting from MA, was 58.3 %.

Final polyamide regeneration

[00457] After the second purification run polyamide was regenerated with: 2.5 BV of 1:1 MeOH-water, acidified with AcOH (2.5 L) at pH =3.4; 2.5 BV of 1:1 0.5 % NaOH-isopropanol; 10 BV of demineralized water.

Decoloration and precipitation of Dalbavancin

[00458] 1.5 mol of 1N HCl per mol of Dalbavancin and 0.3 g of charcoal CG1 (0.85 Kg, from NORIT) per gram of Dalbavancin were added to the 258 L solution obtained above. The mixture was stirred at room temperature for at least 45 min. The pH was 3.1. The suspension was then filtered on a SUPRA DISC cartridge mod. SDP-EK1 from SEITZ-SCHENK, and the cake was washed with 50 L of H₂O/MeOH 8:2. The filtrate was analyzed and concentrated again by nanofiltration, using a MPS 44 membrane with a cut off of 250 D. 21.3 L of concentrated solution containing 119 g/L of Dalbavancin (pH 4.1; MeOH 1.9 %,GC) was obtained. 909 mL of 1 N HCl was finally added to adjust the pH at 2.63, which corresponds to the salification ratio of 1.65 mol_{HCl}/mol_{Dalbavancin}.

[00459] The solution (22.2 L) was poured out, under stirring, in 200 L of acetone. The solid obtained after decanting was centrifuged and washed with 14 L of fresh acetone. The product was then dried under reduced pressure (50 mmHg) at 35°C, maintaining the internal temperature under 30 °C for 17 hours. During the drying process, 1 L of low endotoxin water (<250 EU/mL), divided in two portions of 0.5 L each, was sprayed on the solid after three and five hours in order to remove the residual acetone that otherwise is difficult to eliminate. The product was then sieved (50 mesh), obtaining 2592 g of Dalbavancin (HPLC Assay 82.4 %; water (KF) 14 %; Cl⁻ 3.0 %).

Example 14. Alternative Methods for A-40926 and Dalbavancin Preparation

[00460] The methods described below are alternative methods that can be used in the A-40926 and Dalbavancin preparation process.

A-40926 Preparation on XAD-7 HP

Deacetylation and mycelium microfiltration

[00461] 150 L of fermentation broth containing A-40926 (pH 7) were stirred in a suitable reactor at room temperature (24 °C), and adjusted at pH 11.5 with a 2.5 N NaOH solution (2.5L). After 4 hours of stirring, the broth was adjusted at pH 10.6 with 15 % HCl, and microfiltered through a 0.2 micron membrane. 439 L of clear permeate was collected and then concentrated by nanofiltration using a MPS 44 membrane with a 250 D cut off. The A-40926 concentrated solution obtained (58.6 L; 3.89 g/L) was adjusted at pH 6.4 and stored at 4°C until used.

Column preparation and purification.

[00462] XAD-7 HP resin (8L) was suspended in a 1:1 water/methanol solution, filtered, and loaded into a proper glass-column (internal diameter 12 cm) with a peristaltic pump.

[00463] The resin was then washed with water and equilibrated with 6 BV of a sodium carbonate aqueous solution buffered at pH 6 prepared by dissolving 5 g of sodium carbonate per liter of water and adjusting the pH with acetic acid.

[00464] A portion of concentrated broth containing 194 g of A-40926 was loaded into the XAD-7 HP column. The resin was then washed with the following two buffered solutions, at a flow rate of ½ BV /hour, in order to eliminate part of the hydrophilic and the colored substances present: 3 BV (24 L) of aq. 0.5 % Acetic Acid solution adjusted at pH 5 with 30 % sodium hydroxide; 5 BV (40 L) of a 8:2 mixture water/acetone with 5 mL of acetic acid / L of water.

[00465] A-40926 was finally eluted with 8 BV (64 L) of a 1:1 water/acetone mixture acidified with 5 mL of acetic acid / L of water. 16 fractions of 4 L each were collected. The rich fractions (from 5 to 15) in which A-40926 concentration was greater than 0.5 g/L were gathered together obtaining a solution containing 163.4 g of A-40926 (43 L, 3.8 g/L). The column yield was 81.3 %. The other fractions (200 L) containing 0.23 g/L (45.3g; 22.2 %) of less pure A-40926 were discharged.

[00466] After the elution the resin was regenerated with 6 BV (55 L) of NaOH 0.5% / isopropanol (1:1) mixture, and finally washed to neutral with 10 BV of water.

Charcoal treatment.

[00467] The collected fractions were adjusted at pH 2.5 with HCl 37% (70 mL) and then decolorized with 50 g charcoal type PA 200 (0.3 g/g of A-40926). The suspension obtained was stirred for 2 hours at room temperature and then filtered through a KS 50 filter (d=25 cm, time = 2.5 hours), obtaining 45.6 L of a slightly yellow A-40926 solution (3.5 g/L; yield=96.4 %).

Concentration.

[00468] The decolorized solution was adjusted at pH 7 with NaOH 30% (230 mL) and concentrated by nanofiltration and ultrafiltration. The use of these techniques was important for the elimination of the hydrophilic substances that were detected on the HPLC chromatograms at Rt = 2-4 minutes. When the retentate was concentrated to 1/10 of the starting volume (4 L), the same volume of water was added and the solution obtained was concentrated again. This concentration/dilution step was repeated three times in order to reduce the residual acetone to 0.25 %. The final solution (2.2 L, 146.3 g of A-40926, 66.5 g/L, yield=91.5%) was analyzed by HPLC. The purification yield was 75.4 %.

A-40926 crystallization.

[00469] A 300 mL portion of the A-40926 solution (19.9 g of A-40926) was further concentrated to 100 mL by using a laboratory scale ultrafilter and then heated at 60-65 °C. The pH of this solution was adjusted at 7 (30% NaOH), and 1.2 mL of 5:1 acetone/isopropanol mixture per mL of concentrated solution was added drop wise at this temperature. The resulted mixture was left to cool at 20 °C. After 1.5 hours, the solid obtained was filtered, washed on the filter with acetone, and dried at 40 °C for 15 hours. 20.6 g of product (HPLC assay 82.0 %; A-40926 16.9 g) was obtained. The precipitation yield was 84.9 %. The overall yield, starting from the filtered broth, was about 64 %.

A-40926 Preparation on CG -71**Column preparation**

[00470] CG-71 resin (350 mL) was poured into a glass-column (internal diameter = 4 cm) and washed with water. The resin was equilibrated with 3 BV of a sodium carbonate solution, prepared by dissolving 5 g of sodium carbonate in water at pH 6 with acetic acid. 250 mL fermentation broth (pH 7) containing 14.7g of A-40926 was loaded into the column (42 g/L resin). The resin was washed with the following three solutions: 1050 mL (3 BV) of aqueous solution of sodium carbonate (5 g/L) adjusted at pH 6 with acetic acid; 1750 mL (5 BV) of aqueous solution of sodium carbonate (5 g/L) adjusted at pH 8 with acetic acid; 3150 mL (9 BV) of aqueous solution of sodium carbonate (5 g/L) adjusted at pH 9 with acetic acid.

[00471] The activity was then eluted with 10 BV of demineralized water. 20 fractions of 500 mL each were collected. Fractions 12 to 15 were pooled together, obtaining 2.2 L purified solution containing 11.7 g of A-40926 (yield = 79.6 %). This solution was then concentrated by ultrafiltration and the concentrate solution was further diluted with demineralized water and ultrafiltered again. The solution obtained was further concentrated under reduced pressure to 50 mL.

A-40926 crystallization.

[00472] The concentrated solution was heated at 60 °C and treated under stirring with a 5:1 acetone/IPA mixture (60 mL). The mixture was then slowly cooled at room temperature. The solid obtained was filtered, washed with acetone on the filter, and dried under vacuum at 35 °C for 80 hours. 8.9 g of purified A-40926 (HPLC assay 84.2 %) was obtained. The overall yield was 51 %.

Alternative amidation step in dalbavancin synthesis using N-Methyl-2-pyrrolidine (NMP) as a solvent

[00473] MA mixture was added portion wise under stirring to a 1:1 NMP/MeOH mixture (64 mL). Stirring at 20-25 °C was continued until complete solution, then DMEPA (2.42 mL; 1.96 mol/eq_{MA}) and HOBT (1.06 g; 0.71 mol/eq_{MA}) were added. The pH of the reaction mixture (checked on a sample diluted 1:10 with water) was adjusted to 3.0 with 9.37 mL of 15% HCl in NMP (previously prepared from 34.0 mL HCl 37% dissolved in 57.7 mL NMP). Then a solution of DCC (3.17g; 1.57 mol/eq_{MA}) in NMP/MeOH 1:1 (12.7 mL) was added under stirring. The reaction was monitored by HPLC. The reaction was complete after about 6 hours (MA-A-1 88.9%, MA 7.3%, ISO 3.7%). This experiment suggests that NMP can be a convenient alternative to DMSO for the amidation reaction. The whole process was not influenced by this solvent change and the final Dalbavancin obtained was chemically equivalent to other batches.

Alternative method of Dalbavancin preparation: One-pot procedure

[00474] 10 g of A-40926 complex (HPLC titer 80.66%, 4.6 mmole) was suspended in 24 mL of MeOH under stirring at room temperature in a 100 mL glass reactor. The mixture was cooled at 0°C, and a solution of 4 g of HCl (g) in 16.4 mL of MeOH was added to complete the product solubilization. The temperature was then left to rise to 20°C while stirring was continued for additional 24 hours.

[00475] After this time, 40 mL of DMSO and 0.4 g of HOBt were added to the reaction mixture.

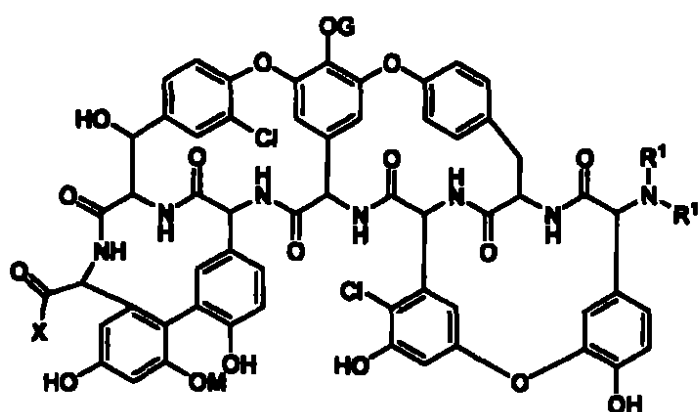
[00476] 1,1-dimethylamine propylamine was then added, adjusting the pH of the resulting reaction mixture between 3-3.1 (measured after diluting a sample 9:1 with water). 1.8 g of solid DCC was then added and stirring was continued for additional 15 hours. After this time the reaction mixture was transferred in a 1 L glass reactor and diluted with 80 mL of water. The pH was then brought to 12 by adding 240 mL of 15% NaOH. Stirring was continued for additional 60 minutes, and the mixture was acidified at pH 2.8 with 260 mL of 15% aq. HCl. About 800 mL of final clear solution containing 6.4 g of Dalbavancin was obtained (yield = 76%).

[00477] HPLC analyses showed that the profile of the product obtained is comparable with that obtained with the other manufacturing processes.

N¹³, N¹³-Dialkyl Antibiotic Compounds

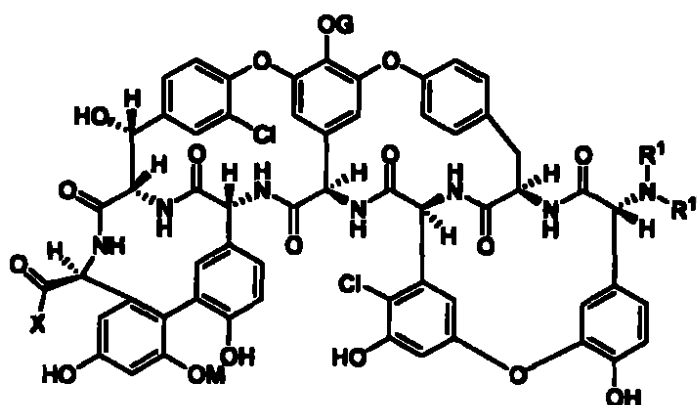
[00478] The present invention provides N¹³, N¹³-dialkyl antibiotic compounds useful, for example, for preventing and/or treating microbial infections in mammals. For convenience, in the description herein, dalbavancin compounds are numbered according to U.S. Patent 5,750,509 and as depicted in Fig. 26.

[00479] In certain embodiments, the present invention provides N¹³, N¹³-dialkyl antibiotic compounds according to formula (III), or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof:



(III).

[00480] In certain embodiments, the present invention provides N'^{3}, N'^{3} -dialkyl antibiotic compounds according to formula (IV), or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof:



(IV).

[00481] Formulas (III) and (IV) provide the peptide core of the N'^{3}, N'^{3} -dialkyl antibiotic compounds of the invention. The peptide comprises seven amino acids with the amino terminus at the right side, as depicted in formulas (III) and (IV), and the carboxy terminus at the left. According to this aspect of the invention, the N'^{3}, N'^{3} -dialkyl antibiotic compounds comprise two alkyl substituents on the amino terminal nitrogen, or N'^{3} . In other words, in formulas (III) and (IV) R^1 and R'^1 are alkyl.

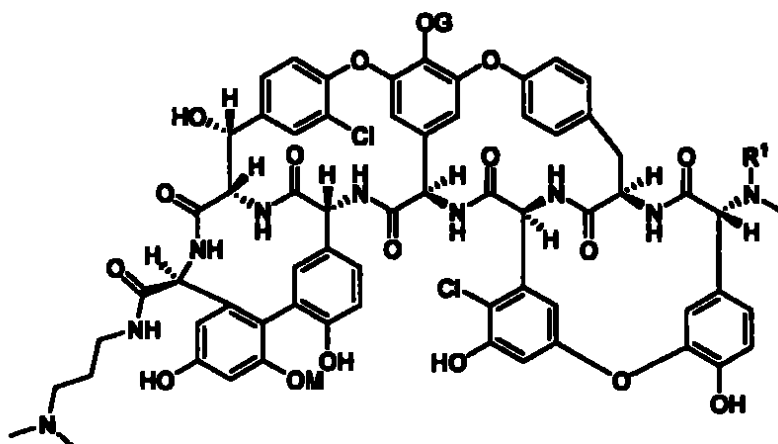
[00482] In preferred embodiments, R^1 and R'^1 are C_{1-4} alkyl. In certain embodiments, R^1 and R'^1 are each independently selected from propyl, ethyl and methyl. In further embodiments, R^1 and R'^1 are each independently selected from ethyl and methyl. In more preferred embodiments, at least one of R^1 and R'^1 is methyl. In most preferred embodiments, R^1 and R'^1 are methyl.

[00483] The remainder of the molecule can be modified in the same manner as dalbavancin compounds known to those of skill in the art. Accordingly, X is an aminoalkylamino group, as

85

defined in the sections above. Exemplary aminoalkylamino groups are described in U.S. Patent No. 5,750,509. In certain embodiments, X is *N,N*-dimethylaminopropylamino.

[00484] Thus, in particular embodiments, the invention provides compounds according to formula (V), or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof:

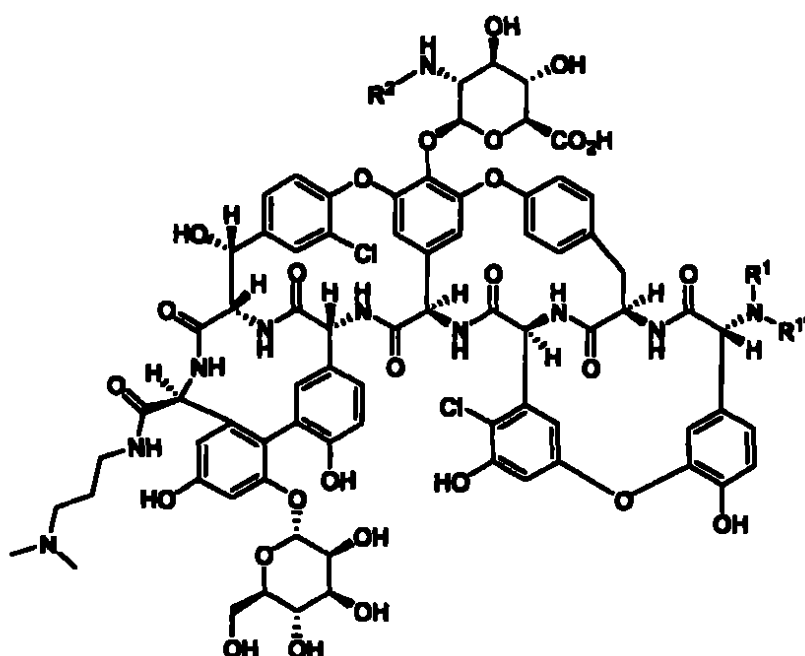


(V).

[00485] The *N*¹³, *N*¹⁵-dialkyl antibiotic compounds of the invention can be glycosylated in one or more positions, as is known to those of skill in the art. In preferred embodiments, the *N*¹³, *N*¹⁵-dialkyl antibiotic compounds are glycosylated at positions G and M of formula (III) or (IV). In particular embodiments, M is hydrogen or a sugar moiety. For example, M can be hydrogen, α -D-mannopyrannosyl or 6-O-acetyl- α -D-mannopyrannosyl. In particular embodiments, G is hydrogen or a sugar moiety. For example, G can be hydrogen or glucuronamine.

[00486] In certain embodiments, one or both of the sugar moieties can be acylated or acetylated, or both. For example, when G is glucuronamine, the glucuronamine moiety can be acylated with a fatty acid. The fatty acid can be any fatty acid known to those of skill in the art. In particular embodiments, the fatty acid is selected from the group consisting of 8-methyl nonanoic acid, n-decanoic acid, 9-methyl-decanoic acid, n-undecanoic acid, 10-methyl-undecanoic acid, n-dodecanoic acid, 11-methyl-dodecanoic acid, n-tridecanoic acid, 12-methyl-tridecanoic acid and n-tetradecanoic acid. In preferred embodiments, the fatty acid is a C₁₂ fatty acid. In particular embodiments, the fatty acid is 10-methyl-undecanoic acid.

[00487] In certain embodiments, the present invention provides a compound according to formula (VI), or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof:



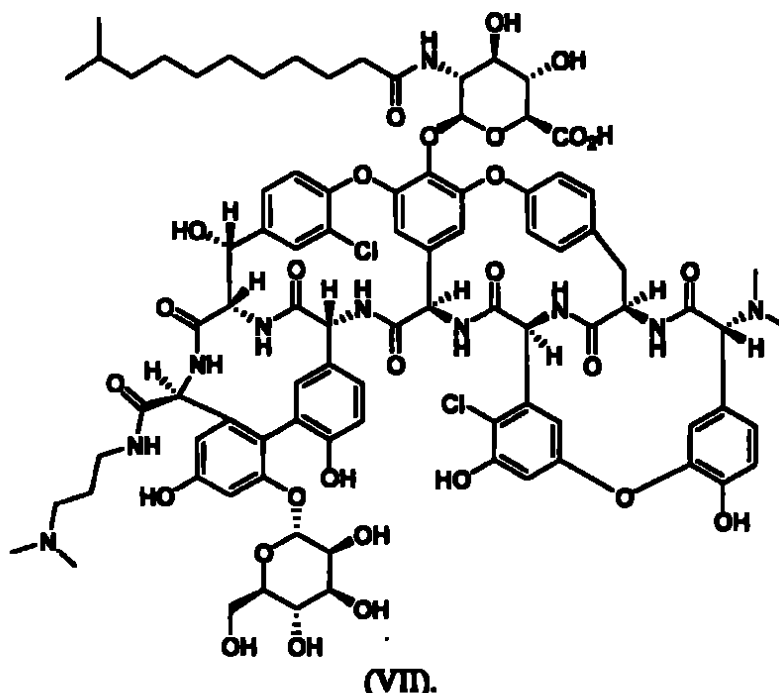
(VI).

[00488] In formula (VI), R^2 is C_{10-14} acyl. In particular embodiments, R^2 is selected from the group consisting of 8-methyl nonanoic acid, *n*-decanoic acid, 9-methyl-decanoic acid, *n*-undecanoic acid, 10-methyl-undecanoic acid, *n*-dodecanoic acid, 11-methyl-dodecanoic acid, *n*-tridecanoic acid, 12-methyl-tridecanoic acid and *n*-tetradecanoic acid. In preferred embodiments, R^2 is a C_{12} fatty acid. In particular embodiments, R^2 is 10-methyl-undecanoic acid.

[00489] As described in the synthetic sections below, N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compounds can be synthesized from dalbavancin compounds. Accordingly, certain N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compounds of the invention possess the sugar moieties and fatty acids of dalbavancin A_0 , A_1 , B_0 , B_1 , C_0 and C_1 .

[00490] In particular embodiments, the present invention provides N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compounds. An N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compound comprises formula (I) or (II) with two methyl groups at N'^{JS} . N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compound can be glycosylated with one or more sugar moieties as described above. In certain embodiments, a N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compound is acylated on one or more of these sugar moieties. In preferred embodiments, the acyl group is 10-methyl-undecanoic acid.

[00491] In preferred embodiments, the present invention provides the N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compound according to the following structure (VII), or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof:



[00492] In certain embodiments, the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention is purified. As used herein, the term purified indicates that the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound is enriched relative to other dalbavancin compounds in a composition. For example, the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound can be enriched relative to a mixture in which the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound is produced, for instance a mixture derived from a fermentation broth as described in the examples below. In certain embodiments, the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound is enriched two, three, five, ten, one hundred, one thousand or ten thousand fold.

[00493] In further embodiments, the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound is isolated. As used herein, the term isolated indicates that the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound is enriched relative to non-dalbavancin compounds in a composition. For example, the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound can be enriched relative to a mixture in which the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound is produced, for instance a mixture derived from a fermentation broth as described in the examples below. In certain embodiments, the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound is enriched two, three, five, ten, one hundred, one thousand or ten thousand fold.

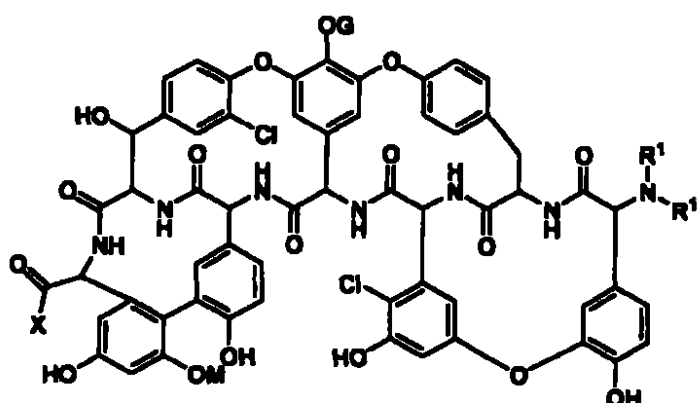
[00494] In still further embodiments, the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound is purified and isolated. As used herein, the term purified and isolated indicates that the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound is enriched relative to non-dalbavancin compounds and relative to other dalbavancin compounds in a composition. For example, the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound can be enriched relative to a mixture in which the N^{13} , N^{15} -dialkyl antibiotic compound is produced, for instance a mixture derived from a fermentation broth as described in the examples below. In certain

embodiments, the N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound is enriched two, three, five, ten, one hundred, one thousand or ten thousand fold.

***N,N*-Dialkyl Antibiotic Compounds**

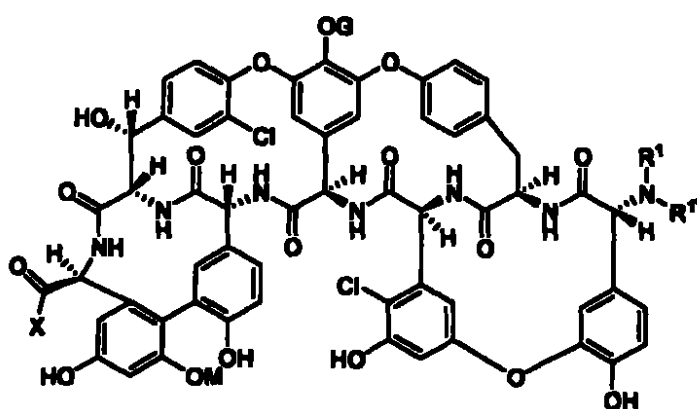
[00495] The present invention also provides N'^{15} , N'^{15} -dialkyl antibiotic compounds having a carboxylic acid group at carbonyl 63. These compounds are useful, for example, for preparing N'^{15} , N'^{15} -dialkyl antibiotic compounds of the invention. In certain embodiments, these N'^{15} , N'^{15} -dialkyl antibiotic compounds are also useful for preventing and/or treating microbial infections in mammals.

[00496] In certain embodiments, the present invention provides N^{11} , N^{13} -dialkyl antibiotic compounds according to formula (VIII), or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof:



(VII).

[00497] In certain embodiments, the present invention provides N'^5, N'^5 -dialkyl antibiotic compounds according to formula (IX), or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof:



(LX)

87

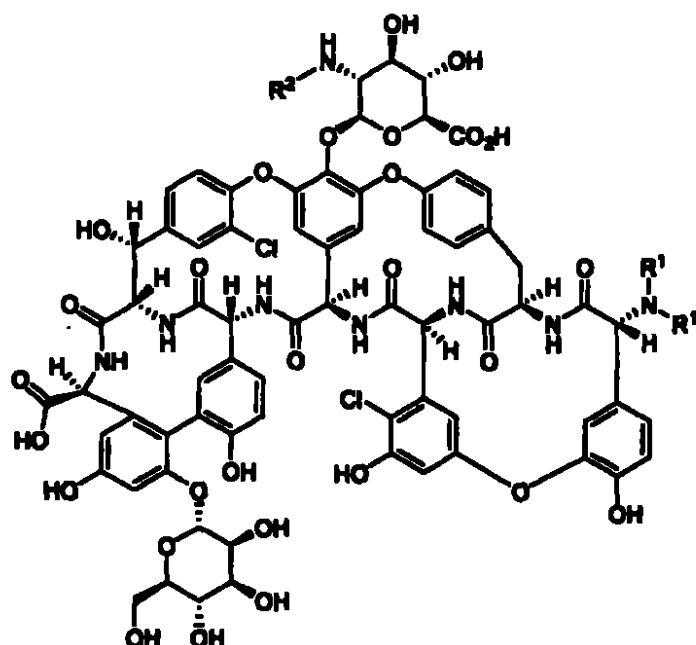
[00498] Formulas (VIII) and (IX) provide the peptide core of the N'^{3}, N'^{3} -dialkyl antibiotic compounds of this aspect of the invention. The peptide comprises seven amino acids with the amino terminus at the right side, as depicted in formulas (III) and (IV), and the carboxy terminus at the left. According to this aspect of the invention, the N'^{3}, N'^{3} -dialkyl antibiotic compounds comprise two alkyl substituents on the amino terminal nitrogen, or N'^{3} . In other words, in formulas (I) and (II) R^1 and $R^{1'}$ are alkyl. Further, in Formulas (VIII) and (IX), X is OH as in antibiotic A 40926 compounds known to those of skill in the art.

[00499] In preferred embodiments, R^1 and $R^{1'}$ are C_{1-4} alkyl. In certain embodiments, R^1 and $R^{1'}$ are each independently selected from propyl, ethyl and methyl. In further embodiments, R^1 and $R^{1'}$ are each independently selected from ethyl and methyl. In more preferred embodiments, at least one of R^1 and $R^{1'}$ is methyl. In most preferred embodiments, R^1 and $R^{1'}$ are methyl.

[00500] The N'^{3}, N'^{3} -dialkyl antibiotic compounds of the invention can be glycosylated in one or more positions, as is known to those of skill in the art. In preferred embodiments, the N'^{3}, N'^{3} -dialkyl antibiotic compounds are glycosylated at positions G and M of formulas (VIII) and (IX). In particular embodiments, M is hydrogen or a sugar moiety. For example, M can be hydrogen, α -D-mannopyranosyl or 6-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl. In particular embodiments, G is hydrogen or a sugar moiety. For example, G can be hydrogen or glucuronamine.

[00501] In certain embodiments, one or both of the sugar moieties can be acylated or acetylated, or both. For example, when G is glucuronamine, the glucuronamine moiety can be acylated with a fatty acid. The fatty acid can be any fatty acid known to those of skill in the art. In particular embodiments, the fatty acid is selected from the group consisting of 8-methyl nonanoic acid, n-decanoic acid, 9-methyl-decanoic acid, n-undecanoic acid, 10-methyl-undecanoic acid, n-dodecanoic acid, 11-methyl-dodecanoic acid, n-tridecanoic acid, 12-methyl-tridecanoic acid and n-tetradecanoic acid. In preferred embodiments, the fatty acid is a C_{12} fatty acid. In particular embodiments, the fatty acid is 10-methyl-undecanoic acid.

[00502] In certain embodiments, the present invention provides a compound according to formula (X), or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof:



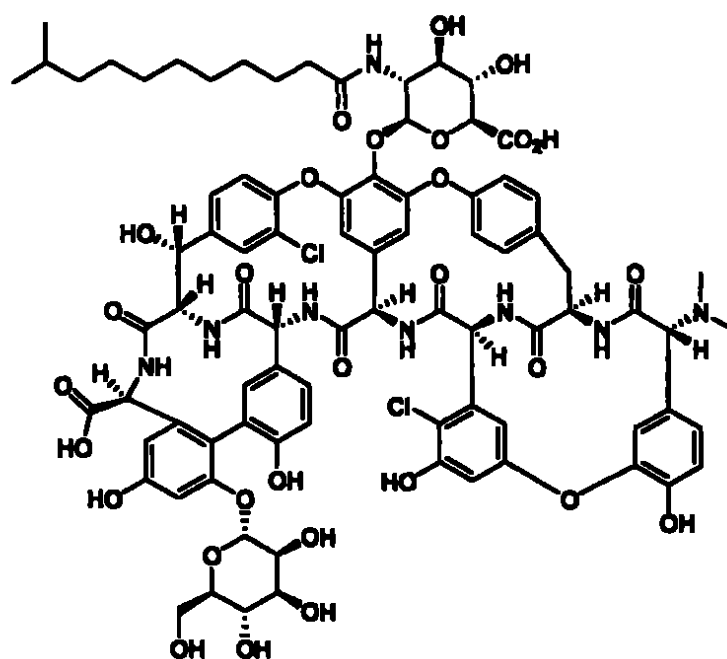
(X).

[00503] In formula (X), R² is C₁₀₋₁₄ acyl. In particular embodiments, R² is selected from the group consisting of 8-methyl nonanoic acid, n-decanoic acid, 9-methyl-decanoic acid, n-undecanoic acid, 10-methyl-undecanoic acid, n-dodecanoic acid, 11-methyl-dodecanoic acid, n-tridecanoic acid, 12-methyl-tridecanoic acid, and n-tetradecanoic acid. In preferred embodiments, R² is a C₁₂ fatty acid. In particular embodiments, R² is 10-methyl-undecanoic acid.

[00504] As described in the synthetic sections below, the *N*¹³, *N*¹⁵-dimethyl antibiotic compounds can be synthesized from antibiotic A 40926 compounds. Accordingly, certain *N*¹³, *N*¹⁵-dimethyl antibiotic compounds of the invention possess the sugar moieties and fatty acids of antibiotic A 40926 factor A₀, A₁, B₀, B₁, C₀ and C₁.

[00505] In particular embodiments, the present invention provides *N*¹³, *N*¹⁵-dimethyl antibiotic compounds. An *N*¹³, *N*¹⁵-dimethyl antibiotic compound comprises formula (VIII) or (IX) with two methyl groups at *N*¹⁵. An *N*¹³, *N*¹⁵-dimethyl antibiotic compound can be glycosylated with one or more sugar moieties as described above. In certain embodiments, a *N*¹³, *N*¹⁵-dimethyl antibiotic compound is acylated on one or more of these sugar moieties. In preferred embodiments, the acyl group is 10-methyl-undecanoic acid.

[00506] In preferred embodiments, the present invention provides the *N*¹³, *N*¹⁵-dimethyl antibiotic compound according to the following structure (XI), or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof:



(XI).

[00507] In certain embodiments, the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention is purified. As used herein, the term purified indicates that the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is enriched relative to other antibiotic compounds in a composition. For example, the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound can be enriched relative to a mixture in which the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is produced, for instance a mixture derived from a fermentation broth as described in the examples below. In certain embodiments, the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is enriched two, three, five, ten, one hundred, one thousand or ten thousand fold.

[00508] In further embodiments, the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is isolated. As used herein, the term isolated indicates that the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is enriched relative to non-antibiotic compounds in a composition. For example, the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound can be enriched relative to a mixture in which the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is produced, for instance a mixture derived from a fermentation broth as described in the examples below. In certain embodiments, the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is enriched two, three, five, ten, one hundred, one thousand or ten thousand fold.

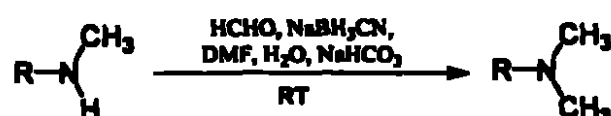
[00509] In still further embodiments, the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is purified and isolated. As used herein, the term purified and isolated indicates that the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is enriched relative to non- antibiotic compounds and relative to other dalbavancin compounds in a composition. For example, the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound can be enriched relative to a mixture in which the N'^{13}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is produced, for instance a mixture derived from a fermentation broth as described in the examples below. In certain

embodiments, the N'^J, N'^J -dialkyl antibiotic compound is enriched two, three, five, ten, one hundred, one thousand or ten thousand fold.

Methods of Making the Compounds of the Invention

[00510] The compounds of the invention can be made according to any method apparent to those of skill in the art for preparing such N'^J, N'^J -dialkyl antibiotic compounds.

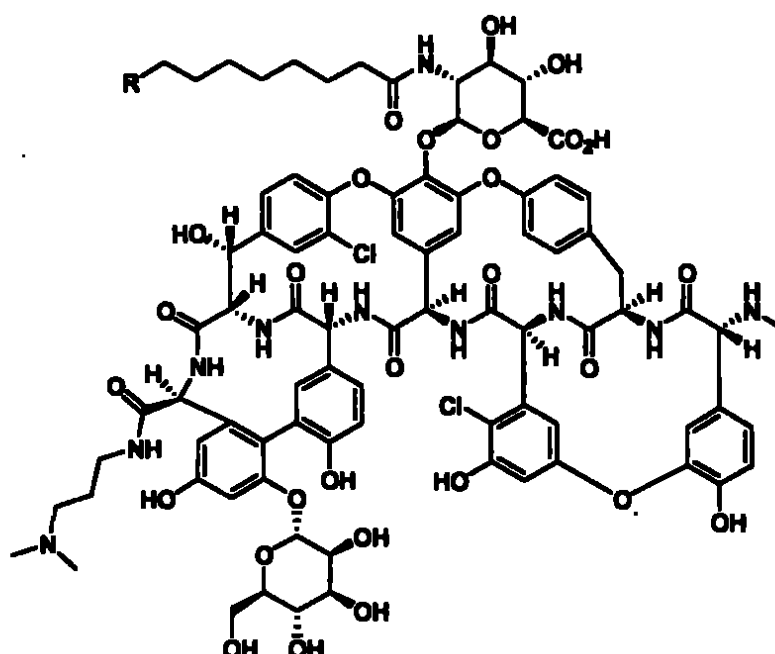
[00511] For instance, in certain embodiments, an N'^J, N'^J -dialkyl antibiotic compound or composition of the invention can be prepared by alkylating the corresponding N'^J -monomethyl compound or composition by any technique apparent to one of skill in the art. For example, an N'^J -monomethyl compound or composition can be methylated by contacting the compound or composition with a mixture of HCHO, NaBH₃CN, DMF, H₂O and NaHCO₃ at room temperature as illustrated in Scheme 1. In a particular embodiment, an N'^J -monomethyl dalbavancin compound or composition is dissolved in water and DMF, to which formaldehyde and sodium bicarbonate are added followed by NaBH₃CN to yield the N'^J, N'^J -dimethyl antibiotic compound or composition.



Scheme 1

[00512] The corresponding N'^J -monomethyl compound or composition can be prepared according to published techniques, such as those described extensively in U.S. Patent No. 5,750,509 and U.S. Patent Application Publication No. US 2004/0142883, the contents of which are incorporated by reference in their entireties. To the extent that the compounds or compositions have protecting groups on their N'^J nitrogen, they can be removed by any technique known to the person of skill in the art.

[00513] Suitable starting materials include dalbavancin A₀, A₁, B₀, B₁, C₀ and C₁ and antibiotic A 40926 factors A₀, A₁, B₀, B₁, C₀ and C₁. As shown in the examples below, N'^J, N'^J -dimethyl dalbavancin B₀ was prepared from dalbavancin B₀ according to this method. The preparation of these dalbavancin compounds is described extensively in U.S. Patent Application Publication No. US 2004/0142883. These dalbavancin compounds have the following structures:

86
89

wherein R is as follows:

Dalbavancin Compound	R
A ₀	-CH(CH ₃) ₂
A ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₃
B ₀	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
B ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
C ₀	-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂
C ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃

[00514] In further embodiments, an *N*¹³, *N*¹⁵-dialkyl antibiotic compound of the invention can be prepared from antibiotic A 40926 fermentation broth. The fermentation broth comprising antibiotic A 40926 and related compounds can be prepared according to techniques described, for example, in U.S. Patent No. 5,750,509 and U.S. Patent Application Publication No. US 2004/0142883. The broth can be purified to yield the desired antibiotic A 40926 compounds, which can be esterified, amidated and hydrolyzed according to U.S. Patent No. 5,750,509 and U.S. Patent Application Publication No. US 2004/0142883 to yield a mixture of dalbavancin compounds. *N*¹³, *N*¹⁵-dialkyl antibiotic compounds can be purified and/or isolated from the mixture according to any technique apparent to those of skill in the art. In the examples below, HPLC techniques are used to purify *N*¹³, *N*¹⁵-dialkyl antibiotic compounds of the invention.

Compositions

[00515] In another aspect, the present invention provides compositions comprising one or more compounds of the invention. Generally, the compositions of the invention comprise a compound of the invention and one or more other compounds. The other compounds can be compounds of the invention, compounds known to those of skill in the art, compounds yet to be discovered or published or other compounds.

[00516] In certain embodiments, the compositions are pharmaceutical compositions, described in more detail in the sections below.

[00517] In particular embodiments, the compositions comprise a N'^{15}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention and a dalbavancin or antibiotic A 40926 compound. The dalbavancin or antibiotic A 40926 compound can be any dalbavancin or antibiotic A 40926 compound known to those of skill in the art. Exemplary dalbavancin compounds include those described in U.S. Patent No. 5,750,509 and U.S. Patent Application Publication No. US 2004/0142883, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entirety. Exemplary antibiotic A 40926 compounds are described in U.S. Patent Nos. 4,935,238, 4,868,171 and 4,782,042, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

[00518] Exemplary dalbavancin compounds include dalbavancin A₀, A₁, B₀, B₁, C₀ and C₁. The preparation of these dalbavancin compounds is described extensively in U.S. Patent Application Publication No. US 2004/0142883. These dalbavancin compounds are further described in the sections above. Of course, the compositions of the invention can comprise additional dalbavancin compounds not listed among the exemplary dalbavancin compounds above.

[00519] In certain embodiments the compositions comprise multimers of compounds of the invention. The multimers can be dimers, trimers or larger. The multimers can be homomultimers, heteromultimers or a mixture of homomultimers and heteromultimers. For instance, the multimer can comprise a combination of any of the factors present in the dalbavancin composition, including any of dalbavancin factors A₀, A₁, B₀, B₁, B₂, C₀, C₁, D₀, D₁, MAG, or isoB₀. For example, the multimer may comprise a N'^{15} -alkyl dalbavancin compound and a N'^{15}, N'^{15} -dialkyl dalbavancin compound. In certain embodiments, the present invention also provides homodimers of the compounds of the invention. In further embodiments, the present invention provides heterodimers of the compounds of the invention with dalbavancin compounds. The dalbavancin compounds can be dalbavancins of the invention or dalbavancins known to those of skill in the art.

[00520] In certain embodiments, the compositions of the invention comprise a significant amount of an N'^{15}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound of the invention relative to dalbavancin or antibiotic A

40926 compounds. In certain embodiments, relative to the dalbavancin or antibiotic A 40926 compounds, the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound of the invention is at least 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.6, 1.7, 1.75, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 or 99% of the composition. In preferred embodiments, the compound is according to formula (V).

[00521] In certain embodiments, the compositions of the invention comprise a significant amount of an N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound of the invention relative to dalbavancin compounds. In certain embodiments, relative to the dalbavancin compounds, the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound of the invention is at least 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.6, 1.7, 1.75, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 or 99% of the composition. In preferred embodiments, the compound is according to formula (V).

[00522] In certain embodiments, the compositions of the invention comprise a significant amount of an N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound of the invention relative to antibiotic A 40926 compounds. In certain embodiments, relative to the antibiotic A 40926 compounds, the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound of the invention is at least 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.6, 1.7, 1.75, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 or 99% of the composition. In preferred embodiments, the compound is according to formula (V).

[00523] In certain embodiments, the compositions of the invention comprise a significant amount of an N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound of the invention relative to other compounds. In certain embodiments, the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound of the invention is at least 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.6, 1.7, 1.75, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 or 99% of the composition relative to other compounds. In preferred embodiments, the compound is according to formula (V).

[00524] In further embodiments, the present invention provides compositions comprising dalbavancin A_0, A_1, B_0, B_1, C_0 and C_1 together with an N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound of the invention wherein the amount of the compound of the invention is enriched relative to one or more or all of dalbavancin A_0, A_1, B_0, B_1, C_0 and C_1 . The composition can be enriched, for example, so that the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound is at least 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.6, 1.7, 1.75, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 or 99% of the composition relative to one or more or all of dalbavancin A_0, A_1, B_0, B_1, C_0 and C_1 . In preferred embodiments, the compound is according to formula (V).

[00525] In certain embodiments, the present invention provides compositions comprising dalbavancin B_0 and an N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound of the invention. In further

embodiments, the present invention provides compositions comprising dalbavancin B₁ and an *N*^{'S},*N*^{'S}-dialkyl antibiotic compound of the invention. In further embodiments, the present invention provides compositions comprising dalbavancin B₀, dalbavancin B₁ and an *N*^{'S},*N*^{'S}-dialkyl antibiotic compound of the invention. In preferred embodiments, the *N*^{'S},*N*^{'S}-dialkyl antibiotic compound of the invention is according to formula (V). In particularly preferred embodiments, the present invention provides compositions comprising the compound of formula (V), dalbavancin B₀ and dalbavancin B₁. These compositions can be purified, isolated or purified and isolated. In certain embodiments, the compositions are 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 98.5, 99 or 99.5 % pure. By "pure" is meant that the compositions comprise that amount of the compounds of the composition. For instance, the composition comprising the compound of formula (V), dalbavancin B₀ and dalbavancin B₁ would comprise at least 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 98.5, 99 or 99.5 % of the three compounds relative to other compounds in the composition. Purity can be assessed by any means known to those of skill in the art such as HPLC, for instance by % area under the curve. [00526] In the compositions of the invention, the amount of each component can be calculated by weight, by molar amount or by any other technique known to those of skill in the art.

Methods of Use

[00527] Methods are provided for administration of a *N*^{'S},*N*^{'S}-dialkyl antibiotic compound or composition of the invention to an individual in need of treatment for a bacterial infection. In one embodiment, the *N*^{'S},*N*^{'S}-dialkyl antibiotic compound is according to formula (V). Treatment can include prophylaxis, therapy, or cure. Methods include administration of a *N*^{'S},*N*^{'S}-dialkyl antibiotic compound or composition in a therapeutically or prophylactically effective amount.

[00528] As used herein, "therapeutically effective amount" refers to the amount of a compound or composition that, when administered to a subject for treating a disease, will render a desired therapeutic outcome (*e.g.*, reduction or elimination of a bacterial infection). A "therapeutically effective amount" can vary depending on, *inter alia*, the compound, the disease and its severity, and the age, weight, *etc.*, of the subject to be treated, and may be administered in one or more doses. A "prophylactically effective amount" refers to an amount of a *N*^{'S},*N*^{'S}-dialkyl antibiotic compound or composition sufficient to prevent or reduce severity of a future bacterial infection when administered to an individual who is susceptible to and/or who may contract a bacterial infection, *e.g.*, by virtue of a medical procedure or stay in the hospital, or exposure to an individual with a bacterial infection. A *N*^{'S},*N*^{'S}-dialkyl antibiotic compound or composition can be administered in a pharmaceutically acceptable carrier.

[00529] A N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered as a "unit dose" in a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic formulation which includes an amount of the compound sufficient to provide a therapeutically or prophylactically effective plasma level of the compound for several days, at least about 5 days, one week, or 10 days, when administered to an individual. In some embodiments, the compound is according to formula (V). In some embodiments, the compound is a component of a formulation, which includes an amount of the compound sufficient to provide therapeutically or prophylactically effective level of the compound for several days, often at least about 5 days, one week, or 10 days. The dosing interval, or time between doses, can be, for example, any of about 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, or more days.

[00530] As used herein, the terms "individual" or "subject" or "patient" are used interchangeably and refer to a vertebrate, typically a mammal, often a human.

[00531] In addition, a compound or composition of the invention can be formulated with a stabilizer that inhibits degradation of the compound, the composition, and/or one or more other N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic or other antibiotic components present in the composition. In some embodiments, the stabilizer is selected from the group consisting of mannitol, lactose, sucrose, sorbitol, glycerol, cellulose, trehalose, maltose, raffinose, and mixtures thereof. In one embodiment, a formulation comprises mannitol. In another embodiment, a formulation further comprises lactose. In one embodiment, the composition can be formulated with a 1:2 weight ratio of mannitol: N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound. In another embodiment, the composition can be formulated with a 1:1:4 weight ratio of mannitol:lactose: N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound.

[00532] In some embodiments, a composition or other formulation comprises a N'^S, N'^S -dimethyl antibiotic compound, a dalbavancin compound, or a combination thereof. A composition or other formulation can be administered at a dosage that results in therapeutically effective (*i.e.*, bactericidal) plasma levels of the drug for several days, often at least about 5 to about 10 days, often at least about one week. For example, N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compounds or compositions can be maintained in plasma at or above the minimum bactericidal concentration of about 4 mg/l for at least 5 days. N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compounds or compositions can be maintained at a plasma level of at least about 5 mg/l, at least about 10 mg/l, at least about 20 mg/l, at least about 30 mg/l, at least about 40 mg/l, for at least 5 days, at least about one week or longer. Plasma levels of N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compounds or compositions can be measured by methods that are well known in the art, such as liquid chromatography, mass spectrometry, or microbiological bioassay.

[00533] Upper limits for N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition plasma concentration levels can be dictated by dosages that inhibit unacceptable adverse effects in the patient population treated.

[00534] A N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered in a single dose or in multiple doses. When administered as a single dose, a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be formulated to contain a sufficient amount of the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound(s) to effect antibacterial properties *in vivo* for at least 5 days, alternatively for at least 6 days, alternatively for at least 7 days, alternatively for at least 8 days, alternatively for at least 9 days, alternatively for at least 10 days, alternatively for at least 11 days, alternatively for at least 12 days, alternatively for at least 13 days, alternatively for at least 14 days, alternatively for at least 15 days.

[00535] When multiple doses are employed, a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered weekly for two or more weeks. In one embodiment, a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered in at least two doses, often in two doses about 5 to about 10 days apart, more often once a week for two weeks. In certain embodiments, such a regimen provides significant advantages over conventional antibiotic treatment protocols.

[00536] A N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can also be administered in multiple doses two or more days or at least one week apart, or in one or more biweekly doses. In some embodiments, a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered weekly, followed by biweekly, or monthly administration. In some embodiments, a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered at weekly intervals for 2, 3, 4, 5, 6, or more weeks.

[00537] Most advantageously, daily dosing of a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition is not required because higher, less frequent doses can be used. Single or multiple doses can range, for example, from about 0.1 to about 5 grams. A single dose of about 0.1 to about 4 grams, e.g., about 3 grams, can be administered for various infection treatments. Where multiple doses are administered, for example, weekly, each dose can range, for example, from about 0.25 to about 5 grams.

[00538] For embodiments in which a single dose can be administered to treat an infection, the amount of the dose can be, for example, about 0.1 to about 5 grams, or about 0.5 to about 4 grams, or about 1 to about 3.5 grams, or about 2 to about 3 grams, e.g., about 3 grams. In some embodiments, a single dose of about 1, 1.5, 2, 2.5, or 3 grams can be administered for treatment of a bacterial infection. For embodiments in which a single dose can be administered for prophylaxis,

X
92

the amount of the dose may be, for example, about 0.1 to about 3 grams, or about 0.1 to about 1 gram, *e.g.*, about 0.5 or about 0.25 gram.

[00539] In dosing schemes that include multiple dosages, the individual dosages may be the same or different. In some embodiments, a first, higher dose can be administered, that can be, for example, about 1.5 to 3 times higher, than one or more subsequent doses. For example, the first dose may be about 0.5 grams to about 5 grams and the second dose about 0.25 grams to about 2.5 grams, the first dose may be about 0.8 to about 2 gram and the second dose about 0.4 to about 1 gram, or the first dose may be about 0.4 to about 3 gram and the second dose about 0.2 to 1.5 gram.

[00540] In some embodiments, at least two dosages are administered wherein the first dosage includes about twice as much of a N'^{JS}, N'^{JS} -dialkyl antibiotic compound or composition as subsequent dosages. In an embodiment, a first dosage includes about 1 gram of the N'^{JS}, N'^{JS} -dialkyl antibiotic compound or composition and a subsequent dosage of about 0.5 gram. In another embodiment, a first dosage includes about 0.5 gram and a subsequent dosage of about 0.25 gram.

[00541] In some embodiments, a N'^{JS}, N'^{JS} -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered in two doses of equal or different amounts two or more days or at least about one week apart. For example, two doses of about 0.2 to about 1.5 grams of a N'^{JS}, N'^{JS} -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered about 5 to about 10 days apart, or about 1 week apart. In one embodiment, a first dosage of about 1 gram and a second dosage of about 0.5 gram of a N'^{JS} -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered about 1 week apart.

[00542] In a multiple dosing regimen, the time between doses may range, for example, from about 5 to about 10 days, often about one week. Dose frequency can be, for example, two weekly doses, or multiple weekly doses. The dosing interval, or time between doses, can be, for example, any of about 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, or more days. The number of doses given, can be, for example, one, two, three, four, five, six or more doses, each dose after the initial dose being given after the selected dosage interval.

[00543] In the multiple dosing schemes of certain embodiments, the "trough level," or the level of a N'^{JS}, N'^{JS} -dialkyl antibiotic compound or composition in plasma after a first dose, and just prior to administration of a second dose, can be at least about 4 mg/l. The trough level of N'^{JS}, N'^{JS} -dialkyl antibiotic compound or composition at the end of a dosing interval such as about one week can be at least about 20 mg/l, at least about 30 mg/l, or at least about 40 mg/l.

[00544] A N'^{JS}, N'^{JS} -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered parenterally, *e.g.*, intramuscularly (i.m.), intravenously (i.v.), subcutaneously (s.c.), intraperitoneally (i.p.), or intrathecally (i.t.). The dosing schedule and actual dosage administered may vary depending on

such factors as the nature and severity of the infection, the age, weight, and general health of the patient and the tolerance of a particular patient to the N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition, but will be ascertainable to health professionals. In one embodiment, a one gram intravenous dose of a N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition can be followed by a 0.5 gram intravenous dose one week later.

[00545] Administration and delivery of the drug to the patient, *e.g.*, intravenously, can be done at a controlled rate, so that the concentration in the blood does not increase too quickly or cause precipitation to occur. In some embodiments, a N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered at an appropriate rate such that the drug forms a complex with endogenous protein(s) in the bloodstream. Without intending to be bound to a particular theory, it can be believed that endogenous protein, such as human serum albumin, can form a complex *in vivo* with one or two molecules of a N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound. When a sufficient amount of N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic composition is present, up to two molecules of N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound can bind to the endogenous protein, and this complex can be formed by binding of separate N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compounds at two different binding sites. Alternatively, it is possible that dimeric N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic can bind to a single binding site on the endogenous protein.

[00546] The infusion duration of the N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition can be, for example, about 1 minute to about 2 hours. For example, an infusion duration of about 30 minutes can be used with a N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition, and the dose can be about 0.5 to about 1 gram. Intravenous administration under controlled rate conditions can generate concentrations of N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition in the body that are in great excess of what can be achieved in the solution phase at physiological pH *in vitro*. Although not wishing to be limited by theory, this may be due to the formation of a complex of N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic with endogenous protein(s) such as serum albumin, which may increase the capacity of plasma to absorb the N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition.

[00547] In certain embodiments, formation of a N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic complex *in vitro* or *ex vivo* can permit faster administration, such as at least about 1 minute, at least about 10 minutes or at least about 20 minutes. Such a complex can be achieved by mixing human serum albumin and/or another endogenous protein with a N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition, thereby forming the complex *in vitro* or *ex vivo*, and then administering this complex to the treated patient. Alternatively, the human serum albumin or other endogenous protein may be obtained from

8
93

autologous sources or by expression from a microorganism modified to contain the gene for the protein.

[00548] The amount of the N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition administered can be any of the dosages disclosed herein. The dose can be chosen such that one or more N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compounds will remain at a therapeutically or prophylactically effective (*i.e.*, bactericidal) plasma level for an extended period of time, such as at least 5 days, or about one week or longer. Administration of a dose of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition which produces and maintains bactericidal concentrations for at least about one week (or about 5 to about 10 days) are preferred. A bactericidal concentration can be defined as the concentration of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition required to kill at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, or at least about any one of 95%, 96%, 97%, 98% or 99% of the bacteria present at the initiation of an *in vitro* experiment over a 24 hour period. A minimum bactericidal concentration of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition in plasma can be about 4 mg/l.

[00549] Examples of indications that can be prevented or treated using the N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compounds, compositions, and methods of the invention include both complicated and uncomplicated SSTIs, blood stream infections (BSI), catheter-related blood stream infections (CRBSI), osteomyelitis, prosthetic joint infections, surgical prophylaxis, endocarditis, hospital or community acquired pneumonia, pneumococcal pneumonia, empiric treatment of febrile neutropenia, joint space infections, and device infections (*e.g.*, pace makers and internal cardiac defibrillators). Gram-positive or antibiotic-resistant bacterial infections can be prevented or treated, such as a *Bacillus*, *Corynebacteria*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, or *Clostridium* genus infection, in particular *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, Groups A and C *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, or *Clostridium difficile*. Other infections that can be prevented or treated using the N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compounds, compositions, and methods of the invention include gram negative bacterial, such as a *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* (as well as other *Proteobacteria*), *Francisella*, *Helicobacter*, *Hemophilus*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Morganella*, *Moraxella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, and *Yersinia* genus infection, in particular *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, and yeast, such as *Candida albicans*, infections.

[00550] The invention also encompasses the prevention or treatment of other infectious bacteria using the compounds, compositions, and methods of the invention, such as *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sporozites* (sp.) (e.g. *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*), *Streptococcus (viridans group)*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus (anaerobic sps.)*, pathogenic *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, and *Actinomyces israelii* infection.

[00551] The prevention and treatment of infections and disorders described herein may be accomplished using the compounds, compositions and methods of the invention. In one embodiment, the N'^{15}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound is according to formula (V). In some embodiments, the subject has not previously been treated with one or more antibiotics, such as vancomycin, or teicoplanin. In other embodiments, the subject has not been previously treated with a N'^{15}, N'^{15} -dialkyl antibiotic compound or composition. In some embodiments, the patient has previously been tested for bacterial resistance to an antibiotic. In other embodiments, the patient has not been previously tested for bacterial resistance to an antibiotic.

[00552] The invention also encompasses methods for the prevention or treatment of SSTIs. Patients who may benefit from this prevention or treatment may have either deep or superficial infections. SSTI may involve deeper soft tissue and/or require significant surgical intervention, such as for example a major abscess, infected ulcer, major burn, or deep and extensive cellulitis. Infected surgical wounds may also be prevented or treated.

[00553] The clinical presentation of skin and skin structure infection may vary from mild folliculitis to severe necrotizing fasciitis. The mode of acquisition may also vary with community-acquired skin and skin structure infections, which are often preceded by injuries resulting from occupational exposure or recreational activities, and are usually associated with a greater diversity of pathogens. Hospital-acquired skin and skin structure infections are generally associated with surgical procedures, the development of pressure sores, and catheterization. Post-surgical infections are the third most frequent nosocomial infection and account for 17% of all nosocomial infections reported to the National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS). The most

8
14

frequent source of infection can be the patient's endogenous flora. *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, and *Enterococcus* spp. are the pathogens most frequently isolated from SSTIs.

[00354] Symptoms of SSTI infections can include erythema, tenderness or pain, heat or localized warmth, drainage or discharge, swelling or induration, redness, or fluctuance. Patients that may benefit from treatment with the methods of the invention include those with deep or complicated infections or infections that require surgical intervention, or patients with underlying diabetes mellitus or peripheral vascular disease. These infections are often caused by Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus* or *Streptococcus* species, such as *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus pyogenes*. Methods for treatment of a skin or soft tissue bacterial infection include administering a therapeutically effective amount of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition to an individual in need of treatment, in an amount and according to a dosing regime as discussed above. In one embodiment, the N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound is according to formula (V). In one embodiment, a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition is administered intravenously in two doses, about 5 to about 10 days apart, or about 1 week apart. In some embodiments, the first dosage includes at least twice as much of the a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition as the second dosage. In one embodiment, the first dosage is about 1000 mg and the second dosage is about 500 mg.

[00355] As is understood by those skilled in the art, the dosing methods described herein can vary depending on, *inter alia*, the compound, the disease and its severity, and the age, weight, *etc.*, of the subject to be treated, but are ascertainable by a physician without undue experimentation.

[00356] The invention also encompasses methods for prophylactic prevention of the onset of a bacterial infection, for example an infection caused by *Staphylococcus aureus*, or by a *Neisseria* or *Clostridium* genus bacterium. In a prophylactic method of the invention, a prophylactically effective amount of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition is administered to an individual who may be susceptible to contracting a bacterial infection, for example, through a medical procedure. The N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered in an amount sufficient to provide a prophylactically effective plasma level for at least about 1 day, at least about 3 days, at least about 5 days, or at least about one week or longer. The N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered, for example, parenterally, *e.g.*, via i.m., i.v., i.p., s.c., or i.t. injection, prior to, subsequent to, or at the same time as surgery as a preventative step against infection. The N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered immediately prior or subsequently to, one or more days or about one week prior or subsequently to,

or during an invasive medical procedure such as surgery or a stay in a medical care facility such as a hospital to prevent infection. A prophylactic method can be used in any situation in which it can be possible or likely that an individual may contract a bacterial infection, including situations in which an individual has been exposed to or can be likely to be exposed to a bacterially infected individual. For prophylactic methods, N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered as either a single dose or as two or more doses of equal or different amount that are administered several days to about one week apart. In one embodiment, a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered prior to or simultaneously with insertion of an intravenous catheter in order to prevent a bloodstream related infection. In one embodiment, the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound is according to formula (V).

[00557] For prophylactic methods, a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered in a single dose or in multiple doses, according to any of the dosing schemes described above. A N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered as a single dose comprising about 0.1 to about 3 grams, or about 0.1 to about 1 gram, *e.g.*, about 0.25 gram or about 0.5 gram. In one embodiment, a single dose of about 0.25 gram can be administered intravenously over a time frame of about 2 minutes to about 1 hour, *e.g.*, about 30 minutes. In another embodiment, the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered intravenously simultaneously with administration of another pharmaceutical (*e.g.*, antibiotic) treatment.

[00558] In any of the therapeutic or prophylactic methods described above, the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered either simultaneously or sequentially with at least one other antibiotic. In some embodiments, at least one other antibiotic that can be effective (*e.g.*, bactericidal) against one or more Gram-negative bacterial species and/or a Gram-positive bacterial strain against which the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound is not effective can be administered in addition to the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic. In some embodiments, N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound and at least one antibiotic that can be effective (*e.g.*, bactericidal) against at least one Gram-negative bacterial species can be administered as a mixture in the dalbavancin composition.

Pharmaceutical Compositions

[00559] The invention provides pharmaceutical compositions formulated for administration of a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition according to the methods described above. Pharmaceutical compositions of the invention can be in the form of a unit dose of a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition that includes an amount of a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic

compound or composition sufficient to provide a therapeutically or prophylactically effective plasma level of the N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition for several days, at least about 3 days, at least about 5 days, or at least about one week or longer when the compound or composition is administered to an individual, and a pharmaceutically acceptable carrier. A therapeutically or prophylactically effective plasma level of N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition can be at least about 4 mg per liter of plasma. Plasma levels of N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition can be measured by methods that are well known in the art, such as liquid chromatography, mass spectrometry, or microbiological bioassay. As is known by those skilled in the art, levels of other N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compounds or compositions in the serum can be quantitated in the serum using similar methodologies.

[00560] N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compounds and compositions, can optionally be in a pharmaceutically acceptable form for administration to an individual, for example, as a pharmaceutically acceptable, non-toxic salt.

[00561] Examples of suitable salts of a N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound include salts formed by standard reaction with both organic and inorganic acids such as, for example, hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, phosphoric, acetic, trifluoroacetic, trichloroacetic, succinic, citric, ascorbic, lactic, maleic, glutamic, camphoric, glutaric, glycolic, phthalic, tartaric, lauric, stearic, salicylic, methanesulfonic, benzenesulfonic, sorbic, picric, benzoic, cinnamic, and the like acids.

Representative examples of bases that can form salts with dalbavancin include alkali metal or alkaline earth metal hydroxides such as sodium, potassium, calcium, magnesium, and barium hydroxide, ammonia and aliphatic, alicyclic, or aromatic organic amines such as methylamine, dimethylamine, diethylamine, ethanolamine, and picoline. (See, for example, U.S. Pat. No. 5,606,036.)

[00562] In some embodiments, a pharmaceutically acceptable aqueous formulation of a N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition can be provided that is suitable for parenteral administration, such as, for example, intravenous injection. In one embodiment, the N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound is according to formula (V). For preparing such an aqueous formulation of a N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition, methods well known in the art may be used, and any pharmaceutically acceptable carriers, diluents, excipients, or other additives normally used in the art may be used. In one embodiment, a pharmaceutically acceptable aqueous formulation for intravenous injection includes 5% dextrose.

[00563] A pharmaceutical composition for parenteral administration comprises a N'^3, N'^3 -dialkyl antibiotic compound or composition and a physiologically acceptable diluent such as deionized

water, physiological saline, 5% dextrose, water miscible solvent (e.g., ethyl alcohol, polyethylene glycol, propylene glycol, etc.), non-aqueous vehicle (e.g., oil such as corn oil, cottonseed oil, peanut oil, and sesame oil), or other commonly used diluent. The formulation may further comprise a solubilizing agent such as polyethylene glycol, polypropylene glycol, or other known solubilizing agent, buffers for stabilizing the solution (e.g., citrates, acetates, and phosphates) and/or antioxidants (e.g., ascorbic acid or sodium bisulfite) (See, e.g., U.S. Pat. No. 6,143,739). Other suitable pharmaceutical carriers and their formulations are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. As is known in the art, pharmaceutical preparations of the invention can also be prepared to contain acceptable levels of particulates (e.g., particle-free) and to be non-pyrogenic (e.g., meeting the requirements of an injectable in the U.S. Pharmacopeia).

[00564] In one embodiment, a pharmaceutical composition is provided by dissolving a dried (e.g., lyophilized) dose of a N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition, often comprising a stabilizer or mixture of stabilizers, in an amount of water and preferably deionized water in a volume sufficient for solubilization. For example, the amount of water sufficient for solubilization can be approximately 10 mL and the resulting pH can be above 3.0, and about 3.5 to 4.5. Diluting this solution by adding it to a second amount of an aqueous diluent, containing 5% dextrose, such as an amount contained in a drip bag for intravenous administration, can raise the pH of the solution to about 5 to 5.5. In another embodiment, the pH of the solution in a drip bag can be about 4.5. The second amount of aqueous solution can be deionized or sterile, or both deionized and sterile. In one embodiment, the aqueous diluent is 5% dextrose. Other solubilization methods, and the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic formulations thereof, will be readily apparent to those skilled in the art.

[00565] Pharmaceutical compositions for parenteral administration can be made up in sterile vials containing one or more unit doses of the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition in a therapeutically or prophylactically effective amount as described above, optionally including an excipient, under conditions in which bactericidal effectiveness of N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition can be retained. The compound or composition may or may not be in the form of a dry (e.g., lyophilized) powder. Prior to use, a physiologically acceptable diluent can be added and the solution withdrawn via syringe for administration to a patient. A pharmaceutical formulation as described above can be sterilized by any acceptable means including, for example, e-beam or gamma sterilization methods, or by sterile filtration.

[00566] A formulation for parenteral administration can include the N'^S, N'^S -dialkyl antibiotic compound or composition at a concentration such as about 0.1 to about 100 mg, about 0.5 to about 50 mg, about 1 to about 10 mg, about 1 to about 5 mg, or about 2 to about 4 mg of the N'^S, N'^S -

96

dialkyl antibiotic compound or composition per ml of final preparation. In one embodiment, the N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound is according to formula (V).

[00567] In some embodiments, a pharmaceutical composition in accordance with the invention comprises a mixture of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition and one or more additional antibiotics. Preferably, at least one non-dalbavancin antibiotic in the mixture can be effective (e.g., bactericidal) against one or more species of Gram-negative bacteria, such as, for example, azthreonam, and/or against one or more Gram-positive bacterial strains against which the N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition can be not effective, such as, for example, ilnezolide or daptomycin. The mixture can also include a pharmaceutically acceptable carrier as described above. In some embodiments, the pharmaceutical composition comprises a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition and one or more additional antibiotics. In some embodiments, the N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic composition comprises a N'^{13},N'^{13} -dimethyl antibiotic compound according to formula (V).

[00568] In some embodiments, pharmaceutical compositions of the invention comprise one or more stabilizing substances that inhibit degradation of one or more N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compounds to less active or inactive materials. As used herein, "stabilizing substance" or "stabilizer" refers to a substance that stabilizes the level of one or more N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compounds present in the composition. A "stabilizing effective amount" refers to an amount of a stabilizer sufficient to enhance long-term stability of one or more N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compounds that can be present in the composition that can be present in the composition. In some embodiments, a stabilizing effective amount may be provided by a mixture of two or more stabilizing substances, each of which alone can be not present in an amount sufficient to provide a stabilizing effect.

[00569] Examples of stabilizers include, for example, nonionic substances such as sugars, e.g., mono-, di-, or polysaccharides, or derivatives thereof, sugar alcohols, or polyols. Such stabilizing substances include, for example, mannitol, lactose, sucrose, sorbitol, glycerol, cellulose, trehalose, maltose, raffinose, or mixtures thereof.

[00570] In one embodiment, a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic formulation comprises mannitol. In another embodiment, a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic formulation further comprises lactose. In one embodiment, the N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic composition is formulated with a 1:2 weight ratio of mannitol: N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound. In another embodiment, the N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic composition is formulated with a 1:1:4 weight ratio of mannitol:lactose: N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound. A combination of mannitol and lactose can provide a greater stabilizing

effect than either substance alone. The pH of a pharmaceutical composition of the invention can be, for example, about 2 to about 9, alternatively from about 3 to about 8, alternatively from about 4 to about 7, alternatively from about 5 to about 6, alternatively from about 3.5 to about 4.5. The pH of a pharmaceutical composition of the invention can also be, for example, less than about 9, alternatively less than about 8, alternatively less than about 7, alternatively less than about 6, alternatively less than about 5, or alternatively less than about 4. The pH of a pharmaceutical composition of the invention can also be, for example, greater than about 2, greater than about 3, alternatively greater than about 3.5, alternatively greater than about 4, alternatively greater than about 4.5, alternatively greater than about 5.0, alternatively greater than about 5.5, alternatively greater than about 6.0, alternatively greater than about 6.5, or alternatively greater than about 7.0.

[00571] In some embodiments, one or more procedures can be employed to reduce formation of MAG (a derivative of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound of the invention or a dalbavancin compound lacking an acylglucoronamine moiety) and/or other degradants. For example, freeze drying of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition in the presence of a stabilizing substance, such as mannitol, can be employed to reduce the amount of MAG formed.

[00572] Storage of N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compounds and compositions can be at lower than ambient temperature, such as at about 5°C, to enhance stability.

[00573] Weekly dosing of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition at high dosage levels (*i.e.*, resulting in surprising high and long-lasting serum levels) can show a surprisingly good safety profile, similar to, or better than, that observed with the standard therapy of lower doses of conventional antibiotics administered daily or even 2-4 times daily, as demonstrated by the Examples herein. A high dosage (*i.e.*, resulting in high and long-lasting serum levels, *e.g.* 200-5000 mg) of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition can be administered, with less frequency than other antibiotics, and without adverse side effects, enabling improved efficacy and patient compliance.

[00574] In certain embodiments, treatment with a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic composition results in a low incidence of adverse events. Serious adverse events include any adverse drug experience occurring at any dose that results in death, can be life-threatening, results in hospitalization or prolongation of existing hospitalization, or persistent or significant disability or incapacity.

Kits

[00575] The invention also encompasses kits for use in methods of treatment or prophylaxis of bacterial infections. The kits can include a pharmaceutical compound or composition of the invention, for example comprising at least one unit dose of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound

28
97

or composition, and instructions providing information to a health care provider regarding usage for treating or preventing a bacterial infection. Instructions may be provided in printed form or in the form of an electronic medium such as a floppy disc, CD, or DVD, or in the form of a website address where such instructions may be obtained. A unit dose of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition can include a dosage such that when administered to an individual, a therapeutically or prophylactically effective plasma level of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition can be maintained in the individual for at least 5 days. In some embodiments, a kit includes two unit dosages to be administered at least 5 days apart, about one week apart, or including a first dosage of a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition that can be about 1.5 to about 3 times higher than the second dosage. In some embodiments, a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition can be included as a sterile aqueous pharmaceutical composition or dry powder (e.g., lyophilized) composition. In one embodiment, the N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound is according to formula (V).

[00576] In some embodiments, suitable packaging is provided. As used herein, "packaging" refers to a solid matrix or material customarily used in a system and capable of holding within fixed limits a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition suitable for administration to an individual. Such materials include glass and plastic (e.g., polyethylene, polypropylene, and polycarbonate) bottles, vials, paper, plastic, and plastic-foil laminated envelopes and the like. If e-beam sterilization techniques are employed, the packaging should have sufficiently low density to permit sterilization of the contents.

[00577] Kits can also optionally comprise equipment for administration of the a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition, such as, for example, syringes or equipment for intravenous administration, and/or a sterile solution, e.g., a diluent such as 5% dextrose, for preparing a dry powder (e.g., lyophilized) composition for administration.

[00578] Kits of the invention may also comprise in addition to the a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition, a non-dalbavancin antibiotic or mixture of non-dalbavancin antibiotics, for use with the a N'^{13},N'^{13} -dialkyl antibiotic compound or composition as described in the methods above.

[00579] The following synthetic and biological examples are offered to illustrate this invention and are not to be construed in any way as limiting the scope of this invention.

EXAMPLES

[00580] Example 15: Purification of N'^{13},N'^{13} -dimethyl dalbavancin B₀

[00581] The preparation of A-40926 and subsequent synthesis of dalbavancin is described above. The instant example describes the purification of the N^{13} , N^{15} -dimethyl antibiotic compound according to formula (V), i.e. N^{13} , N^{15} -dimethyl dalbavancin B_0 , from a mixture of dalbavancin compounds prepared according to the invention. As will be apparent to those of skill in the art, N^{13} , N^{15} -dimethyl dalbavancin B_0 is a modified dalbavancin B_0 with two methyl groups on N^{13} . For the purposes of this example and following examples, N^{13} , N^{15} -dimethyl antibiotic B_0 is referred to as "Compound A" in the sections where the compound has yet to be fully characterized. Also, for convenience in later sections, N^{13} , N^{15} -dimethyl dalbavancin B_0 is referred to as dalbavancin B_2 . N^{13} , N^{15} -dimethyl antibiotic B_0 , dalbavancin B_2 and Compound A are the same molecule.

[00582] *Sample preparation*

[00583] About 2 L of organic-aqueous solution from a purification of dalbavancin prepared according to the methods herein were concentrated by acetonitrile and water evaporation under vacuum. Adding diethyl ether to the residual afforded 6g of crude solid. After dissolution in a mixture water/acetonitrile 90/10 v/v the solid was purified on silanized silica gel (bed volume 1L; column id=5cm) using a water (pH 3 acetic acid)/acetonitrile step-gradient elution. The compound A containing fractions were pooled, concentrated to small volume (few ml) and submitted to preparative HPLC purification.

[00584] The enriched fractions were collected. After acetonitrile evaporation under vacuum and lyophilization a few μ g of compound A were recovered.

[00585] Example 16: Identification of the N^{13} Amine Substituents of Compound A

[00586] Compound A has a molecular weight of 1828 Da, 14 units more than dalbavancin components B_0 and B_1 (M.W. 1814). HPLC-ESI-MS analysis demonstrated that unlike the other components of the complex, the variation is on the terminal amino group at N^{13} .

[00587] Other dalbavancin compounds, possessing a methylamine group ($R-NHCH_3$) show in their fragmentation mass spectra (ESI-MS/MS) a neutral loss of 31 units ($-NH_2CH_3$). The fragmentation spectrum of Compound A shows a loss of 45 units instead of 31 units. This type of neutral loss can be explained by two structural hypotheses: N^{13} could be a N,N -dimethylamine group ($R-N(CH_3)_2$, tertiary amine) or a N -ethylamine group ($R-NHCH_2CH_3$, secondary amine).

[00588] HPLC-ESI-MS analysis of the hydrolyzed and derivatized Compound A can discriminate between those two hypotheses. Fig. 29 shows the three peptidic fragments originated from B_0 after acid hydrolysis. Two di-peptides, "AA1+AA3", with amino group N^{13} and a chlorine atom, "AA5+AA7", and a tri-peptide "AA2+AA4+AA6", with a chlorine atom, are formed. Other hydrolysis products are the fatty acid and the DMEPA4 (dimethylamino-propylamino) chains.

98

[00589] In the case of Compound A the dipeptide "AA1+AA3" must be different as reported in Fig. 30. The correct hypothesis can be verified by reacting the hydrolysate with a derivatizing agent that reacts with primary and secondary amines only (see Fig. 31).

[00590] The di-peptide "AA1+AA3" of component B₀ should react with two groups of derivatizing agent (see Fig. 31a). In the case of Compound A two different derivatized peptides "AA1+AA3" can be obtained depending on the amino group *N*¹³ (Fig. 31b). The two molecules, theoretically expected according to the hypotheses proposed, will have molecular weights easily distinguishable by mass spectrometric analysis.

[00591] Materials

[00592] Compound A

[00593] Dalbavancin

[00594] Hydrochloric acid 37%, reagent grade, Rudi Pont cod. 750-11

[00595] Methanol HPLC grade, J. T. Backer cod. 8402

[00596] AccQ Tag™ Chemistry Package, Waters cod. WAT052880

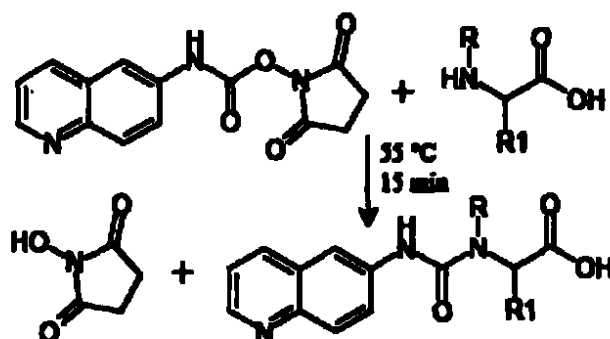
[00597] Hydrolysis

[00598] The hydrolysis of both the sample and the standard was carried out in a PICO-TAG Work Station (Waters, Mildford, MA, USA).

[00599] All of the 360 µg of Compound A and about 1 mg of the dalbavancin standard were hydrolyzed at 105°C in the presence of 6N HCl containing 1% (w/v) phenol for 24 hours. The reaction mixtures were cooled, evaporated to dryness and brought to a final volume of 500 L with methanol.

[00600] Derivatization

[00601] Waters AccQ-Fluor™ reagent Kit was chosen for peptide derivatization. AccQ-Fluor reagent is one of the N-hydroxysuccinimide-activated heterocyclic carbamate aminederivatizing compounds. The structure of the derivatization agent and the scheme of reaction is reported in Scheme 2.



Scheme 2

[00602] 1 mL of "Reagent Diluent" was added to the vial containing "Reagent Powder". The vial was vortexed for 10 seconds and warmed up at 55°C until complete dissolution. Reconstituted AccQ-Fluor reagent was approximately 10 mM in acetonitrile. 20 µl of hydrolyzed sample or standard were put into a vial with conical insert and 20 µl of "AccQ-Fluor Borate Buffer" were added and vortexed briefly. At this point 40 µl of reconstituted AccQ-Fluor reagent were added and the sample vortexed for 30 sec. Vials were heated at 55°C for 10 min. In these conditions the amino groups should react and eventual by-products should be minimized. After this reaction the samples were ready for HPLC analysis.

[00603] *HPLC-UV-MS Analysis*

[00604] Thermo Finnigan Surveyor MS pump, diode array detector and autosampler,

[00605] ThermoQuest Finnigan LCQ Deca mass detector equipped with ESI interface.

[00606] Chromatography: Column: AccQ-Tag™ (Waters C18 NovoPak 4 µm 3.9 x 150 mm); Column temperature: 37°C; Flow: 1 mL/min; Phase A: ammonium acetate 140 mM pH 5 (acetic acid); Phase B: water/acetonitrile 60/40 v/v; UV detection: 254 nm; Injection volume: 20 µL. The eluate from the column was split to allow simultaneous UV and mass detection.

[00607] *Mass spectrometry*

[00608] Sample inlet condition: capillary temperature: 200°C

[00609] sheath gas: N₂, 40 (arbitrary units)

[00610] auxiliary gas N₂, 20 (arbitrary units)

[00611] Sample inlet voltage setting: polarity: positive

[00612] source voltage: 4.7 kV

[00613] capillary voltage: 10 V

[00614] tube lens offset: 40 V

[00615] Scan conditions: scan mode: full ms

[00616] scan range: 100-700 amu

2X
94

[00617] number of microscans 3

[00618] maximum ion time 50 ms

[00619] Results

[00620] Derivatized and hydrolyzed fragments of dalbavancin were separated by HPLC and evaluated by ESI-MS (data not shown). Fragment AA1+AA3 had a size of 737 (m/z), fragment AA5+AA7 had a size of 689 (m/z), and fragment AA2+AA4+AA6 had a size of 1086 (m/z).

[00621] Derivatized and hydrolyzed fragments of Compound A were separated by HPLC and evaluated by ESI-MS. Fragment AA1+AA3 had a size of 737 (m/z), fragment AA5+AA7 had a size of 581 (m/z), and fragment AA2+AA4+AA6 had a size of 1086 (m/z).

[00622] The size of the AA5+AA7 confirmed that Compound A is an *N15*, *N15*-dimethyl compound.

[00623] Example 17: Methylation of Dalbavancin B₀

[00624] Dalbavancin B₀ was prepared following the methods outlined generally above and purified by HPLC following methods described in U.S. Patent Application Publication No. 2004/0142883.

A sample of dalbavancin B₀ was submitted to selective secondary amine N-methylation to yield *N'¹⁵*, *N'¹⁵*-dimethyl antibiotic B₀. The reaction mixture was then analyzed by HPLC-UV and HPLC-UV-MS in the Example below.

[00625] Materials

[00626] Dalbavancin B₀

[00627] Water, MilliQ grade

[00628] NaBH₃CN, sodium cyanoborohydride, Fluka cod. 71435

[00629] DMF, N,N-dimethylformamide, Carlo Erba cod. 444926

[00630] HCHO, formaldehyde solution, 36.5% water solution, Reidel de Haën cod. 33220.

[00631] NaHCO₃, sodium bicarbonate, reagent grade

[00632] Method

[00633] 49.5 mg of dalbavancin were dissolved in 12.5 ml of water and 1.5 mL of DMF into a round-bottom flask (pH 3.5). Three aliquots of 200 µL of were withdrawn and diluted with 800 µL of water (t₀). 76 µL of a 36% (v/v) water solution of formaldehyde and 2.5 mg of sodium bicarbonate (pH 5.8) were added. 8 mg of NaCNBH₃ were added under stirring after sodium bicarbonate complete dissolution. Three aliquots of 200 µL of this reaction mixture were immediately withdrawn and diluted with 800 µL of water and 300 µL of CH₃CN in order to get a clear solution (t₀'). The reaction mixture was left at room temperature for 30 minutes. Samples

were taken from the reaction medium after 10 and 30 minute by extracting 3 aliquots of 200 μ l and diluting each with 800 μ l of water and 300 μ l of CH₃CN (t10 and t30).

[00634] After 30 minutes the reaction was stopped by cooling down to -20°C the flask. The reaction was monitored by HPLC-UV and HPLC/UV/MS analysis.

[00635] Example 18: Structural Confirmation of *N,N'*-dimethyl antibiotic B₀

[00636] This example demonstrates that Compound A and *N,N'*-dimethyl antibiotic B₀ from the previous example are identical.

[00637] The reaction samples t0, t0', t10 and t30 were analyzed by HPLC-UV and compared with the reference standard. Chromatograms of t0', t10 and t30 were very similar, demonstrating that methylation occurs immediately.

[00638] In Fig. 33, t0' vs t0 chromatograms are shown. Methylated B₀ showed the same retention time as Compound A, from Example 15, above. The hypothesis that Compound A is the methylated derivative of B₀ and consequently that the fatty acid chain of Compound A is a 10-methyl undecanoic acid was thus demonstrated.

[00639] The HPLC-UV-MS results confirmed the HPLC-UV structural conclusion reported in the last paragraph. *N,N'*-dimethyl B₀ peak was perfectly overlapped to that of Compound A.

[00640] It was thus demonstrated that the group at *N,N'* of Compound A is a dimethylamine group and not an ethylamine. The elucidated structure of component Compound A is reported in Fig. 28.

[00641] The structure of compound A was further confirmed by NMR, ESI-MS and IR. NMR spectra were recorded on a Bruker AMX 600 at 313K. The sample was dissolved in DMSO-d₆ and proton and carbon NMR assignments were determined by COSY-DFTP, ROESY, and HMQC spectra. A mixing time of 350 msec was selected for the ROESY experiment. Mass spectra were determined by electrospray ionization in positive mode on a Thermoquest Finnigan LCQ^{des} at 250 °C. The infrared spectrum was recorded in KBr on a Bruker IFS 48 instrument.

[00642] NMR peak assignments are provided in Figs. 34. Table 40 reports ¹H assignments of B₂ in comparison with B₀. The NMR spectra of B₂ reveal many similarities with dalbavancin B₀. The fatty acid chain contains an isopropyl terminal group. Most of the proton and carbon chemical shifts are about the same as found for the B₀ component. The major chemical shift deviations are observable for signals belonging to the amino acid 1. In particular, the singlet at 2.31 ppm (¹³Cδ 40.06 ppm) gives integral corresponding to six protons and NOE correlations with the protons x1, 1f and 1e. Its chemical shift and the dipolar correlations suggest that this signal is due to dimethylamino group belonging to the first amino acid spin system.

100

TABLE 40

	B ₂				B ₀		
	δ^1H	δ^1H	$\delta^{13}C$		δ^1H	δ^1H	$\delta^{13}C$
w1	-	n.a.	-	6a	7.26	7.26	123.2
CH ₂	2.31	2.46	30.99	6f	7.42	7.44	126.9
x1	4.43	4.33	66.07	w7	8.41	8.47	-
1b	6.70	6.71	118.6	x7	4.42	4.46	53.3
1c	6.93	7.06	117.6	7d	6.73	6.75	101.1
1f	7.00	7.23	126.65	7f	6.43	6.40	107.9
w2	7.36	8.2	-	AG1	5.48	5.40	101.9
x2	4.83	4.79	55.9	AG2	3.72	3.71	65.98
x3	2.81; 3.32	2.98; 3.37	n.a.	AG3	3.82	3.82	78.11
2b	7.09	7.1	130.6	AG4	3.41	3.51	n.a.
2c	7.17	7.07	123.4	AG6	n.a.	4.27	69.28
2e	6.97	6.97	122.33	AG-NH	7.71	7.77	-
2f	7.63	7.67	131.29	FA2	2.02	2.01	35.6
w3	7.58	7.84	-	FA3	1.43	1.42	24.64
x3	8.10	8.09	54.31	FA4-FA9	1.11-1.22	1.0-1.2	28.8-29.3
3d	8.72	8.66	107.5	FA10	1.50	1.48	27.2
3f	8.48	8.78	107.1	FA11	0.84	0.84	22.34
w4	7.84	7.44	-	FA12	0.84	0.84	22.34
x4	5.60	5.59	54.63	wNW	7.98	8.18	-
4b	5.80	5.78	106.6	NMe	3.31; 3.20	3.17; 3.40	36.36
4f	5.11	5.08	103.6	NMe	1.65	1.67	23.37
w5	8.38	8.48	-	NMe	2.39	2.98	53.94
x5	4.41	4.35	57.72	NMe	2.24	2.71	42.05
5b	7.10	7.13	136.01	M1	9.27	9.32	98.7
5c	6.71	6.71	116.0	M2	3.29	3.3	70.24
5f	6.71	6.71	126.6	M3	n.a.	3.48	73.6
w6	6.62	6.62	-	M4	n.a.	3.69	72.91
x6	4.14	4.19	61.97	M5	n.a.	3.50	n.a.
x6	5.20	5.38	70.6	M6	n.a.	3.50	60.68
6b	7.69	7.76	126.6				

[00643] An infrared spectrum is provided at Fig. 35. ESI-MS is provided at Fig. 36. The data confirmed the structure of compound A as dalbavancin B₂ (*N*¹³,*N*¹⁵-dimethyl dalbavancin B₀).

Example 19 Activity of Dalbavancin B₂ (*N*¹³,*N*¹⁵-dimethyl dalbavancin B₀)

[00644] *N*¹³,*N*¹⁵-dimethyl dalbavancin B₀, several *N*¹³-monomethyl dalbavancin compounds and several known antibiotics were isolated and tested *in vitro* for their antibacterial activity. The compounds were prepared according to the examples above and the methods described in U.S. Patent Application Publication No. 2004/0142883. Individual dalbavancin compounds were purified by HPLC.

[00645] Sample Preparation

[00646] Isolated N^{15} -monomethyl dalbavancin compounds and N^{15},N^{15} -dimethyl antibiotic compounds were dissolved in 0.01N HCl:DMSO: 95:5 v/v. Before dissolution, each sample was analyzed by HPLC and quantified. The solutions were prepared at 256 $\mu\text{g/ml}$ for the N^{15} -monomethyl dalbavancin compounds (A_0 , A_1 , B_0 , and B_1 dalbavancin) and at 128 $\mu\text{g/ml}$ for the isolated N^{15},N^{15} -dimethyl antibiotic B_0 (referred to as " B_2 dalbavancin" in the tables below).

[00647] The chromatographic purity of the principal peak was evaluated in area % vs. total chromatogram area as reported in Table 41:

TABLE 41: CHROMATOGRAPHIC PURITY OF PRINCIPAL PEAK OF VARIOUS N^{15} -MONOMETHYL AND N^{15},N^{15} -DIMETHYL ANTIBIOTIC COMPOUNDS

ID	Status	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	% Main Peak
A_0 dalbavancin	Solution	256	82
A_1 dalbavancin	Solution	256	80
B_0 dalbavancin	Solution	256	96
B_1 dalbavancin	Solution	256	79
B_2 dalbavancin	Solution	128	72

[00648] Microbiological Characterization

[00649] The compounds tested included the isolated N^{15} -monomethyl dalbavancin compounds and N^{15},N^{15} -dimethyl antibiotic compounds described above as well as a dalbavancin composition ("DA 025/A") comprising a N^{15},N^{15} -dimethyl antibiotic compound, vancomycin (VA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Gentamycin (GE) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Penicillin G (Pen.G) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and Amphotericin B (Amph.B) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

[00650] Microorganisms

[00651] The microorganisms used were reference strains obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD), SmithKline and French Laboratories (SKF), and the Upjohn Company (UC) (Kalamazoo, MI).

[00652] Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Determinations

[00653] MICs were determined by the broth microdilution methodology following the standard NCCLS procedure (NCCLS Document M7-A6, Vol. 23, No. 2, "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically." Approved Guideline. January 2003, which can be herein incorporated by reference in its entirety), with or without 30% adult bovine serum (BS) (PAA Laboratories GmbH, Haidmannweg Pasching Austria), using bacterial inocula at

approximately 5×10^5 CFU/ml. The media employed included cation-adjusted Müller Hinton broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) that was used that was adjusted with CaCl_2 and MgCl_2 to a final concentration of 20 mg/L and 10 mg/L, respectively. Tests were read following 20-24 hours of incubation at 35 °C.

[00654] Results

[00655] The MIC results are summarized in Table 42 below. Against a panel of gram positive bacteria, the activity of the various isolated N'^{JS} -monomethyl dalbavancin compounds and the N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compound ("B₂") was comparable or slightly higher than the DA composition, which comprises a mixture of the N'^{JS}, N'^{JS} -dialkyl antibiotic compounds. Blank solution (HCL 0.01N / DMSO 95:5) used to dissolve test compounds was inactive.

[00656] Significantly, the N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compound ("B₂") showed activity against the gram-positive bacteria that was comparable to or greater than the N'^{JS} -monomethyl dalbavancin compounds. For instance, the activity of the N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compound ("B₂") is comparable to or greater than the activity of B₀ across the range of gram-positive bacteria.

[00657] Quite significantly, the N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compound ("B₂") also showed activity against the range of gram-negative bacteria tested. In fact, the only compound that was active against the representative panel of gram-negative bacteria in this assay was the isolated N'^{JS}, N'^{JS} -dimethyl antibiotic compound ("B₂"), which showed activity with a MIC range of 16-32 mg/L.

[00658] The MIC values of the VA and GE reference compounds against the ATCC reference strains were in the range of NCCLS values.

TABLE 42. *IN VITRO* ACTIVITY OF VARIOUS *N*¹⁵,*N*¹³-DIALKYL ANTIBIOTIC COMPOUNDS AND REFERENCE STRAINS

Microorganism	MIC (mg/L)										
	A ₀	A ₁	B ₀	B ₁	B ₂	DA 0.25/A	VA	GE	Pen.G	Amph.B	Blank*
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith ATCC 19636	0.125	0.125	0.25	0.125	0.125	0.25	1	0.5	0.06	>64	>12
<i>S. aureus</i> Smith + 30% BS	1	2	2	2	2	2	2	≤0.125	0.06	>64	>12
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ref. strain ¹	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	2	8	8	>64	>12
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.125	0.125	≤0.06	≤0.06	≤0.03	0.125	2	≤0.125	>32	>64	>12
<i>Streptococcus pyogenes</i> SKF 13400	0.015	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.03	0.06	1	4	≤0.03	32	>12
<i>S. pneumoniae</i> Felton UC41	0.125	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.03	0.015	0.5	8	≤0.03	>64	>12
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080	0.125	0.125	0.125	0.125	0.06	0.25	1	8	32	>64	>12
<i>E. faecalis</i> ATCC29212 ref. strain ²	≤0.06	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	2	32	4	>64	>12
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.03	≤0.007	≤0.125	0.25	≤0.03	>64	>12
<i>Escherichia coli</i> SKF 12140	>64	>64	>64	>64	32	>64	>128	2	>32	>64	>12
<i>E. coli</i> ATCC25922 ref. strain ¹	>64	>64	>64	>64	32	>64	>128	1	>32	>64	>12
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 881	>64	>64	>64	>64	32	>64	>128	2	>32	>64	>12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	>64	>64	>64	>64	16	>64	>128	1	>32	>64	>12
<i>Candida albicans</i> SKF 2270	>64	>64	>64	>64	32	>64	>128	>128	>32	0.125	>12

*Lowest dilution factor not showing activity.

Quality control range of MICs for reference strains (NCCLS M100 S-12, Vol. 22, No. 1, Jan. 2002):

¹ VA 0.5-2 mg/L

² VA 1-4 mg/L

³ GE 0.25-1 mg/L

**Example 20 Preparation of a Dalbavancin Composition
Comprising Dalbavancin B₂**

[00659] A composition comprising purified dalbavancin B₀, dalbavancin B₁ and dalbavancin B₂ was produced by preparative HPLC.

[00660] A dalbavancin mixture prepared according to the methods above was purified by HPLC. The purification was carried out on Kromasil C18, 16 μm, 100 Å pore size. The buffer system was a 50 mmolar NH₄H₂PO₄ aqueous solution with the pH adjusted to 5.5. The mobile phase for the elution was mixture 66/34 buffer/acetonitrile. The process yielded a dalbavancin composition comprising 97% dalbavancin B₀, dalbavancin B₁ and dalbavancin B₂ by HPLC analysis. A typical analytical HPLC chromatogram is at Fig. 37, with dalbavancin B₀ at about 29.901, dalbavancin B₁ at about 30.79 (unlabeled) and dalbavancin B₂ at about 33.282.

Characterization of IsoB₀

[00661] The mass spectrum of IsoB₀ (Fig. 38) shows an ion at *m/z* 1817 corresponding to the mono-protonated molecule and other ions due to cation adducts or partial source fragmentations. The molecular weight of 1816 Da and the fragmentation pattern is the same as that observed for B

102

components, which supports the identification of IsoB₀ as a diastereomer of B₀ (the same molecule with one or more stereocenters having inverted chirality).

[00662] The level of IsoB₀ was found to increase whenever the pH increased too much in the various preparation steps. Therefore, IsoB₀ was prepared by basic treatment of dalbavancin.

[00663] Sample preparation (BI-K0096)

[00664] About 300 mg of IsoB₀ were obtained from 10 g of dalbavancin batch 027 by long (approximately 165 hours) treatment with NaOH in water (pH 12.7) at room temperature. After neutralization, the reaction product was recovered as a brown crude solid that was subjected to a double chromatographic purification on a silanized silica gel column performed eluting with water (pH 3.5; acetic acid)/acetonitrile in step-gradient mode.

[00665] From the rich fractions, a solid 79.98% area of BI-K0096 was isolated. The HPLC profile is reproduced in Fig. 39.

[00666] To verify the correspondence of BI-K0096 with the dalbavancin impurity IsoB₀, the prepared compound BI-K0096 was analyzed by HPLC using three different methods. In all of the conditions tested, BI-K0096 was chromatographically identical to the IsoB₀ impurity.

[00667] Structural Analysis

[00668] MS and MS/MS spectra are reported in Figs. 40 A-C. These mass spectra are identical to that of component B₀. From this mass analysis, it is not possible to confirm the stereochemical variation.

[00669] ¹H and ¹³C NMR spectra of IsoB₀, recorded in DMSO-d₆ on a 600 MHz spectrometer, revealed many similarities with dalbavancin's spectra but also important differences (see Figs. 41 and 42, respectively). The assignments for IsoB₀ and B₀ are reported in TABLE 43 and the corresponding location of the protons are identified in Fig. 43.

Table 43. NMR Assignments of Dalbavancin Iso B₀

Assignment	Iso B ₀		Assignment	Iso B ₀	
	δ^1H	$\delta^{13}C$		δ^1H	$\delta^{13}C$
w1	n.a.	-	6a	n.a.	n.a.
CH ₂	2.24	33.70	8f	7.42	128.9
x1	4.28	84.85	w7	8.88	-
1b	7.13	129.5	x7	4.48	n.a.
1e	8.82	118.8	7d	8.75	101.9
1f	8.87	120.87	7f	8.43	108.18
w2	8.19	-	AG1	5.23	102.0
x2	4.83	55.87	AG2	3.72	55.91
- x2	2.80	38.59	AG3	3.55	n.a.
2b	7.01	n.a.	AG4	3.48	n.a.
2e	8.90	n.a.	AG5	3.25	n.a.
2e	7.29	n.a.	AG-NH	7.80	-
2f	7.22	n.a.	FA2	2.0	n.a.
w3	8.44	-	FA3	1.41	n.a.
x3	5.34	54.85	FA4-FA9	1.11-1.30	n.a.

3d	8.81	104.7	FA10	1.48	n.d.
3f	8.0	101.38	FA11	0.88	n.d.
w4	8.58	-	FA12	0.88	n.d.
x4	5.38	55.07	wNH	8.08	-
4b	5.74	108.07	NHb	3.18;3.23	n.d.
4f	5.12	104.6	NHd	1.83	n.d.
w6	8.32	-	NHc	2.30	n.d.
x6	4.58	63.20	NHd	2.18	n.d.
5b	7.18	138.3	M1	5.21	87.7
5c	8.70	118.88	M2	n.d.	n.d.
5f	8.70	n.d.	M3	n.d.	n.d.
w8	8.58	-	M4	n.d.	n.d.
x8	4.21	82.04	M5	n.d.	n.d.
x9	5.28	71.27	M6	n.d.	n.d.
6b	7.77	128.6			

[00670] For some parts of the molecule, proton and carbon chemical shifts are about the same as for the B₀ component. The major chemical shift deviations are observable for signals belonging to the amino acids sequence 1-4. The protons of these spin systems show a negligible positive or negative Δδ (chemical shift difference). The amino acid 3 in particular exhibits the greater number of relevant changes (x3, w3, 3f, 3d); x3 is also the only resonance displaying an important modification of its ³J_{HN}, the coupling constant CH(x3)-NH(w3) is now 6.54 Hz compared to about 10.4 in B₀. Furthermore, ROESY experiments indicate differences in dipolar correlations for x3 as well as for most protons close to x3. The NMR findings reported and literature data published on teicoplanin epimers make clear that x3 is the epimerization center and the epimerization induces a change in the conformation in at least in a part of the molecule.

Microbiological Characterization

[00671] The compounds used were:

- IsoB₀ as previously described above
- Dalbavancin (DA) (BI-K397 batch 025/A/AS1) Ref std.
- Vancomycin (VA) (batch 121K1140 Sigma Chemical Co.St Louis, MO, USA).
- Gentamicin (GE) (batch 57H1099 Sigma Chemical Co.St Louis, MO, USA)
- Penicillin G (Pen.G) (batch 43H1134 Sigma Chemical Co.St Louis, MO, USA)
- Amphotericin B (Amph.B) (batch 61H4039 Sigma Chemical Co.St Louis, MO, USA).

[00672] Vancomycin, Dalbavancin and Amphotericin B were dissolved at 10mg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in distilled water; gentamycin and Penicillin G were dissolved in distilled water.

2
103

Media

[00673] Müller Hinton broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) adjusted with CaCl₂ and MgCl₂ to a final concentrations of 20 mg/L and 10 mg/L respectively.

Sera

[00674] Adult bovine serum (BS) (batch A05123-159 PAA Laboratories GmbH Haidmannweg Pasching Austria).

Microorganisms

[00675] The microorganisms used are reference standard strains from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA), Smith Kline and French Laboratories (SKF) and the Upjohn Company (UC, Kalamazoo, Michigan, USA).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

[00676] MICs were determined by the broth microdilution methodology following the standard NCCLS procedure [13], with or without 30% bovine serum, using bacterial inocula of approximately 5x10⁵ CFU/mL. Tests were read after 20-24 h incubation at 35°C.

Results

[00677] Against a panel of gram-positive bacteria, the activity of isoB₀ is very similar to dalbavancin. (See TABLE 44)

TABLE 44. In Vitro Activity of IsoB₀ and Reference Compounds

Microorganism	MIC (mg/L)						Blank activity ^a
	isoB ₀	DA 0289A	VA	GE	Pen.G	Amph. B	
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith ATCC19636	0.5	0.25	1	0.5	0.06	>64	>1:2
<i>S. aureus</i> Smith + 30% BS	16	2	2	≤0.125	0.06	>64	>1:2
<i>S. aureus</i> ATCC29213 ref. strain ¹	0.25	0.25	2	8	8	>64	>1:2
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	0.125	0.125	2	≤0.125	>32	>64	>1:2
<i>Streptococcus pyogenes</i> SKF13400	0.06	0.06	1	4	≤0.03	32	>1:2
<i>S. pneumoniae</i> Felton UC41	0.125	0.015	0.5	8	≤0.03	>64	>1:2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC7080	0.25	0.25	1	8	32	>64	>1:2
<i>E. faecalis</i> ATCC29212 ref. strain ²	0.25	0.25	2	32	4	>64	>1:2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	≤0.06	≤0.007	≤0.125	0.25	≤0.03	>64	>1:2
<i>Escherichia coli</i> SKF12140	64	>64	>128	2	>32	>64	>1:2
<i>E. coli</i> ATCC25922 ref. strain ³	64	>64	>128	1	>32	>64	>1:2

<i>Proteus vulgaris</i> ATCC35061	>64	>64	>128	2	>32	>64	>1:2
<i>Parasaccharomyces cerevisiae</i> ATCC10145	>64	>64	>128	1	>32	>64	>1:2
<i>Candida albicans</i> SKF2270	>64	>64	>128	>128	>32	0.125	>1:2

* * * * *

[00678] Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and examples for purposes of clarity of understanding, it will be apparent to those skilled in the art that certain changes and modifications may be practiced without departing from the spirit and scope of the invention. Therefore, the description should not be construed as limiting the scope of the invention, which is delineated by the appended claims.

[00679] All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes and to the same extent as if each individual publication, patent, or patent application were specifically and individually indicated to be so incorporated by reference.

104

CLAIMS

What is claimed is:

1. A dosage form comprising:
a sterile, stable, particle-free dalbavancin powder suitable for reconstitution with a pharmaceutically acceptable vehicle comprising dalbavancin factor B_0 and at least one additional dalbavancin factor selected from the group consisting of dalbavancin factors A_0 , A_1 , B_1 , B_2 , C_0 , and C_1 ;
wherein the content of factor B_0 is not less than about 75 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present and wherein the content of $isoB_0$ does not exceed about 3.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
2. The dosage form of claim 1, further comprising a stabilizing substance.
3. The dosage form of claim 2, wherein the stabilizing substance is mannitol.
4. The dosage form of claim 2, wherein the stabilizing substance is a mixture of mannitol and lactose.
5. The dosage form of claim 1, wherein the content of $isoB_0$ does not exceed 0.1 percent HPLC distribution.
6. The dosage form of claim 1, wherein the dosage form comprises dalbavancin factors B_0 , A_0 , A_1 , B_1 , and B_2 .
7. The dosage form of claim 1, wherein the content of factor B_0 is at least about 80 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
8. The dosage form of claim 1, wherein the content of factor B_0 is at least about 85 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
9. The dosage form of claim 1, wherein the content of factor B_0 is at least about 90 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
10. The dosage form of claim 1, wherein the content of $isoB_0$ does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
11. The dosage form of claim 1, wherein the content of $isoB_0$ does not exceed about 2.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

12. The dosage form of claim 1, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 2 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
13. The dosage form of claim 1, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 1.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
14. The dosage form of claim 1, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 1 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
15. The dosage form of claim 1, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 0.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
16. The dosage form of claim 1, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
17. The dosage form of claim 1, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 2.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
18. The dosage form of claim 1, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 1.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
19. A pharmaceutical composition comprising:
dalbavancin factor B₀ and at least one additional dalbavancin factor selected from the group consisting of dalbavancin factors A₀, A₁, B₁, B₂, C₀, and C₁; and
wherein the content of factor B₀ is not less than about 75 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present, and wherein the content of isoB₀ does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
20. The pharmaceutical composition of claim 19, further comprising a stabilizing substance.
21. The pharmaceutical composition of claim 20, wherein the stabilizing substance is mannitol.
22. The pharmaceutical composition of claim 20, wherein the stabilizing substance is a mixture of mannitol and lactose.
23. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the pharmaceutical composition comprises dalbavancin factors B₀, A₀, A₁, B₁, and B₂.

24. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of factor B₀ is at least about 80 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

25. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of factor B₀ is at least about 85 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

26. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of factor B₀ is at least about 90 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

27. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

28. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 2.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

29. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 2 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

30. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 1.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

31. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 1 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

32. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 0.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

33. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

34. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 2.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

35. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 1.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

36. A dosage form comprising:
a sterile, stable, particle-free dalbavancin powder suitable for reconstitution with a pharmaceutically acceptable vehicle comprising dalbavancin factor B₀ and isoB₀; and
wherein the content of factor B₀ is not less than about 75 percent HPLC distribution

of all dalbavancin components present and wherein the content of isoB₀ does not exceed about 3 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

37. The dosage form of claim 36, further comprising a stabilizing substance.
38. The dosage form of claim 37, wherein the stabilizing substance is mannitol.
39. The dosage form of claim 37, wherein the stabilizing substance is a mixture of mannitol and lactose.
40. The dosage form of claim 36, wherein the dosage form comprises dalbavancin factors B₀, A₀, A₁, B₁, and B₂.
41. The dosage form of claim 36, wherein the content of factor B₀ is at least about 80 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
42. The dosage form of claim 36, wherein the content of factor B₀ is at least about 85 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
43. The dosage form of claim 36, wherein the content of factor B₀ is at least about 90 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
44. The dosage form of claim 36, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
45. The dosage form of claim 36, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 2.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
46. The dosage form of claim 36, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 2 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
47. The dosage form of claim 36, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 1.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
48. The dosage form of claim 36, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 1 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.
49. The dosage form of claim 36, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 0.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

101
100

50. The dosage form of claim 36, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

51. The dosage form of claim 36, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 2.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

52. The dosage form of claim 36, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 1.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

53. A pharmaceutical composition comprising:
dalbavancin factor B₀ and isoB₀; and
wherein the content of factor B₀ is not less than about 75 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present, and wherein the content of isoB₀ does not exceed 3 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

54. The pharmaceutical composition of claim 53, further comprising a stabilizing substance.

55. The pharmaceutical composition of claim 54, wherein the stabilizing substance is mannitol.

56. The pharmaceutical composition of claim 54, wherein the stabilizing substance is a mixture of mannitol and lactose.

57. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the pharmaceutical composition comprises dalbavancin factors B₀, A₀, A₁, B₁, and B₂.

58. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of factor B₀ is at least about 80 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

59. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of factor B₀ is at least about 85 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

60. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of factor B₀ is at least about 90 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

61. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

62. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 2.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

63. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 2 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

64. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 1.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

65. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 1 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

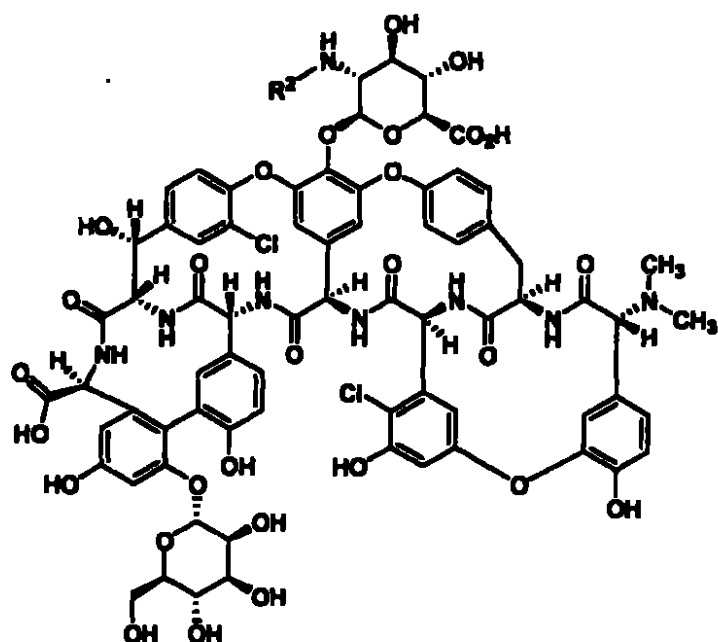
66. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of isoB₀ does not exceed about 0.5 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

67. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

68. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 2.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

69. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein the content of isoB₀ is about 0.5 to about 1.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

70. A chemical compound of the formula

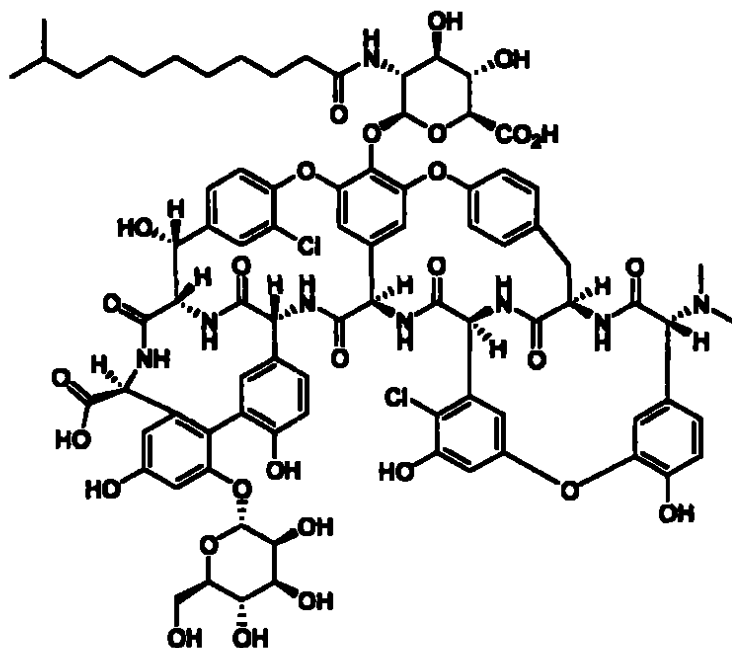


wherein R² is a C₁₀₋₁₄ acyl.

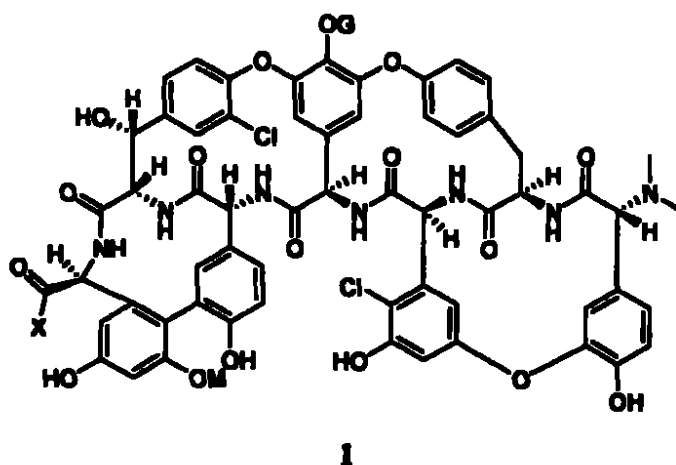
71. The compound of claim 70, wherein R^2 is selected from the group consisting of 8-methyl nonanoic acid, n-decanoic acid, 9-methyl-decanoic acid, n-undecanoic acid, 10-methyl-undecanoic acid, n-dodecanoic acid, 11-methyl-dodecanoic acid, n-tridecanoic acid, 12-methyl-tridecanoic acid, and n-tetradecanoic acid.

72. The compound of claim 70, wherein R^2 is 10-methyl-undecanoic acid.

73. A compound of the formula



74. A compound according to formula 1, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof:



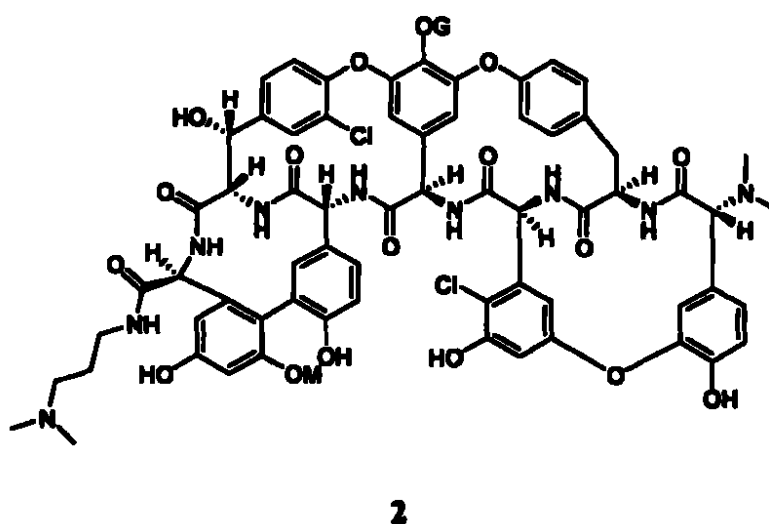
wherein:

M is hydrogen, α -D-mannopyranosyl, or 6-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl;

G is hydrogen, glucuronamine or acylglucuronamine; and

X is an aminoalkylamino.

75. The compound of claim 74, having formula 2:



9
108**76. A dosage form comprising:**

a sterile, stable, particle-free dalbavancin powder suitable for reconstitution with a pharmaceutically acceptable vehicle comprising dalbavancin factors B₀ and B₂; and

wherein the content of factor B₀ is not less than about 75 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present and wherein the content of B₂ is not less than about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

77. The dosage form of claim 76, further comprising at least one additional dalbavancin factor selected from the group consisting of dalbavancin factors A₀, A₁, B₁, C₀, and C₁.

78. A dosage form comprising:

a sterile, stable, particle-free dalbavancin powder suitable for reconstitution with a pharmaceutically acceptable vehicle comprising dalbavancin factors B₀ and B₂; and

wherein the content of factor B₀ is not less than about 75 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present and wherein the content of B₂ does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

79. The dosage form of claim 78, wherein the content of B₂ does not exceed about 2.0 percent HPLC distribution.

80. The dosage form of claim 78, wherein the content of B₂ does not exceed about 1.0 percent HPLC distribution.

81. The dosage form of claim 78, further comprising at least one additional dalbavancin factor selected from the group consisting of dalbavancin factors A₀, A₁, B₁, C₀, and C₁.

82. A pharmaceutical composition comprising:

dalbavancin factor B₀, wherein the content of factor B₀ is not less than about 75 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present; and

dalbavancin factor B₂, wherein the content of B₂ is not less than about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

83. The pharmaceutical composition of claim 82, further comprising at least one dalbavancin factor selected from the group consisting of A₀, A₁, B₁, C₀, and C₁.

84. A pharmaceutical composition comprising:

dalbavancin factor B₀, wherein the content of factor B₀ is not less than about 75 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present; and

dalbavancin factor B₂, wherein the content of B₂ does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present.

85. The pharmaceutical composition of claim 84, wherein the content of B₂ does not exceed about 2.0 percent HPLC distribution.

86. The pharmaceutical composition of claim 84, wherein the content of B₂ does not exceed about 1.0 percent HPLC distribution.

87. The pharmaceutical composition of claim 84, further comprising at least one additional dalbavancin factor selected from the group consisting of dalbavancin factors A₀, A₁, B₁, C₀, and C₁.

88. A method for treating a bacterial infection in an impaired renal patient in need thereof, the method comprising the steps of:

selecting an impaired renal patient;

administering initial and subsequent doses of dalbavancin in a pharmaceutically acceptable carrier to the impaired renal patient, wherein each dose is separated by five to ten days, and wherein the amount of the initial dose is about 750 mg and the amount of each subsequent dose is about 250 mg.

89. The method of claim 88, wherein each dose is separated by about one week.

90. The method of claim 88, the method comprising administering a single subsequent dose.

91. The method of claim 90, wherein the subsequent dose is administered approximately one week after the initial dose without any intervening dose of dalbavancin.

92. The method of claim 88, the method comprising administering multiple subsequent doses.

93. The method of claim 92, wherein the subsequent doses are administered at approximately one week intervals without any intervening doses of dalbavancin.

94. The method of claim 88, wherein the bacterial infection is a skin and soft tissue infection.

95. The method of claim 88, wherein the bacterial infection is a skin and skin structure tissue infection.

96. A method for treating a bacterial infection in an impaired renal patient in need thereof, the method comprising the steps of:

selecting an impaired renal patient;

administering initial and subsequent doses of dalbavancin in a pharmaceutically acceptable carrier to the impaired renal patient, wherein each dose is separated by five to ten days, and wherein the amount of the initial dose is about 750 mg and the amount of each subsequent dose is about 150 mg.

97. The method of claim 96, wherein each dose is separated by about one week.

98. The method of claim 96, the method comprising administering a single subsequent dose.

99. The method of claim 98, wherein the subsequent dose is administered approximately one week after the initial dose without any intervening dose of dalbavancin.

100. The method of claim 96, the method comprising administering multiple subsequent doses.

101. The method of claim 100, wherein the subsequent doses are administered at approximately one week intervals without any intervening doses of dalbavancin.

102. The method of claim 96, wherein the bacterial infection is a skin and soft tissue infection.

103. The method of claim 96, wherein the bacterial infection is a skin and skin structure tissue infection.

104. A method for treating a bacterial infection in a human in need thereof, the method comprising the steps of:

selecting a patient having a bacterial infection; and

administering initial and subsequent doses of dalbavancin in a pharmaceutically acceptable carrier to the patient, wherein each dose is separated by about five to ten days, and wherein the amount of the initial dose is about 1200 mg and the amount of each subsequent dose is about 600 mg.

105. The method of claim 104, wherein each dose is separated by about one week.

106. The method of claim 104, the method comprising administering a single subsequent dose.

107. The method of claim 106, wherein the subsequent dose is administered approximately one week after the initial dose without any intervening dose of dalbavancin.

108. The method of claim 104, the method comprising administering multiple subsequent doses.

109. The method of claim 108, wherein the subsequent doses are administered at approximately one week intervals without any intervening doses of dalbavancin.

110. The method of claim 104, wherein the bacterial infection is a skin and soft tissue infection.

111. The method of claim 104, wherein the bacterial infection is a skin and skin structure tissue infection.

112. A method for treating a bacterial infection in a patient with severe renal impairment in need thereof, the method comprising the steps of:

selecting an impaired renal patient with a creatinine clearance of less than 30 mL/min;

providing a therapeutically effective dose of a pharmaceutical composition comprising dalbavancin; and

administering the therapeutically effective dose to the patient in need thereof.

113. The method of claim 112, wherein the therapeutically effective dose is between about 300 mg and about 1200 mg.

§
170

114. The method of claim 112, wherein the therapeutically effective dose is about 500 mg.

115. The method of claim 112, wherein the therapeutically effective dose is about 1000 mg.

116. A method for treating a bacterial infection in a patient with severe renal impairment in need thereof, the method comprising the steps of:

selecting an impaired renal patient with a creatinine clearance of less than 30 mL/min;
providing a therapeutically effective dose of a pharmaceutical composition comprising dalbavancin of about 1000 mg; and
administering the therapeutically effective dose to the patient in need thereof.

117. The method of claim 116, wherein the bacterial infection is a complicated and/or uncomplicated skin and skin structure infection.

118. The method of claim 116, wherein the therapeutically effective dose is a single dose.

119. The method of claim 116, wherein the therapeutically effective dose is a single dose administered over at least about 30 minutes.

120. The method of claim 116, further comprising the step of providing a subsequent therapeutically effective dose of about 500 mg about 10 to about 18 days after the 1000 mg therapeutically effective dose.

121. The method of claim 120, wherein the subsequent therapeutically effective dose of about 500 mg is administered about 14 days after the 1000 mg therapeutically effective dose.

122. A method for treating a bacterial infection in a patient with severe renal impairment in need thereof, the method comprising the steps of:

selecting an impaired renal patient with a creatinine clearance of less than 30 mL/min;
providing a therapeutically effective dose of a pharmaceutical composition comprising dalbavancin of about 750 mg; and
administering the therapeutically effective dose to the patient in need thereof.

123. The method of claim 122, wherein the bacterial infection is a complicated and/or uncomplicated skin and skin structure infection.

124. The method of claim 122, wherein the therapeutically effective dose is a single dose.
125. The method of claim 122, wherein the therapeutically effective dose is a single dose administered over at least about 30 minutes.
126. The method of claim 122, further comprising the step of providing a subsequent therapeutically effective dose of about 250 mg about 10 to about 18 days after the 750 mg therapeutically effective dose.
127. The method of claim 126, wherein the subsequent therapeutically effective dose of 250 mg is administered about 14 days after the 750 mg therapeutically effective dose.
128. A method for treating a bacterial infection in a patient with severe renal impairment in need thereof, the method comprising the steps of:
selecting an impaired renal patient with a creatinine clearance of less than 30 mL/min, without dialysis;
providing a therapeutically effective dose of a pharmaceutical composition comprising dalbavancin of about 300 mg to about 1200 mg; and
administering the therapeutically effective dose to the patient in need thereof.
129. A pharmaceutical composition comprising:
dalbavancin factor B₂, wherein the content of factor B₂ does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution;
dalbavancin factor isoB₀, wherein the content of factor isoB₀ does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution; and
MAG, wherein the content of MAG does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution.
130. The pharmaceutical composition of claim 129, wherein the contents of dalbavancin factor B₂, isoB₀, and MAG do not exceed about 2.0 percent HPLC distribution.
131. The pharmaceutical composition of claim 129, wherein at least one of the contents of dalbavancin factor B₂, isoB₀, and MAG does not exceed about 2.0 percent HPLC distribution.
132. The pharmaceutical composition of claim 129, wherein the contents of dalbavancin factor B₂, isoB₀, and MAG do not exceed about 1.0 percent HPLC distribution.
133. The pharmaceutical composition of claim 129, wherein at least one of the contents of dalbavancin factor B₂, isoB₀, and MAG does not exceed about 1.0 percent HPLC distribution.

134. A pharmaceutical composition comprising:
dalbavancin factor B_2 , wherein the content of factor B_2 does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution; and
dalbavancin factor $isoB_0$, wherein the content of factor $isoB_0$ does not exceed about 3.0 percent HPLC distribution.

135. The pharmaceutical composition of claim 134, wherein the contents of dalbavancin factor B_2 , $isoB_0$, and MAG do not exceed about 2.0 percent HPLC distribution.

136. The pharmaceutical composition of claim 134, wherein at least one of the contents of dalbavancin factor B_2 , $isoB_0$, and MAG does not exceed about 2.0 percent HPLC distribution.

137. The pharmaceutical composition of claim 134, wherein the contents of dalbavancin factor B_2 , $isoB_0$, and MAG do not exceed about 1.0 percent HPLC distribution.

138. The pharmaceutical composition of claim 134, wherein at least one of the contents of dalbavancin factor B_2 , $isoB_0$, and MAG does not exceed about 1.0 percent HPLC distribution.

139. A method for drying dalbavancin, comprising the steps of:
providing wet dalbavancin comprising dalbavancin, water, and a solvent;
drying the wet dalbavancin at a temperature of about 30 °C or less, at a vacuum pressure of about 50 mbar or less, until the water level of the wet dalbavancin is less than about 20% (w/w);
adding water to the dalbavancin; and
drying the wet dalbavancin at least once more at a temperature of about 30 °C or less, at a vacuum pressure of about 50 mbar or less, until the solvent level of the dalbavancin is less than about 3.0% (w/w).

140. The method of claim 139, wherein the steps of adding water and drying the wet dalbavancin at a temperature of about 30 °C or less, at a vacuum pressure of about 50 mbar or less are repeated until the solvent level is less than about 3.0% (w/w).

141. The method of claim 139, wherein the steps of adding water and drying the wet dalbavancin at a temperature of about 30°C or less, at a vacuum pressure of about 50 mbar or less are repeated until the solvent level is less than about 2.5% (w/w).

142. The method of claim 139, wherein the steps of adding water and drying the wet dalbavancin at a temperature of about 30°C or less, at a vacuum pressure of about 50 mbar or less are repeated until the solvent level is less than about 2.0% (w/w).

143. The method of claim 139, wherein the steps of adding water and drying the wet dalbavancin at a temperature of about 30°C or less, at a vacuum pressure of about 50 mbar or less are repeated until the solvent level is less than about 1.5% (w/w).

144. The method of claim 139, wherein the steps of adding water and drying the wet dalbavancin at a temperature of about 30°C or less, at a vacuum pressure of about 50 mbar or less are repeated until the solvent level is less than about 1.0% (w/w).

145. The method of claim 139, wherein the steps of adding water and drying the wet dalbavancin at a temperature of about 30°C or less, at a vacuum pressure of about 50 mbar or less are repeated until the solvent level is less than about 0.5% (w/w).

146. The method of claim 139, wherein the solvent is acetone.

147. The method of claim 139, wherein the solvent is selected from the group consisting of ethanol, methanol, propanol, butanol, ether, methylene chloride, tetrahydrofuran, chloroform, 1,4-dioxane, and trichloroethylene.

148. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin is dried at a temperature of about 28 °C or less.

149. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin is dried at a temperature of about 26 °C or less.

150. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin is dried at a temperature of about 24 °C or less.

151. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin is dried at a vacuum pressure of about 40 mbar or less.

152. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin is dried at a vacuum pressure of about 30 mbar or less.

153. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin is dried at a vacuum pressure of about 20 mbar or less.

112

154. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin is dried at a vacuum pressure of about 10 mbar or less.

155. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin further comprises MAG and wherein, after drying, the MAG is present in less than about 3.0 percent HPLC distribution.

156. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin further comprises MAG and wherein, after drying, the MAG is present in less than about 2.5 percent HPLC distribution.

157. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin further comprises MAG and wherein, after drying, the MAG is present in less than about 2.0 percent HPLC distribution.

158. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin further comprises MAG and wherein, after drying, the MAG is present in less than about 1.5 percent HPLC distribution.

159. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin further comprises MAG and wherein, after drying, the MAG is present in less than about 1.0 percent HPLC distribution.

160. The method of claim 139, wherein the wet dalbavancin further comprises MAG and wherein, after drying, the MAG is present in less than about 0.5 percent HPLC distribution.

161. The method of claim 140, wherein the water level is measured using a Karl Fischer analysis.

162. A pharmaceutical composition comprising:
dalbavancin factor B₀ and at least one additional dalbavancin factor selected from the group consisting of dalbavancin factors A₀, A₁, B₁, B₂, C₀, C₁, isoB₀, and MAG; and
wherein the content of factor B₀ is not less than about 75 percent HPLC distribution of all dalbavancin components present, and wherein a content of acetone does not exceed about 2.5%.

163. The pharmaceutical composition of claim 162, wherein the composition comprises dalbavancin factors B₀ and MAG, and wherein a content of MAG is less than about 3.0%.

Fig. 1A. Dalbavancin Drug Product Stability Data (at 25 °C)

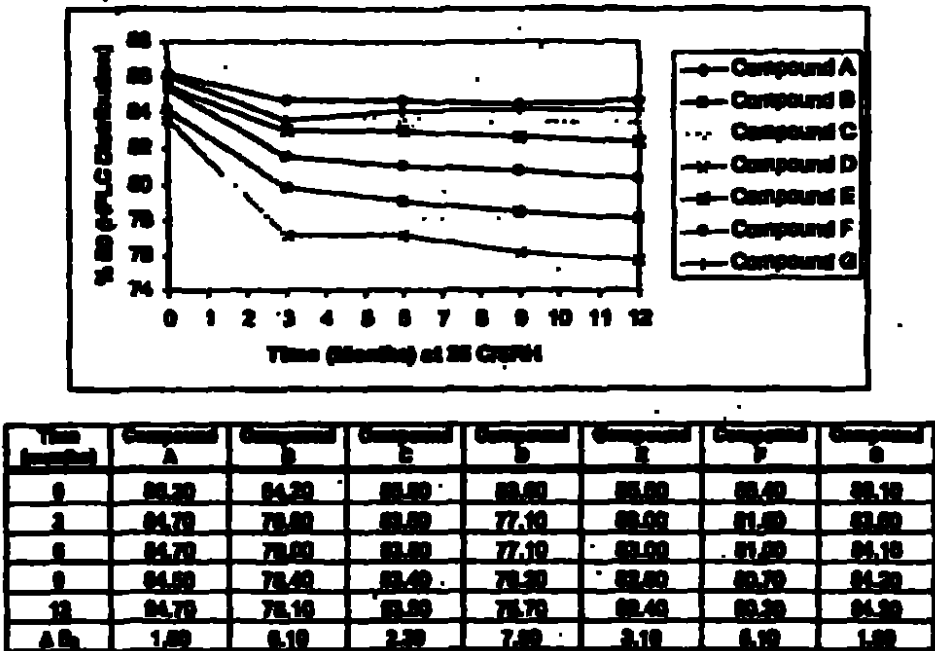
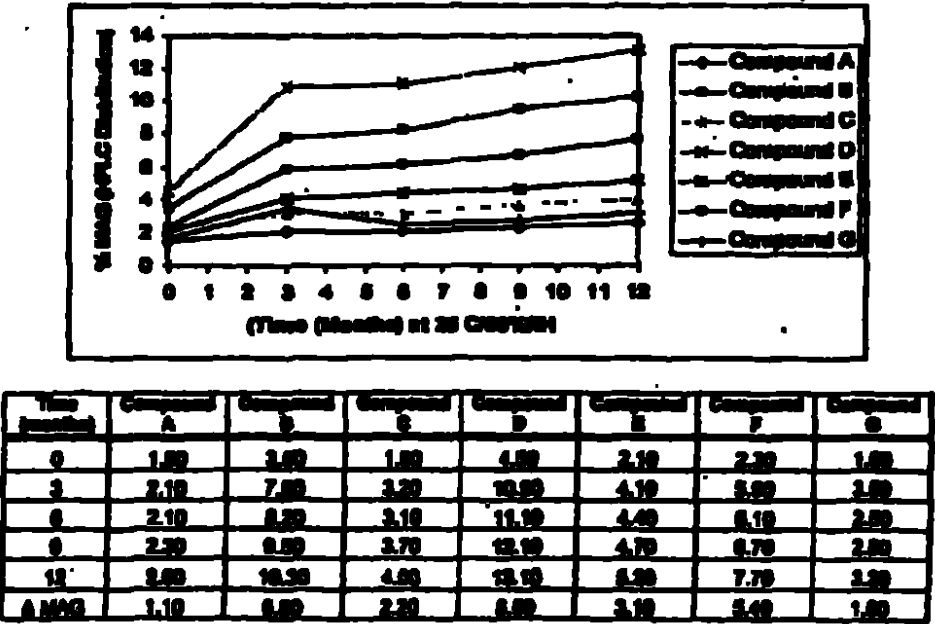
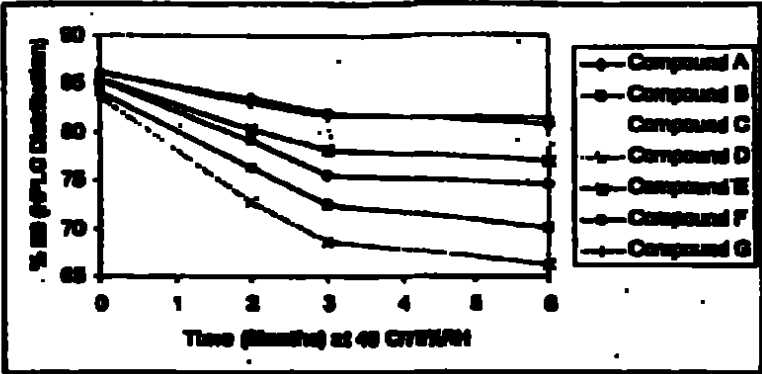


Fig. 1B. Dalbavancin Drug Product Stability Data (at 25 °C)



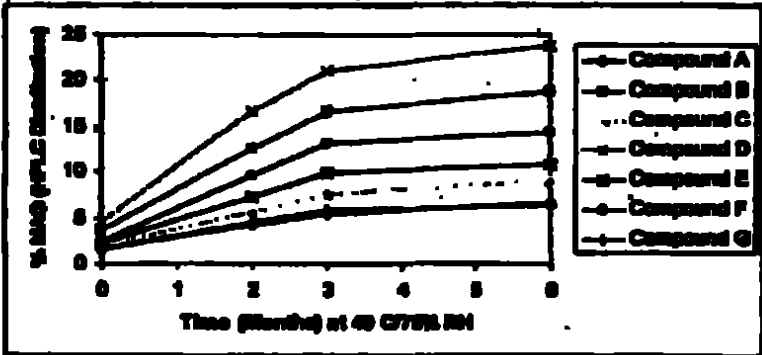
8
113

Fig. 2A. Dalbavancin Drug Product Stability Data (at 40 °C)



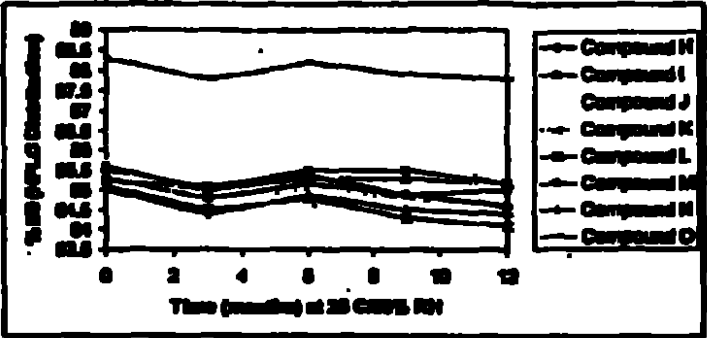
Time (months)	Compound A	Compound B	Compound C	Compound D	Compound E	Compound F	Compound G
0	85.20	84.20	85.00	83.00	85.00	85.00	85.10
2	83.50	79.20	82.20	72.70	80.20	79.00	83.10
3	81.50	72.40	80.50	69.50	78.10	78.00	81.00
6	80.00	70.10	78.10	68.20	77.10	74.00	81.00
Δ R _s	5.20	14.10	6.70	17.40	8.40	10.00	4.00

Fig. 2B. Dalbavancin Drug Product Stability Data (at 40 °C)



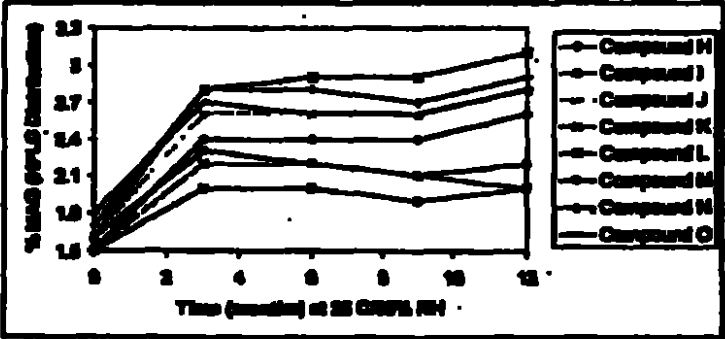
Time (months)	Compound A	Compound B	Compound C	Compound D	Compound E	Compound F	Compound G
0	1.50	3.50	1.50	4.50	2.10	2.30	1.50
2	4.10	12.50	5.50	10.50	7.20	8.50	4.00
3	8.00	18.00	7.50	21.00	9.50	13.10	6.50
6	9.50	18.00	8.10	23.70	10.50	14.40	8.40
Δ MAG	8.10	14.50	7.20	19.20	8.70	12.10	6.90

Fig. 3A. Dalbavancin Drug Product Stability Data (at 25 °C)



Time (months)	Compound H	Compound I	Compound J	Compound K	Compound L	Compound M	Compound N	Compound O
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
10	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
12	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
AMSD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

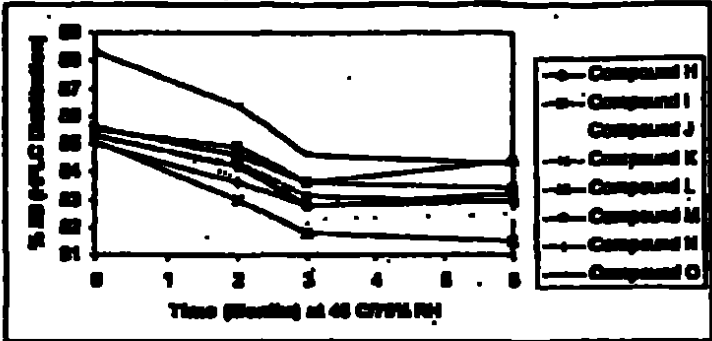
Fig. 3B. Dalbavancin Drug Product Stability Data (at 25 °C)



Time (months)	Compound H	Compound I	Compound J	Compound K	Compound L	Compound M	Compound N	Compound O
0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
2	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
6	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
8	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
10	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
12	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
AMSD	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00

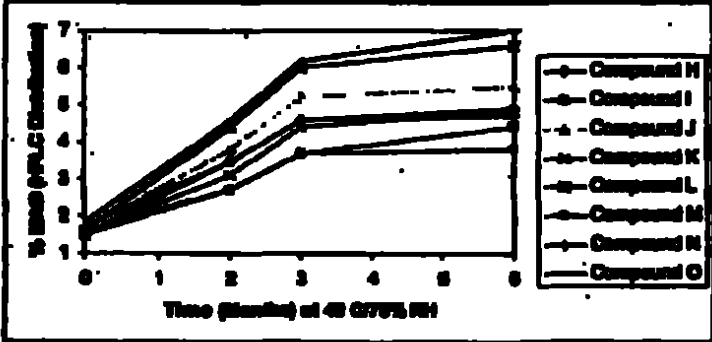
414

Fig. 4A. Dalbavancin Drug Product Stability Data (at 40 °C)



Time (Months)	Compound H	Compound I	Compound J	Compound K	Compound L	Compound M	Compound N	Compound O
0	98.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5	97.5
1	97.5	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0
2	96.5	96.5	96.5	96.5	96.5	96.5	96.5	96.5
3	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5
4	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5
5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5
6	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5

Fig. 4B. Dalbavancin Drug Product Stability Data (at 40 °C)



Time (Months)	Compound H	Compound I	Compound J	Compound K	Compound L	Compound M	Compound N	Compound O
0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
1	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
2	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
3	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
4	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
6	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

Fig. 5

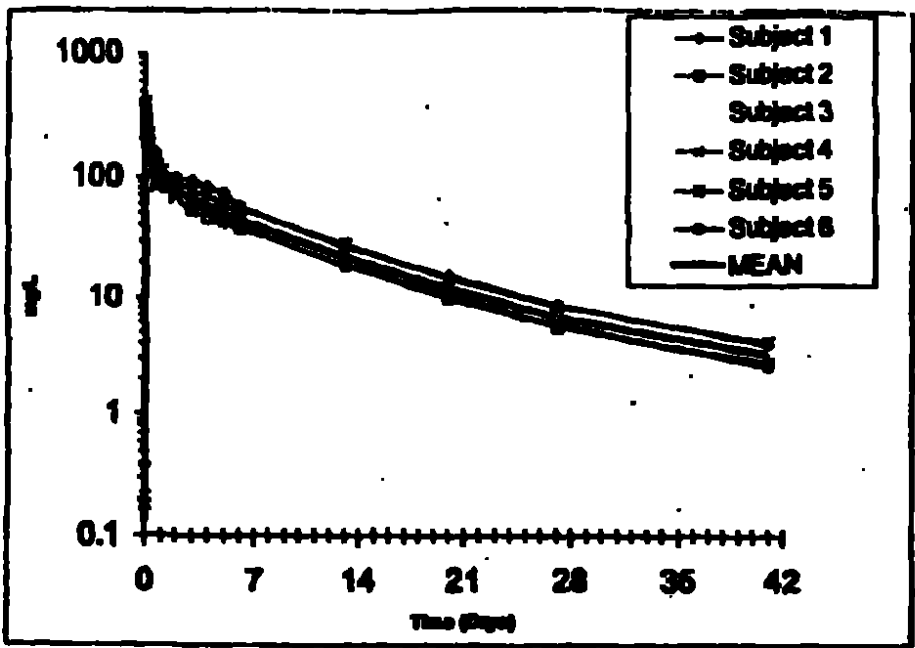
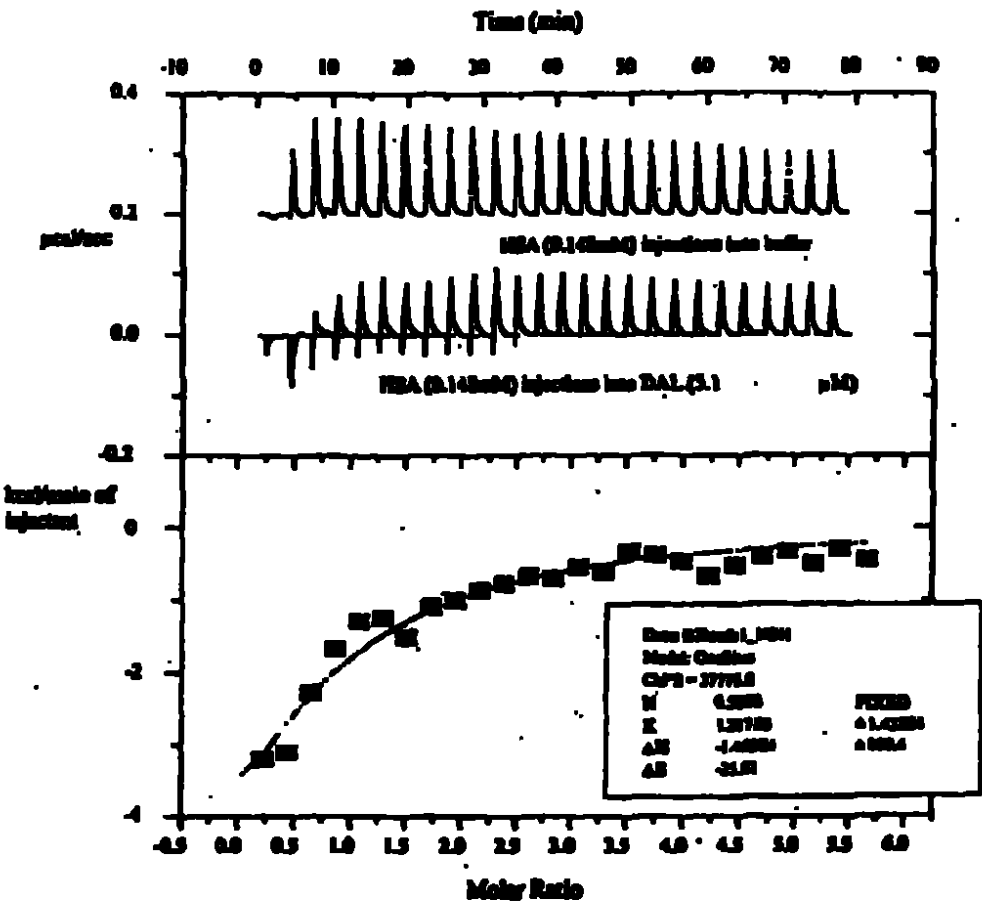


Fig. 6



514

109

Fig. 7

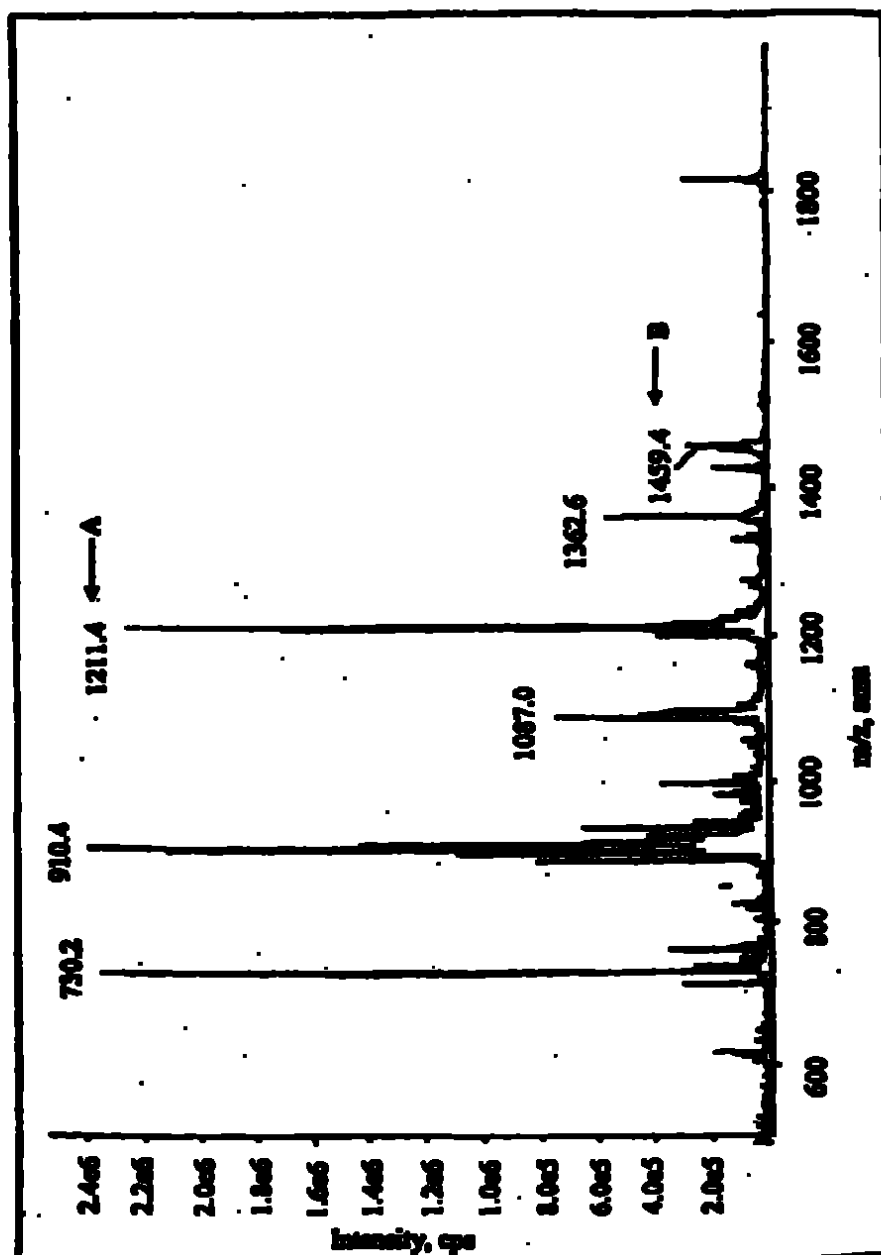
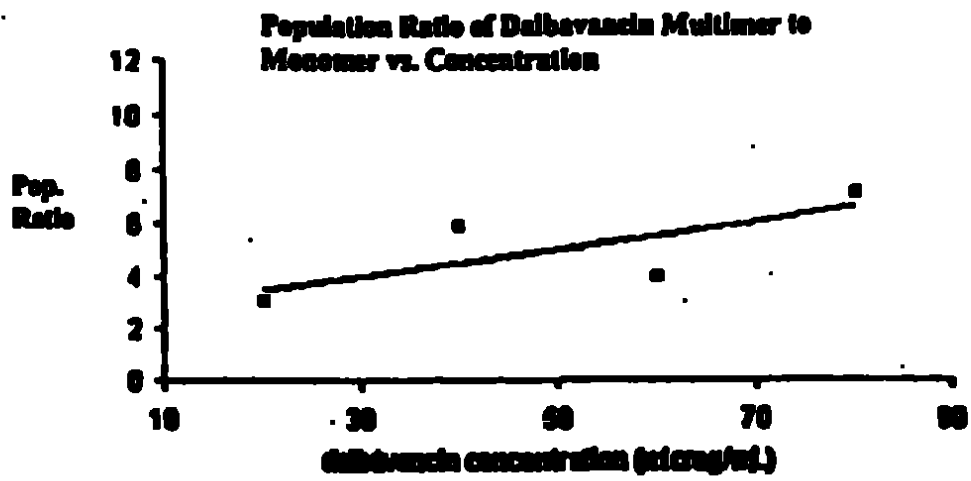
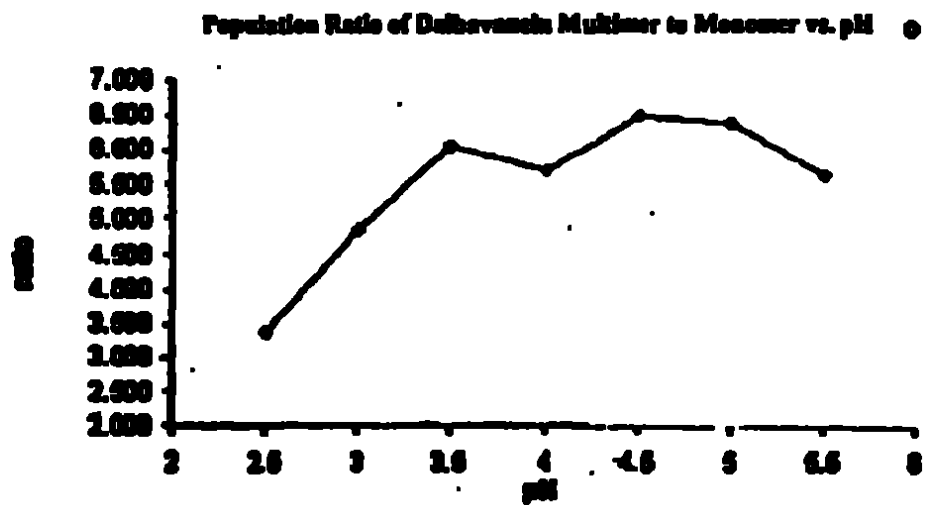


Fig. 8**Fig. 9**

176

Fig. 10

Full scan ESI/MS spectrum of dalbavancin in ammonium formate 5 mM pH 5

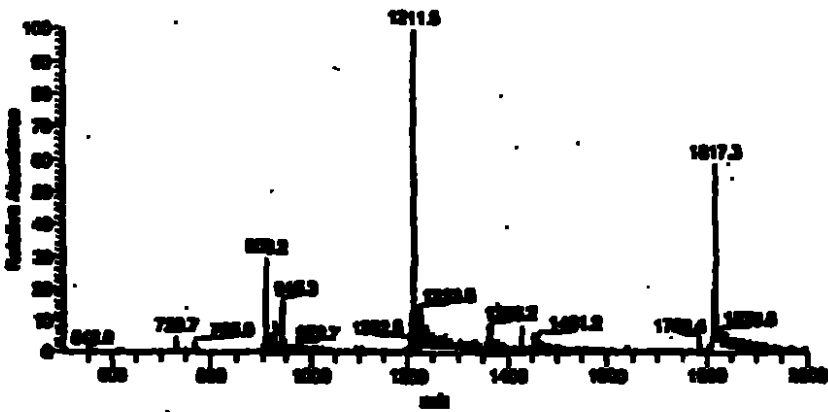


Fig. 11

Full scan ESI/MS spectrum of dalbavancin in ammonium formate 50 mM pH 5

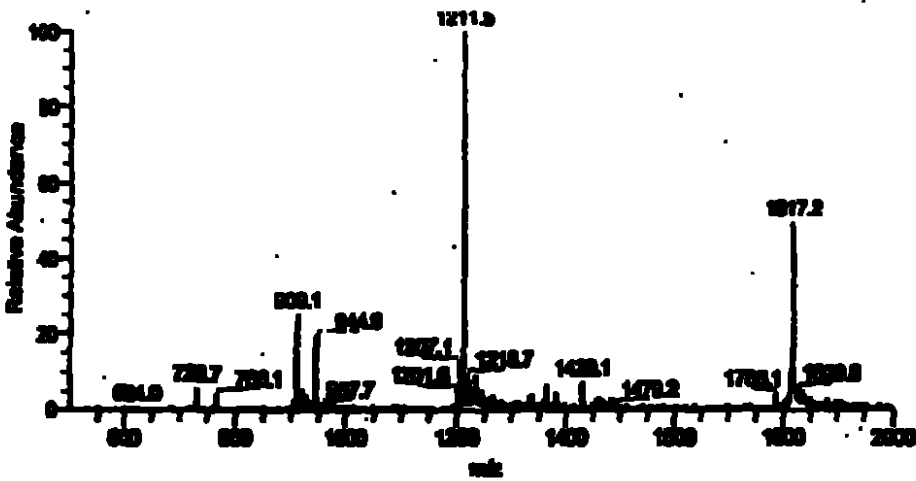


Fig. 12

Full scan ESI/MS spectrum of dalbavancin in ammonium formate 100 mM pH 5

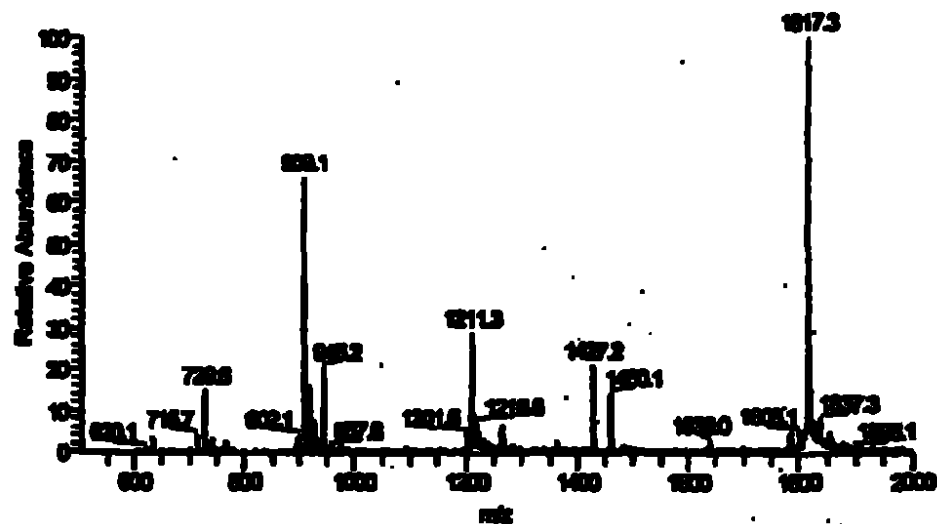


Fig. 13

Full scan ESI/MS spectrum of telaprevir (50 µg/mL) in water



Fig. 14

Full scan ESI/MS spectrum of talceplatin (100 µg/mL) in water

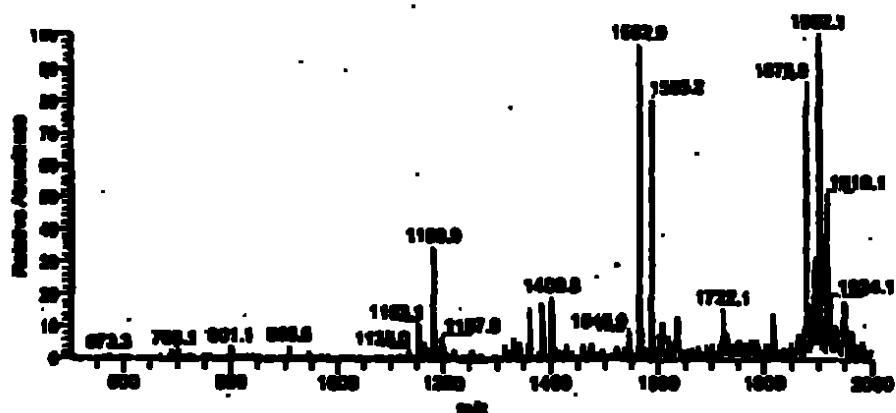


Fig. 15

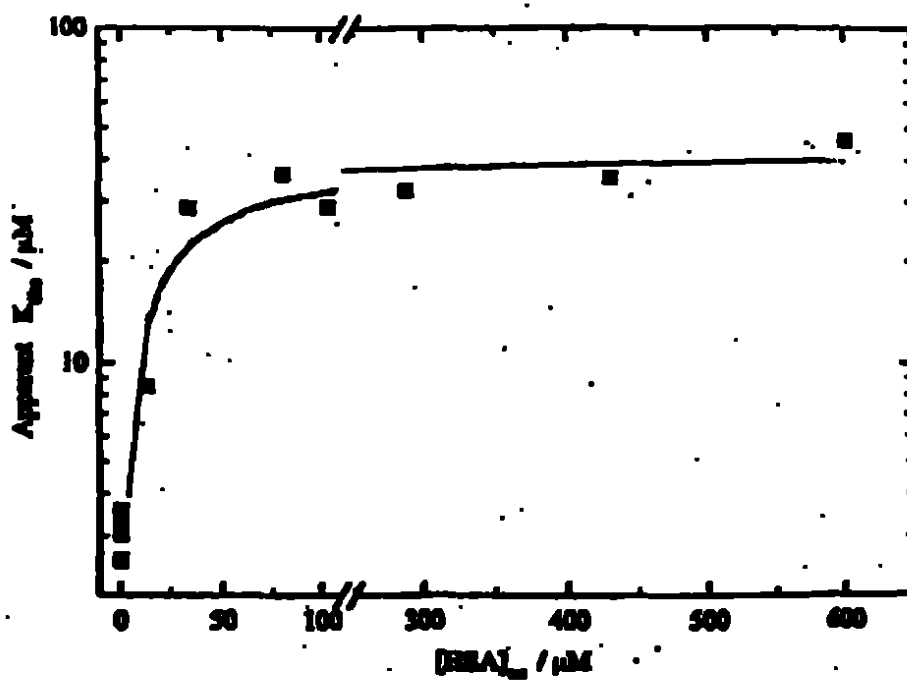
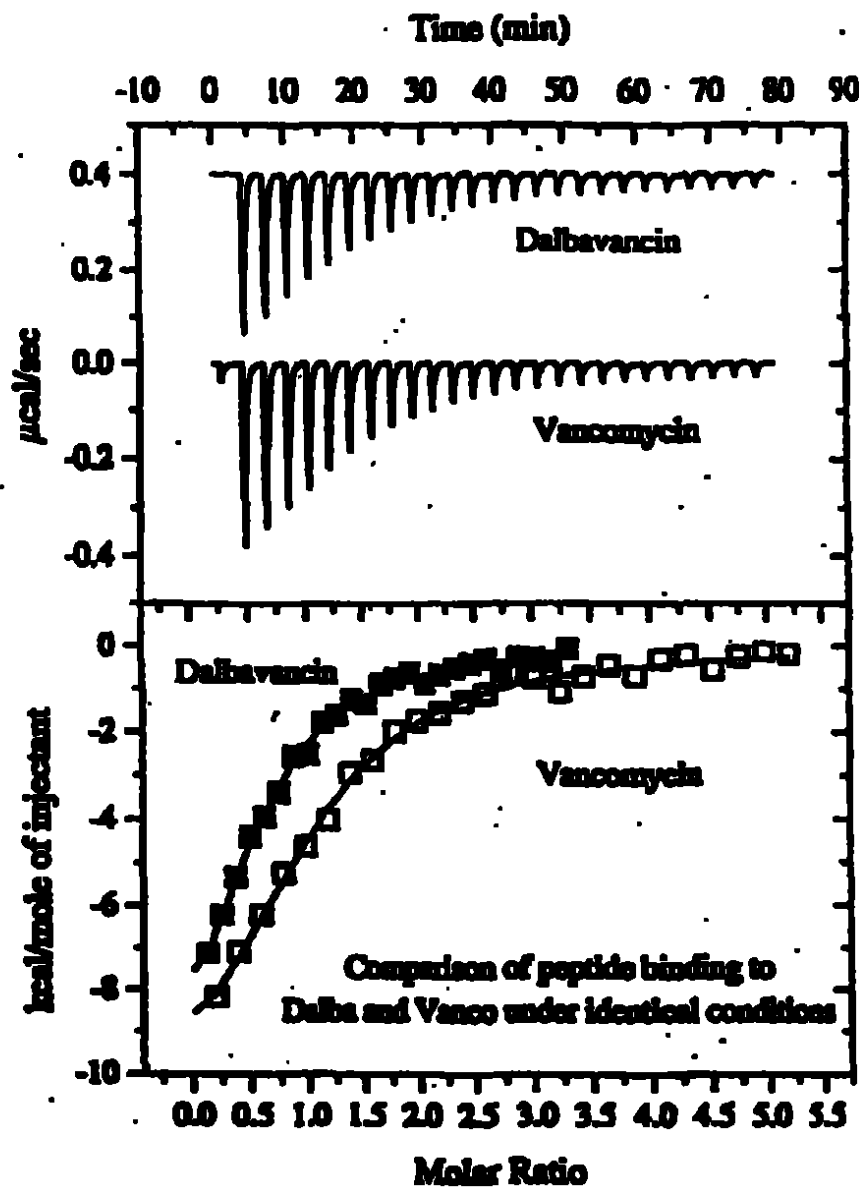
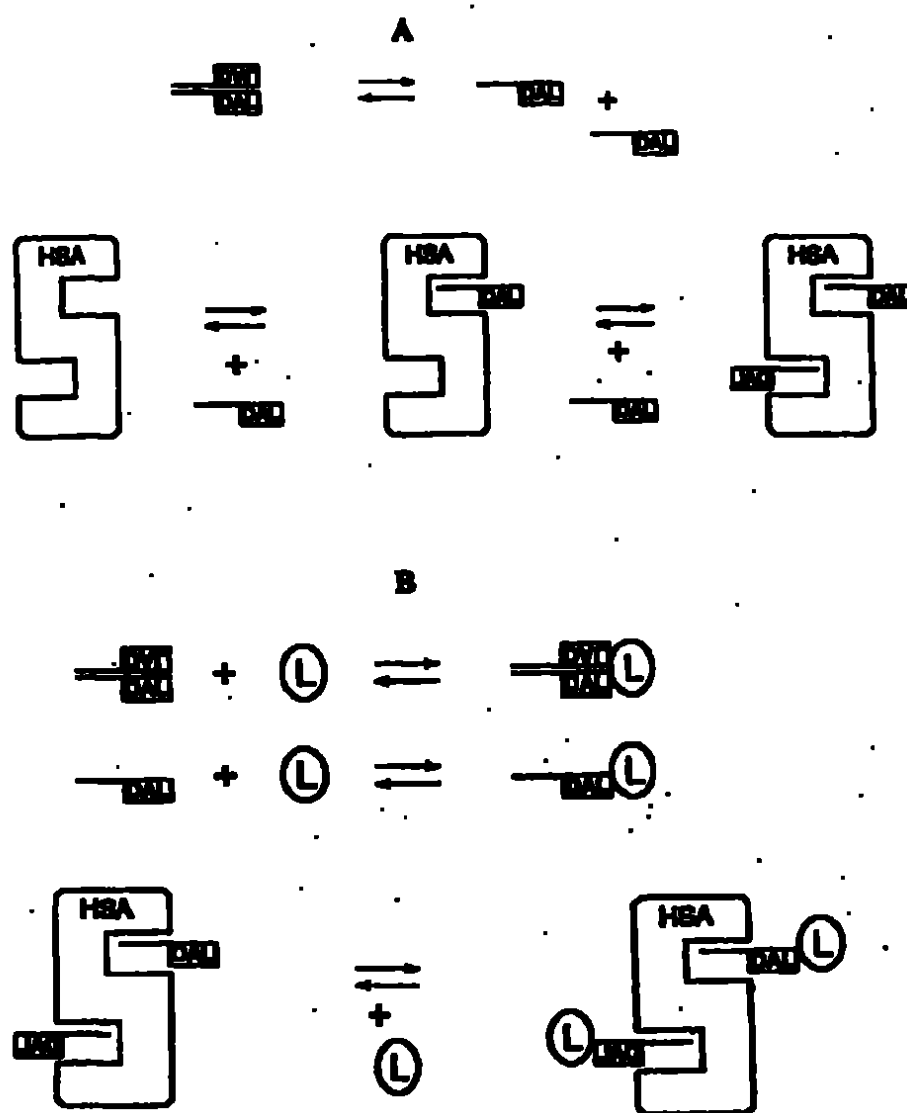


Fig. 16



42
118

Fig. 17



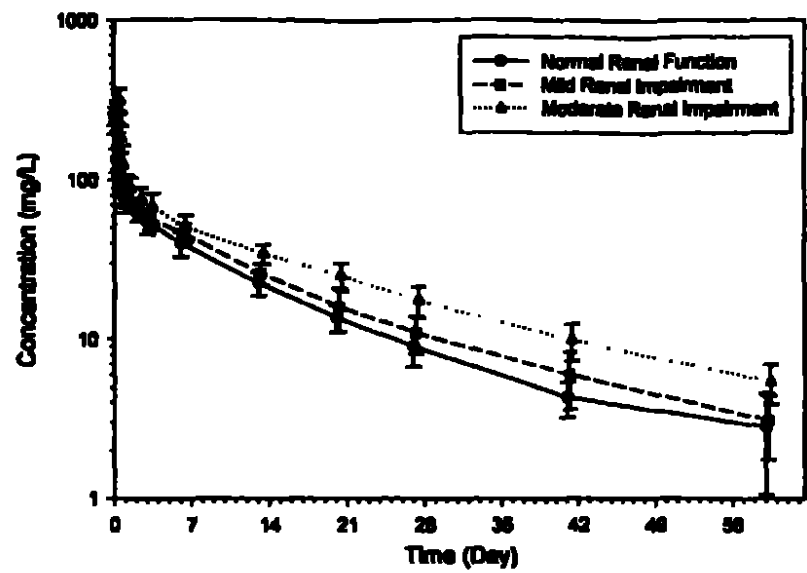


Fig. 18. MEAN ($\pm$ SD) Dalbavancin Plasma Concentration–Time Profiles Following Administration of 1000 MG Dalbavancin in Subjects with Mild renal Impairment, Moderate renal Impairment, or Normal renal Function (Clinical Study VER001-13)

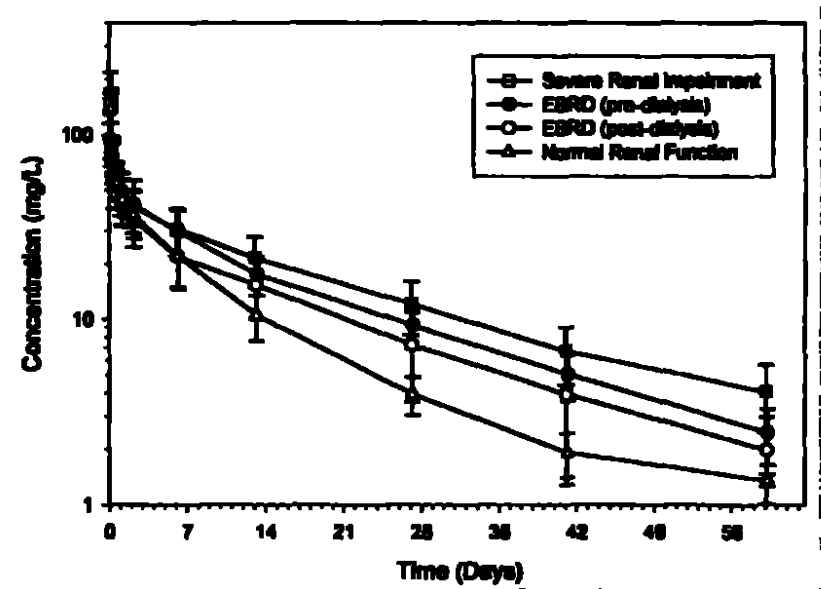


Fig. 19. MEAN ($\pm$ SD) Dalbavancin Plasma Concentration–Time Profiles Following Administration of 500 MG Dalbavancin in Subjects with severe renal Impairment, end-stage renal disease (dialysis-dependent), or Normal renal Function (Clinical Study VER001-11)

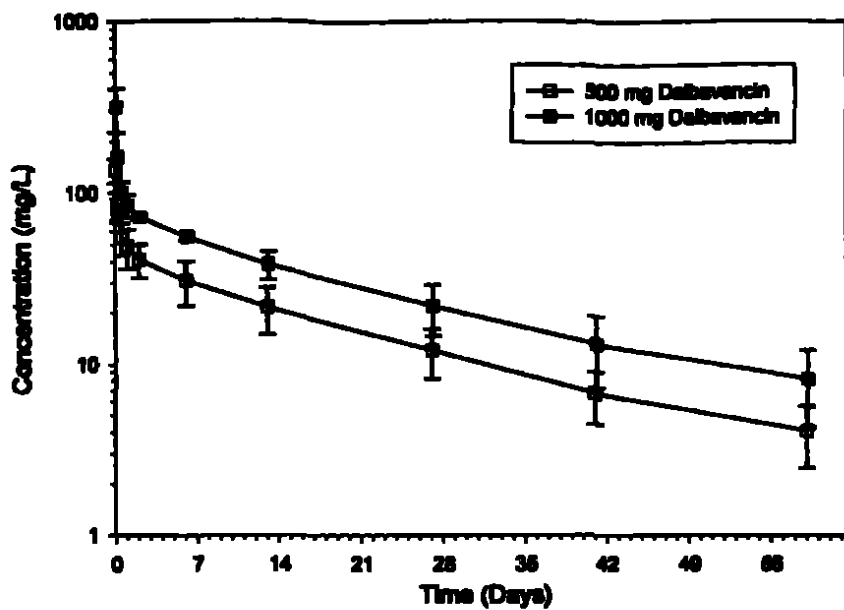
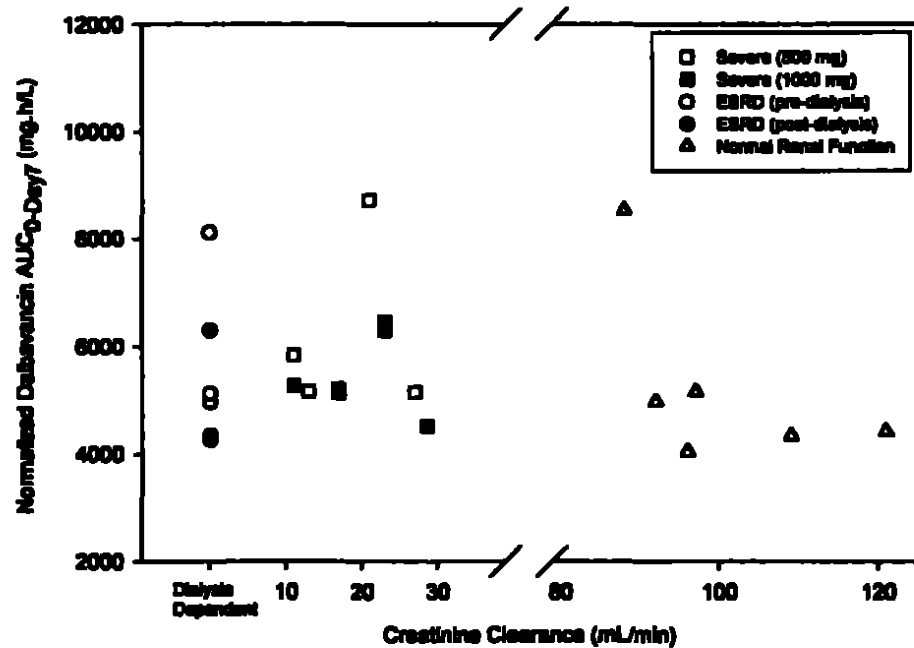
5A
119

Fig. 20. MEAN ($\pm$ SD) Dalbavancin Plasma Concentration-Time Profiles Following Administration of 500 or 1000 MG Dalbavancin in Subjects with severe renal Impairment (Clinical Study VER001-11)



AUC₀₋₇ normalized to a 500 mg dose.

Fig. 21. Dalbavancin exposure through the relative treatment period (AUC₀₋₇) versus creatinine clearance (CL_{CR}) (Clinical Study VER001-11)

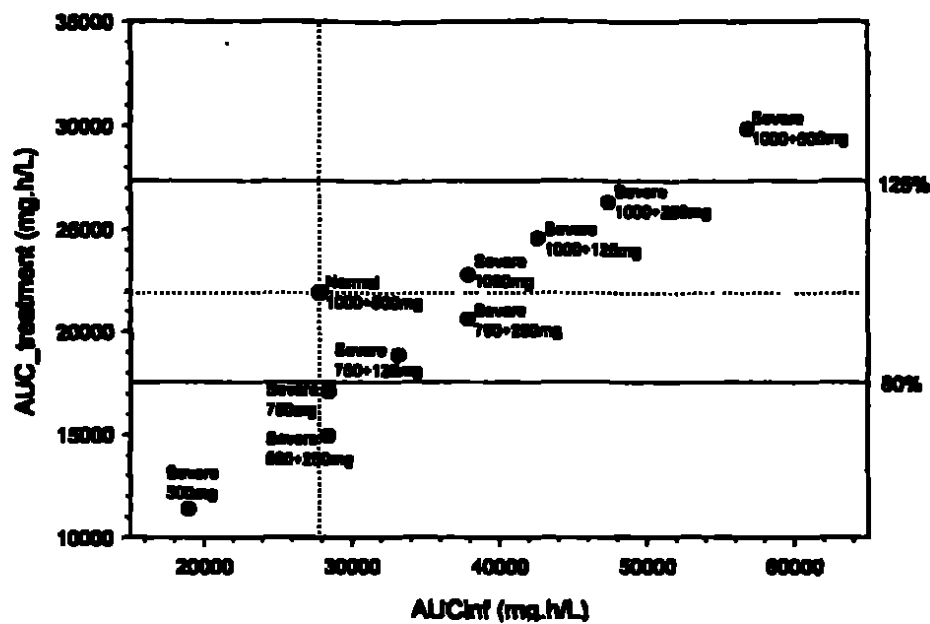


Fig. 22. Comparison of exposure during the relative treatment period (AUC_{14days} or AUC_{treatment}) versus overall exposure (AUC_{inf}) with possible dosage adjustments for patients with Severe renal impairment (Clinical Study VER001-11)

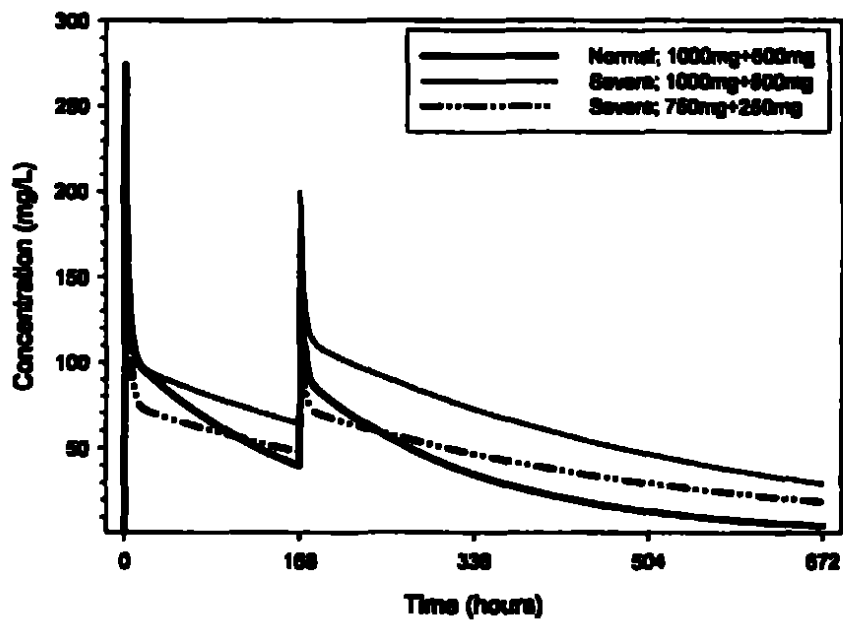


Fig. 23. Dalbavancin concentration-time profiles for subjects with normal renal function and subjects with severe renal impairment receiving the non-adjusted dosage, and subjects with severe renal impairment receiving the recommended dosage adjustment. (Clinical Study VER001-11)

126

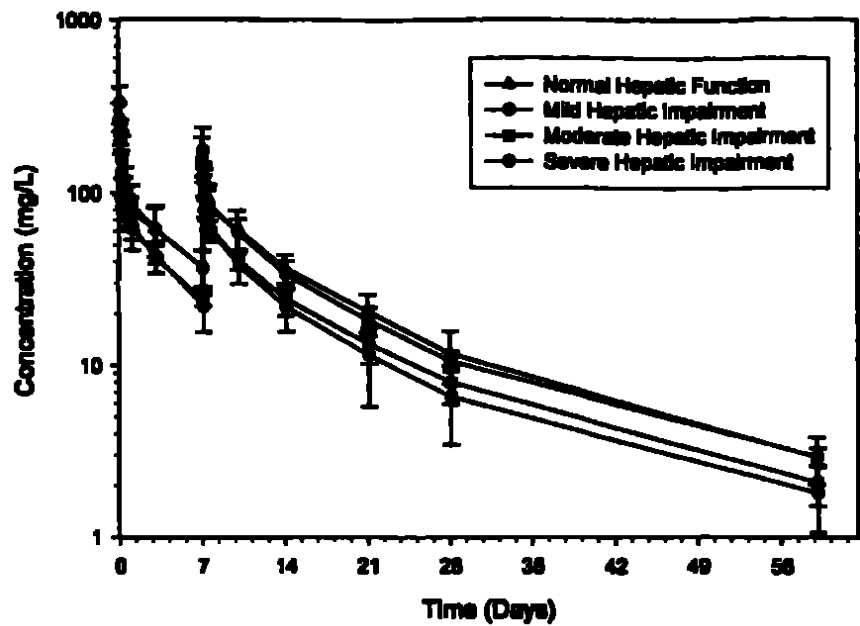


Fig. 24. MEAN ($\pm$ SD) Dalbavancin Plasma Concentration–Time Profiles Following Administration of 1000 MG Dalbavancin Day 1 and 500 MG Dalbavancin on Day 8 in Subjects with Mild Hepatic Impairment, Moderate Hepatic Impairment, Severe Hepatic Impairment, or Normal Hepatic Function

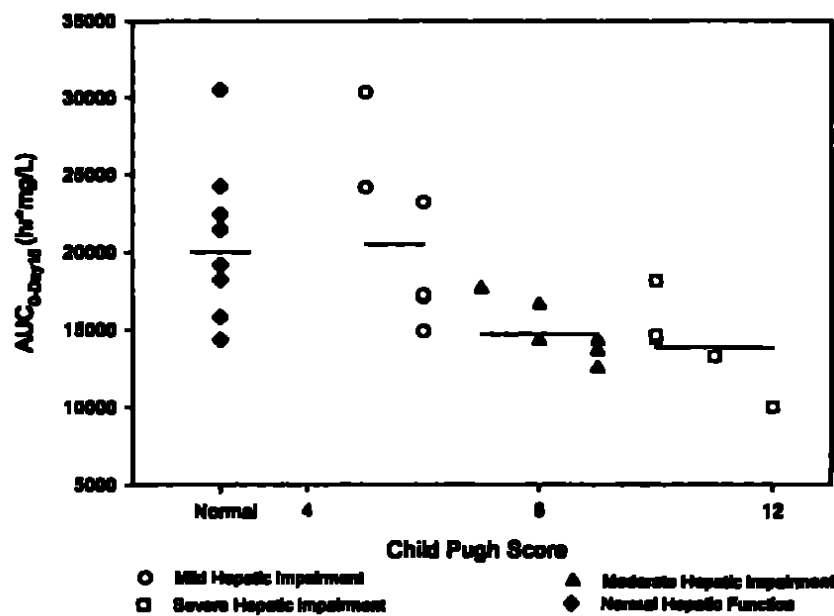


Fig. 25. Comparison of Dalbavancin exposure through the relative 14-day treatment period (auc_{0-14 days}) in Subjects with Mild Hepatic Impairment, Moderate Hepatic Impairment, Severe Hepatic Impairment, or Normal Hepatic Function

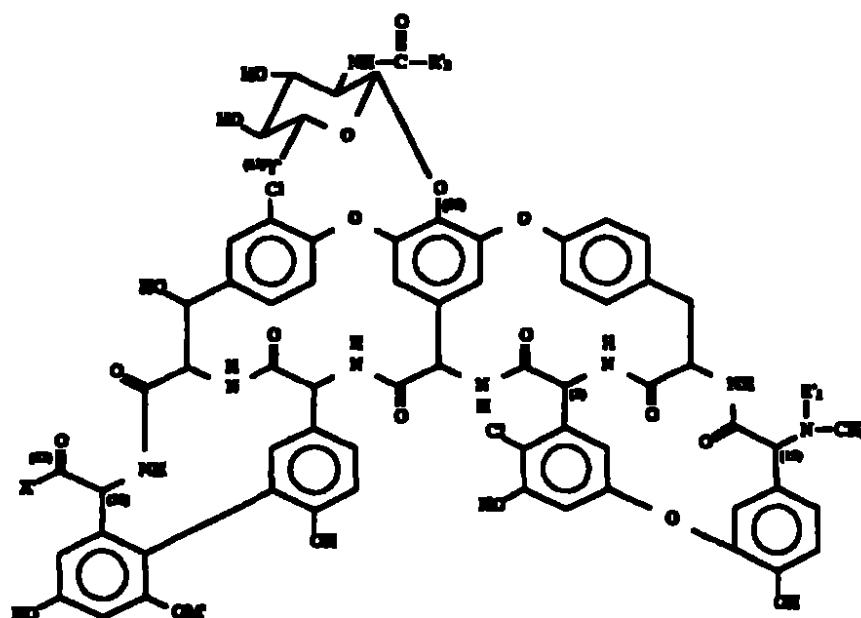


Fig. 26. Structure of Antibiotic A40926 and Dalbavancin Compounds

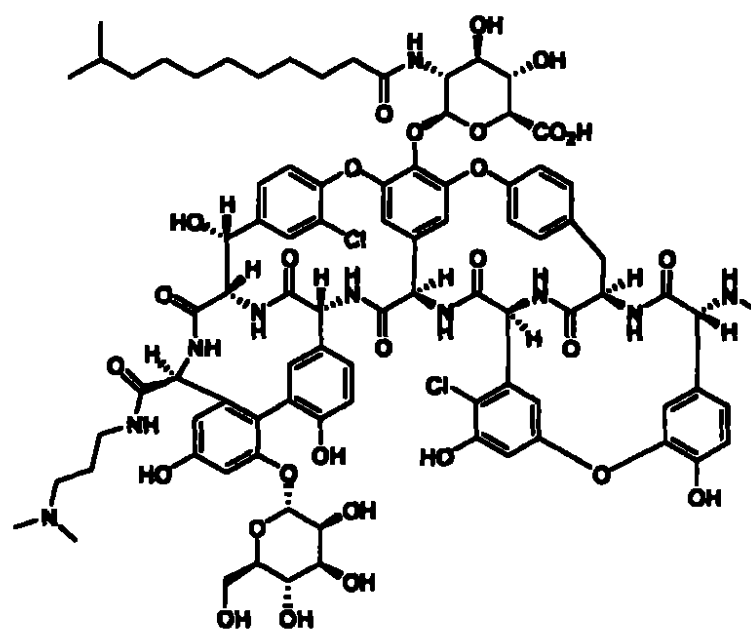


Fig. 27. Structure of Dalbavancin B₀.

92
121

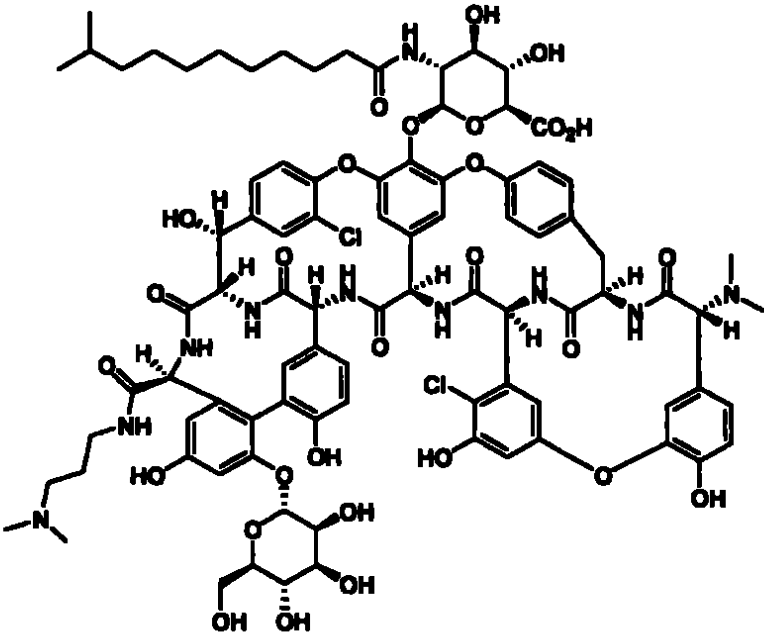


Fig. 28. Structure of a N¹⁵, N¹⁵-dimethyl compound.

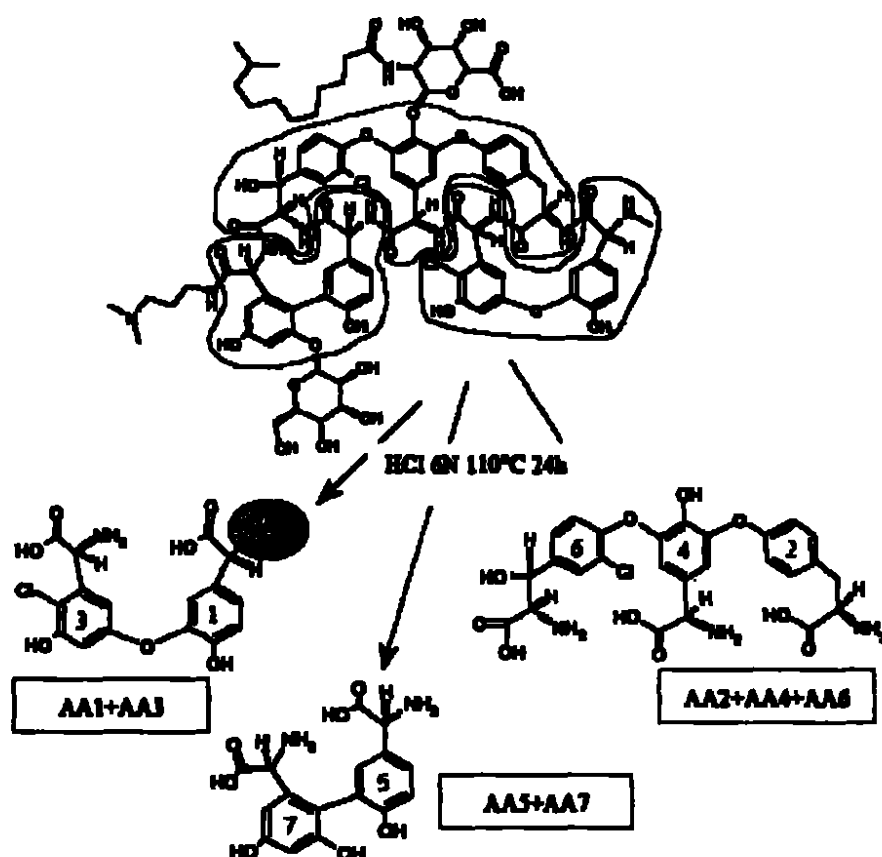


Fig. 29

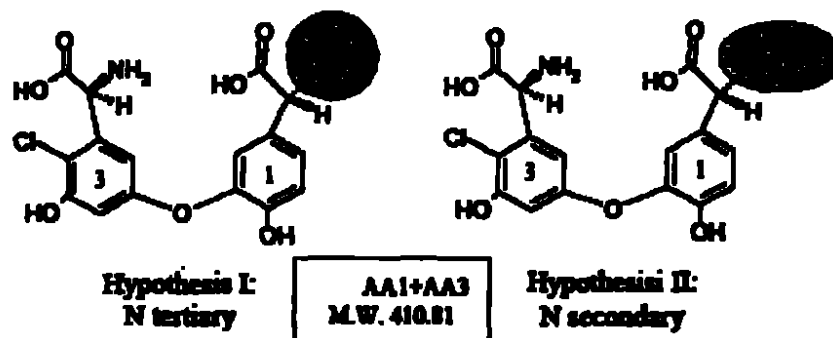


Fig. 30

859-
227

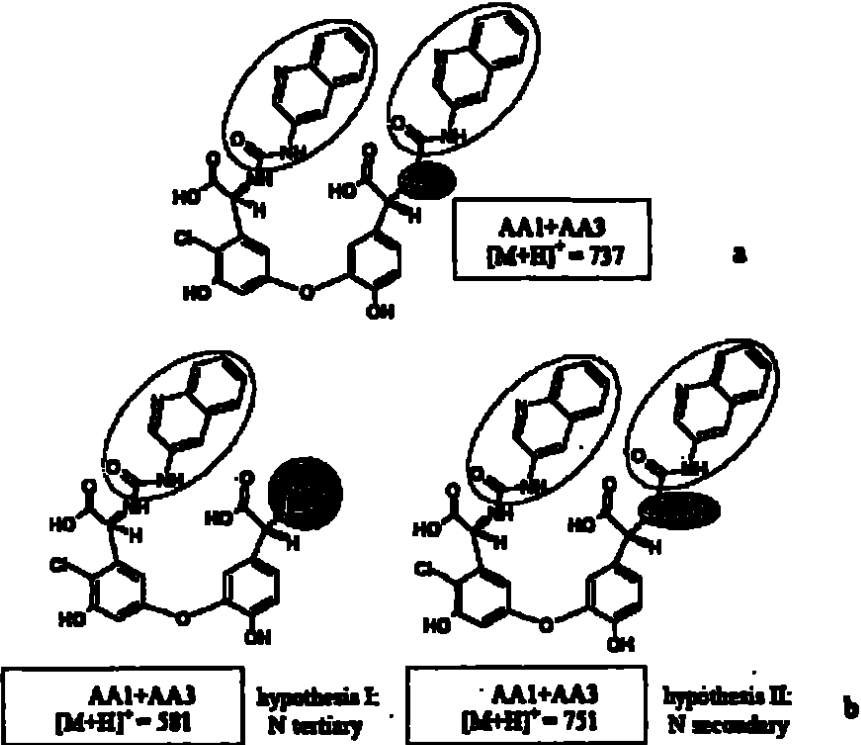


Fig. 31

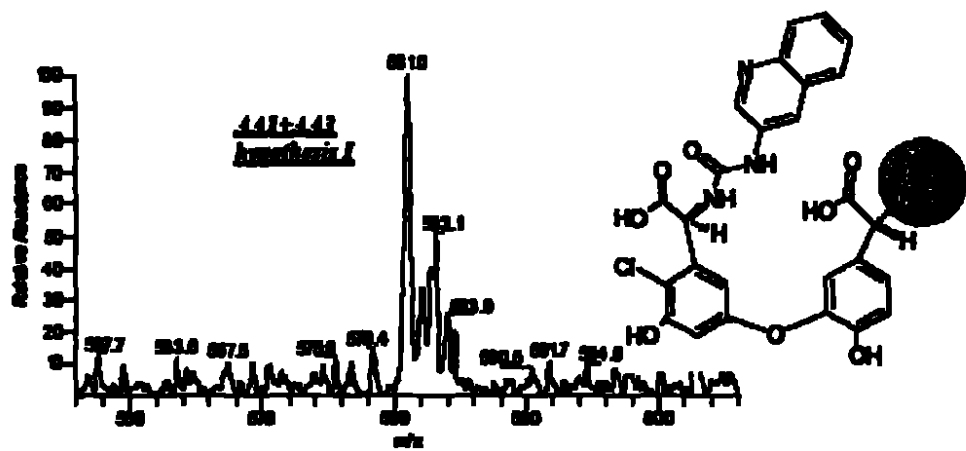


Fig. 32

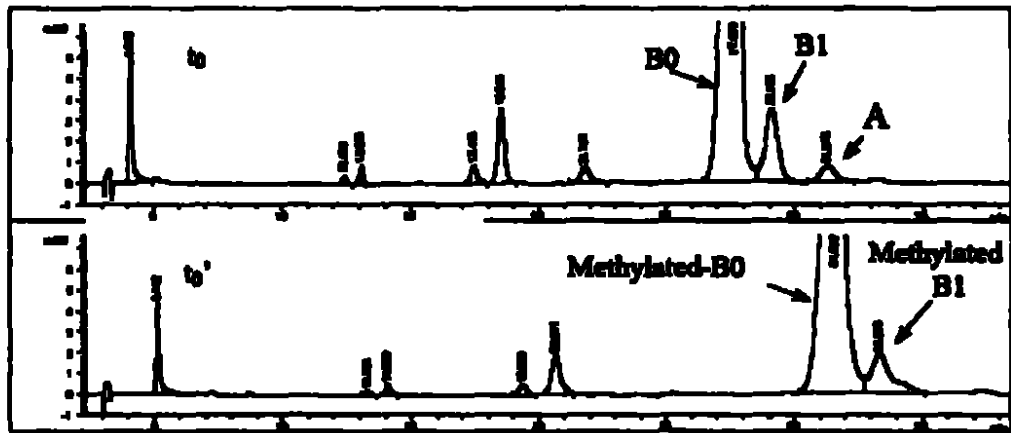


Fig. 33

123

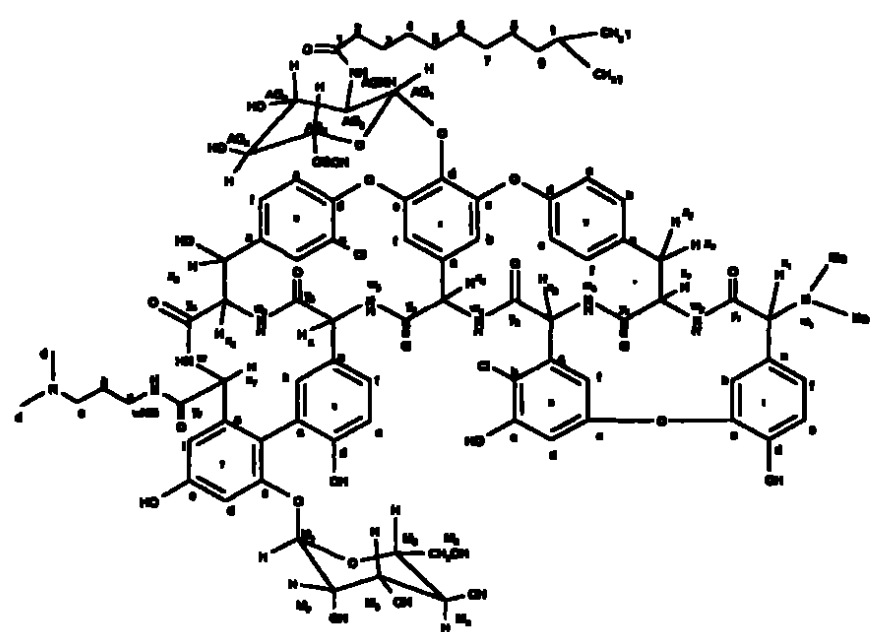


Fig. 34. Structure of dalbavancin B₂.

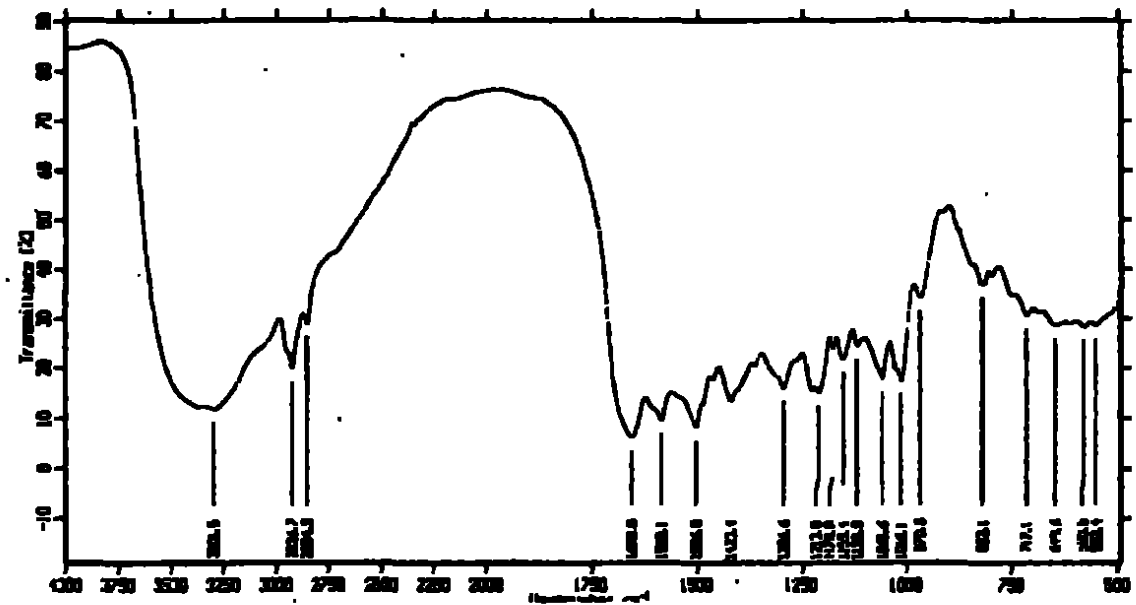


Fig. 35. Infrared Spectrum of N¹⁵,N¹⁵-dimethyl dalbavancin B₂.

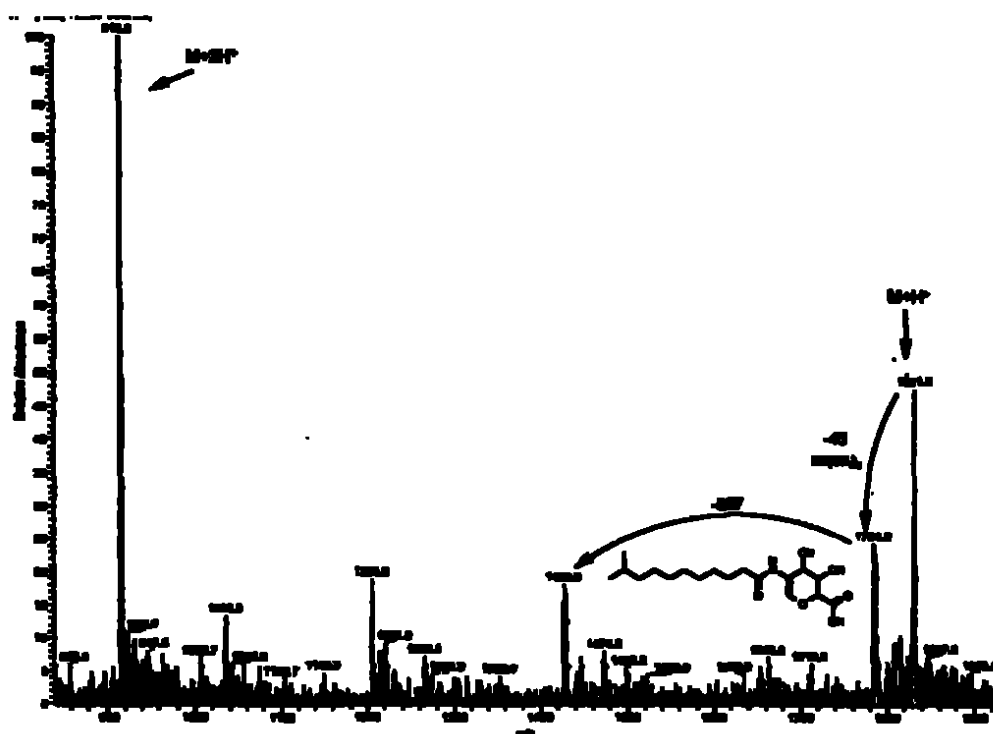


Fig. 36. ESI-MS of N¹⁵,N¹⁵-dimethyl dalbavancin B₂.

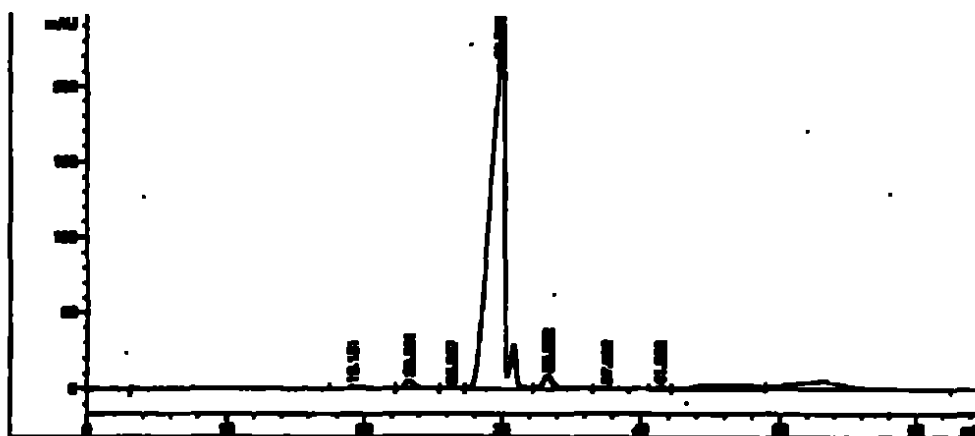


Fig. 37. HPLC trace of dalbavancin composition.

124

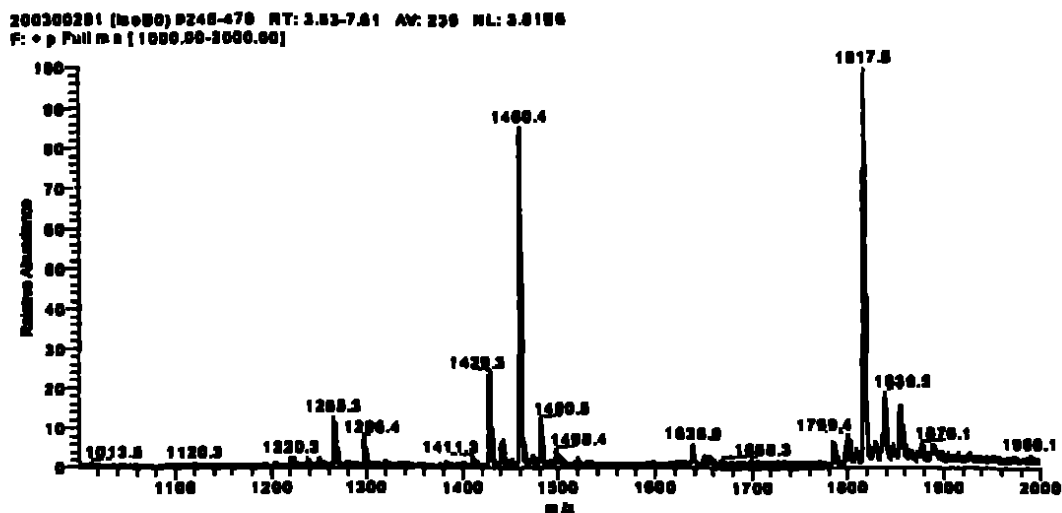


Fig. 38. Full ESI-MS spectrum of dalbavancin impurity RRT 0.76

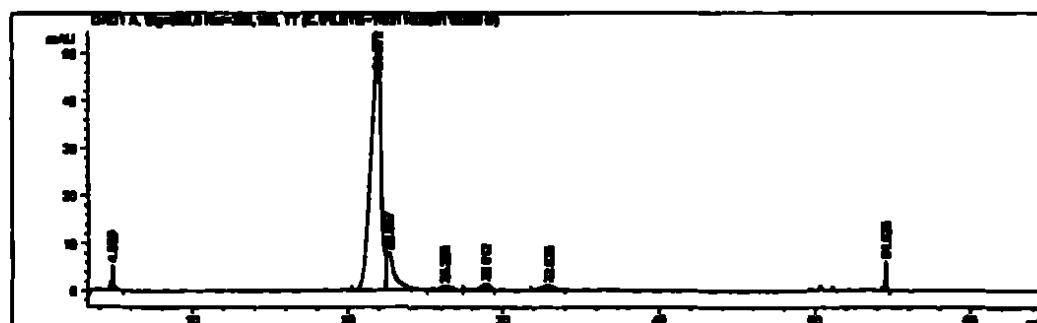
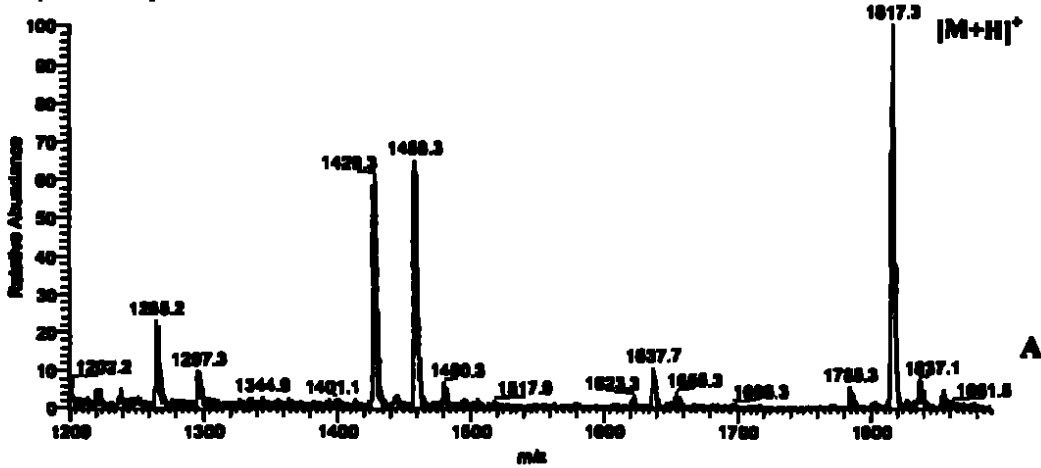
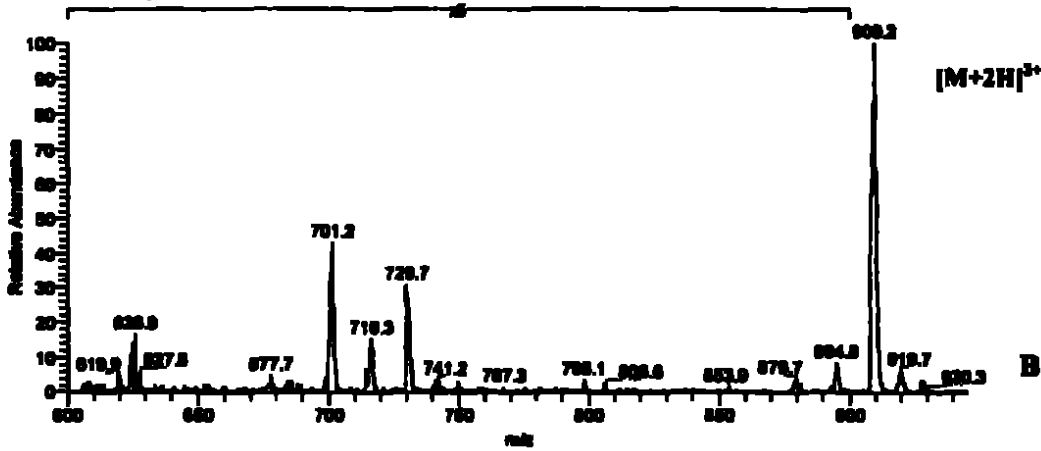


Fig. 39. HPLV-UV profile of RRT 0.76 impurity

Isob 25 1000-2000 (100) 01364-1403 RT: 24.17-24.90 AM: 60 SE: 70 NL: 7.0325
T: + p ESI Full ms [1000.00-2000.00]



Isob 25 600-1000 (100) 02304-2300 RT: 24.25-25.20 AM: 60 SE: 101 23.84-24.21, 25.98-27.06 SE: 70 NL: 6.7425
T: + p ESI Full ms [600.00-1000.00]



25 MS-MS03 01401-1534 RT: 25.00-25.90 AM: 27 SE: 11 25.00-25.57 NL: 1.7250
P: + p ESI Full ms2 1817.50@300.00 [500.00-2000.00]



Fig. 40. Mass spectra of impurity Iso B0: A) full scan 1000-2000 amu (monocharged ions), B) full scan 600-1000 amu (doublecharged ions), C) fragmentation of $[M+H]^+$ ion.

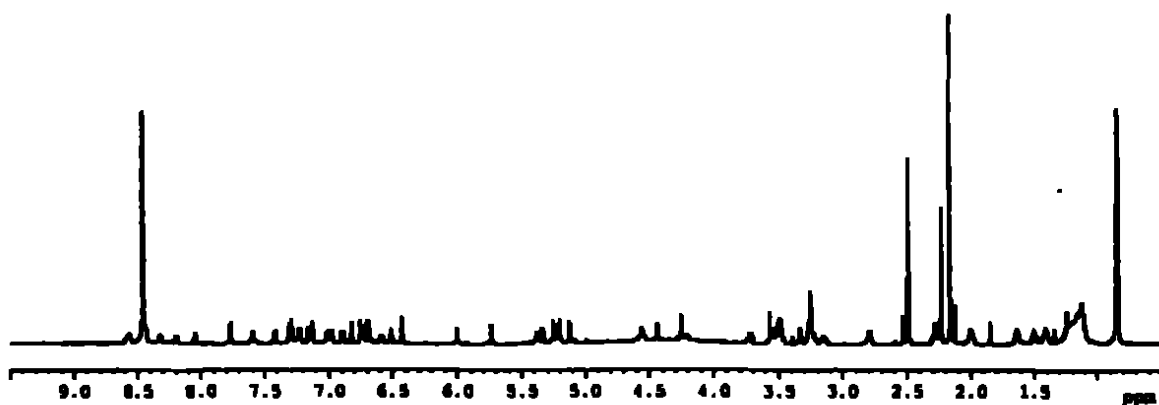


Fig. 41. ^1H NMR spectrum of RRT 0.76 impurity

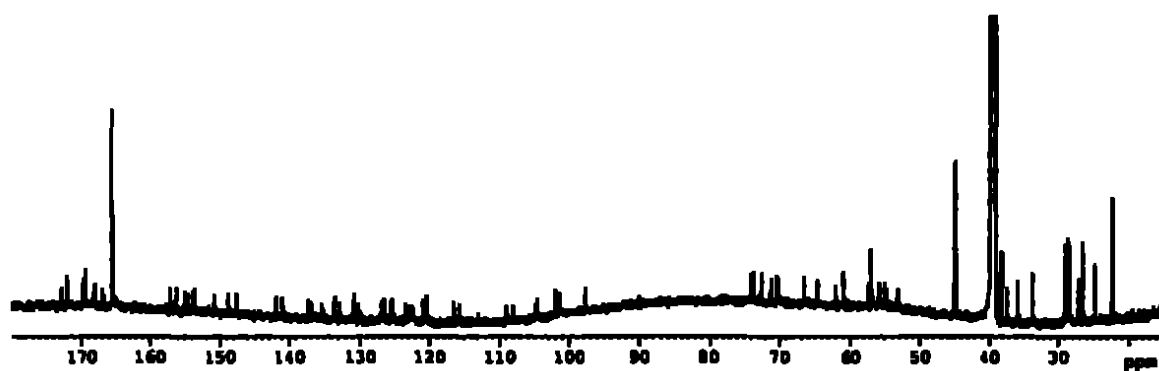


Fig. 42. ^{13}C NMR spectrum of RRT 0.76 impurity

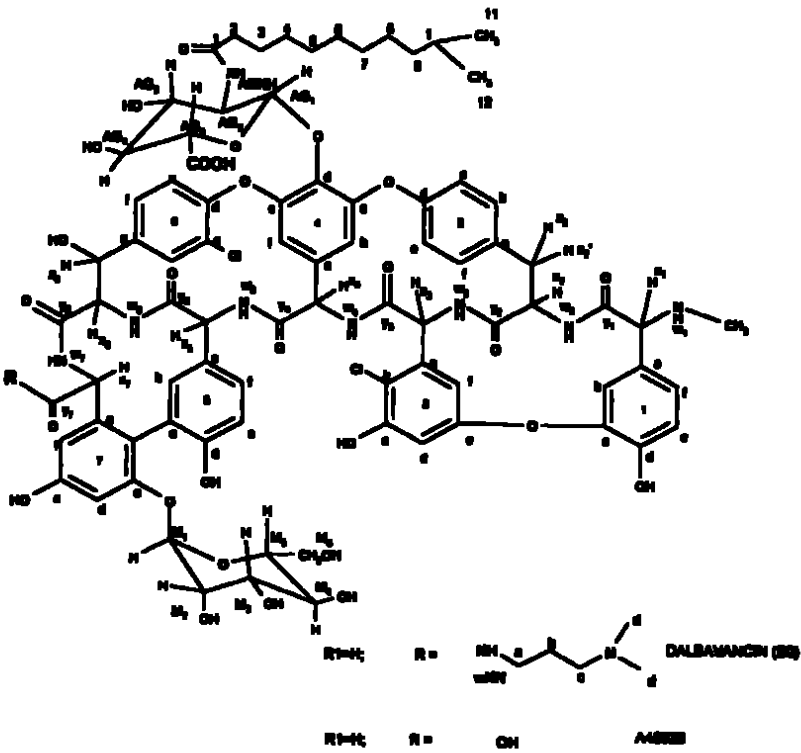


Fig. 43.

28
726

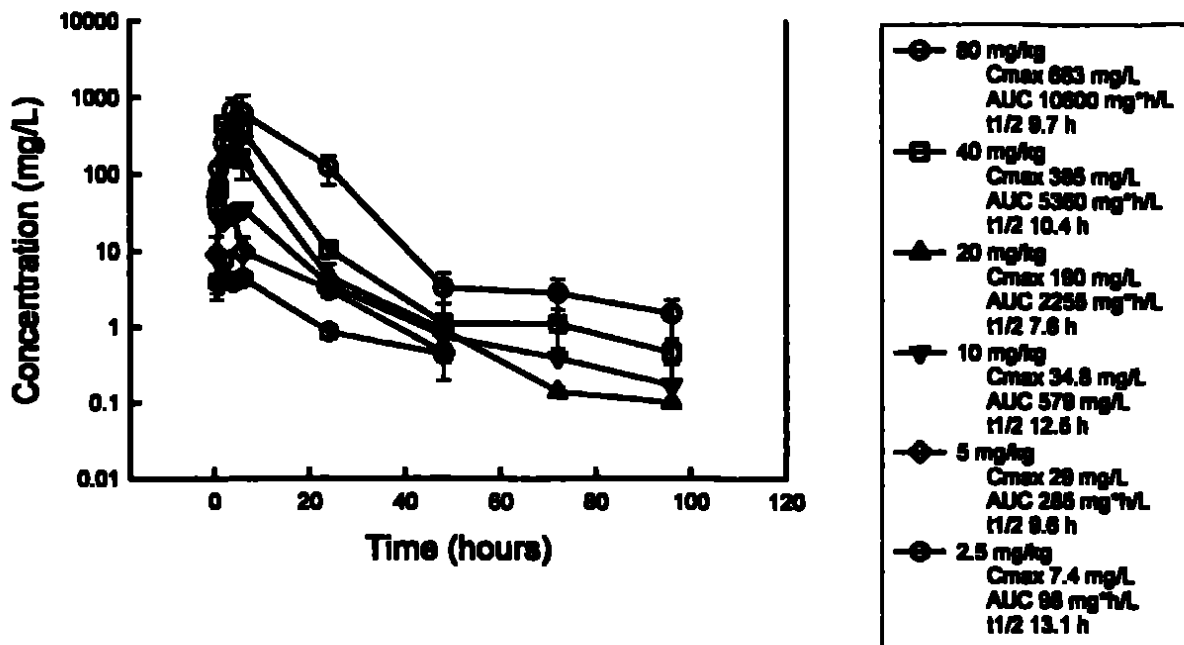


Fig. 44. Single Dose (IP) Dalbavancin Serum Pharmacokinetics in Neutropenic Infected Mice

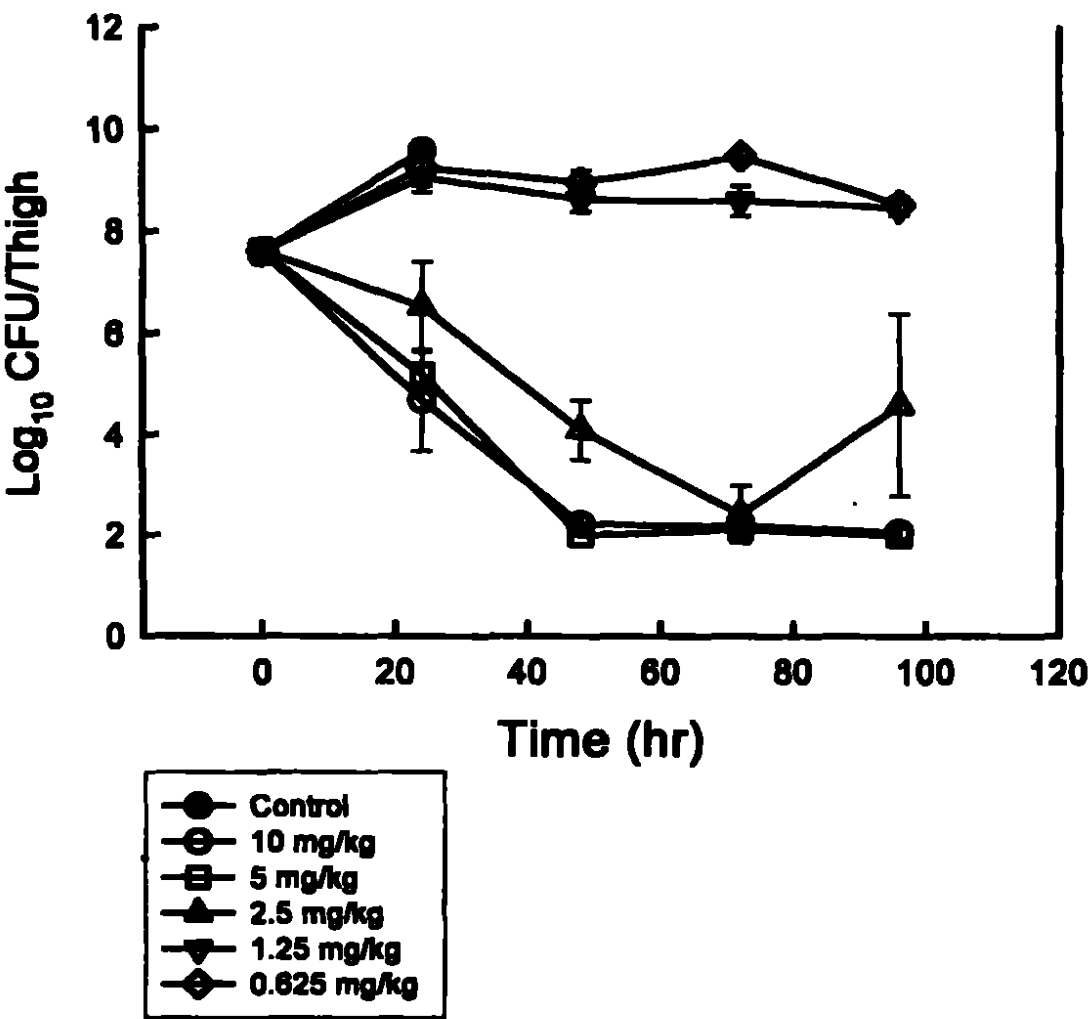


Fig. 45. Dalbavancin Single Dose Time Kill Against *S. pneumoniae* in a Murine Thigh Infection Model

127

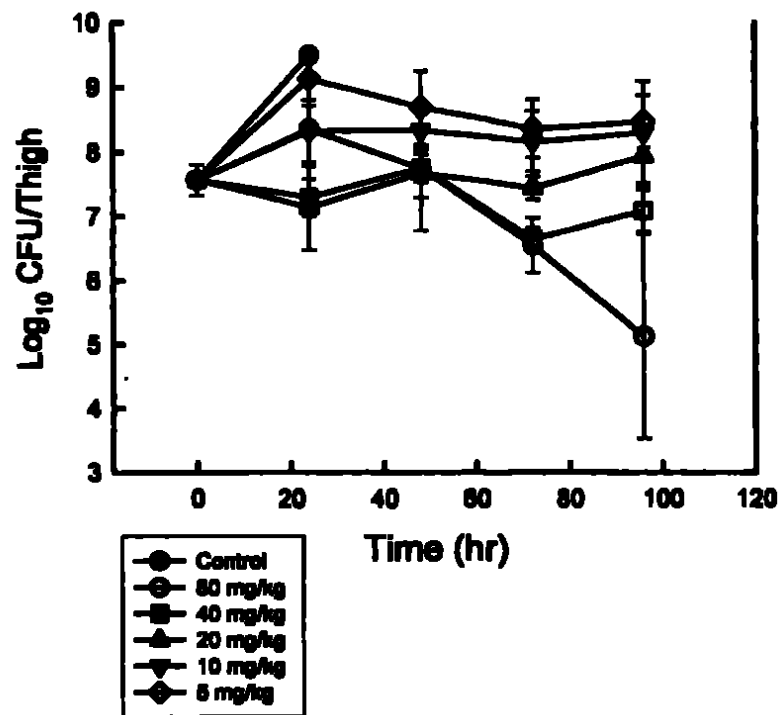


Fig. 46. Dalbavancin Single Dose Time Kill Against *S. aureus* in a Murine Thigh Infection Model

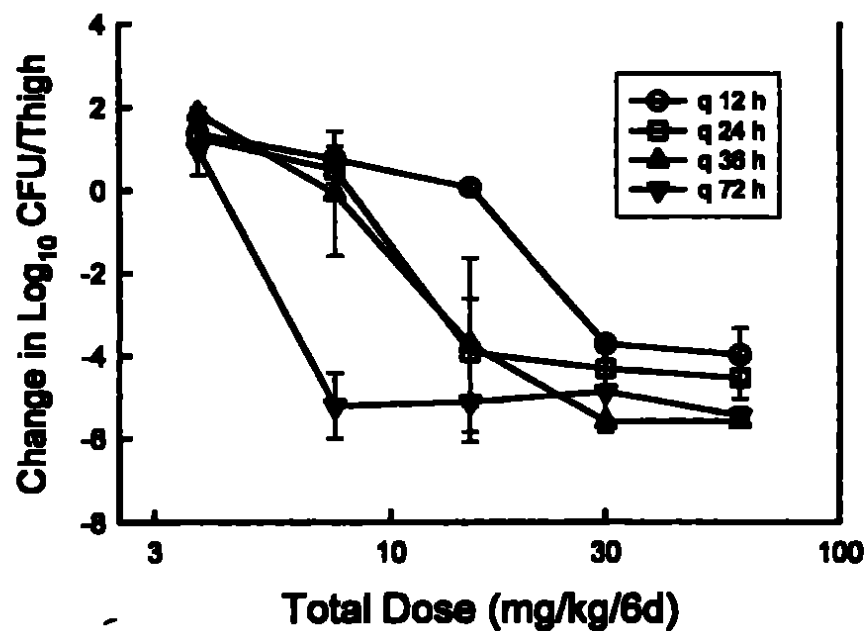


Fig. 47. Relationship between Dalbavancin Dosing Interval and Efficacy Against *S. pneumoniae* in a Murine Thigh Infection Model.

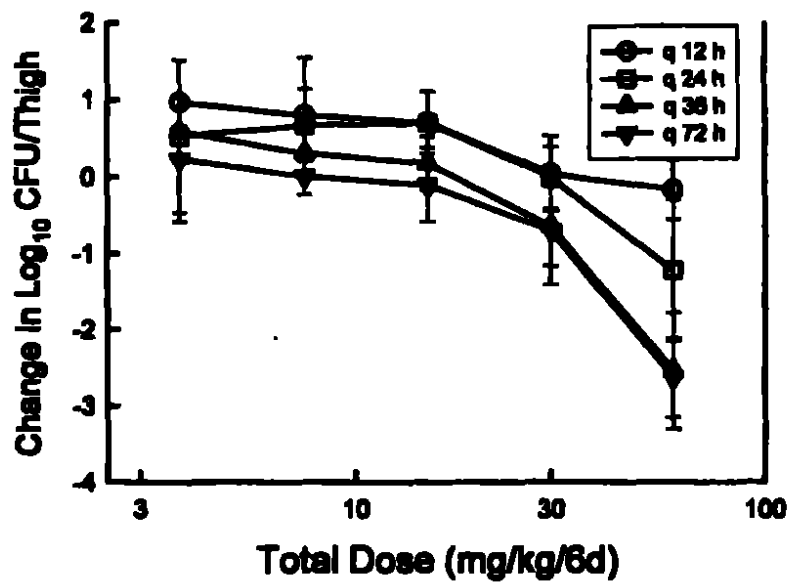


Fig. 48. Relationship Between Dalbavancin Dosing Interval and Efficacy Against *S. aureus* in a Murine Thigh Infection Model.

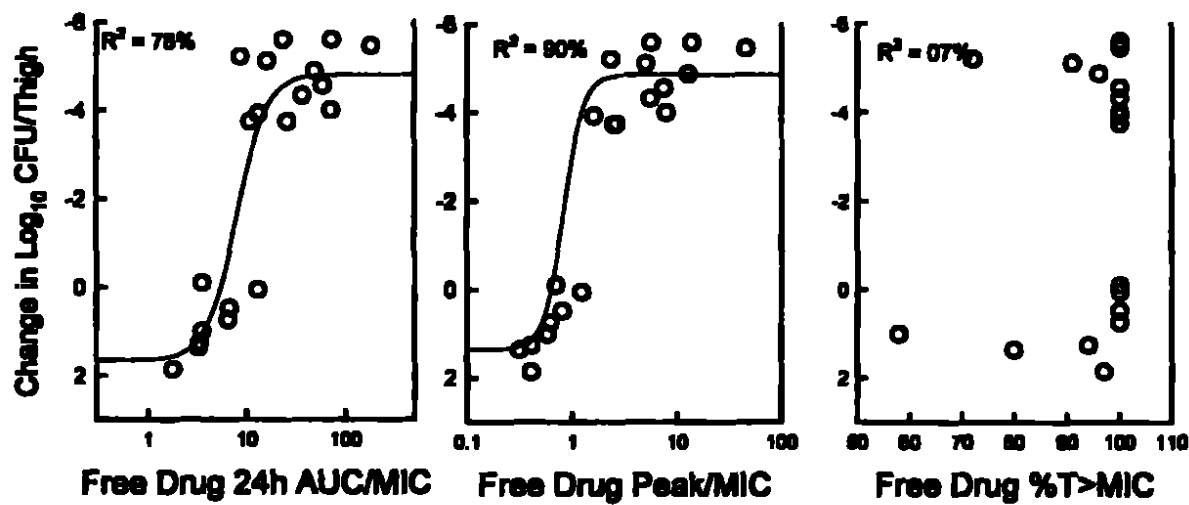


Fig. 49. Relationship Between Dalbavancin PK/PD Parameters and Efficacy Against *S. pneumoniae* in a Murine Thigh Infection Model.

128

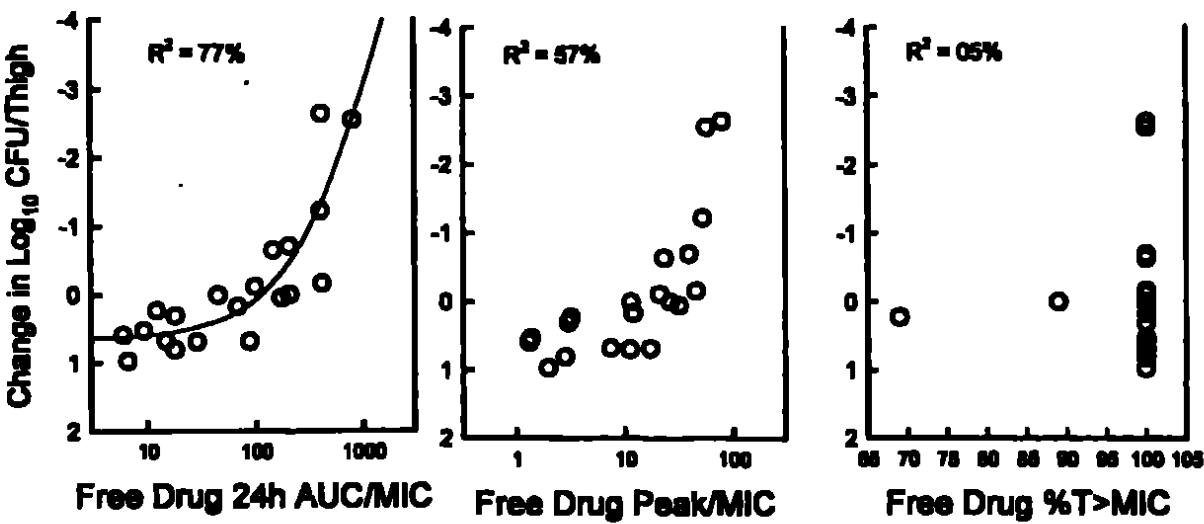


Fig. 50. Relationship Between Dalbavancin PK/PD Parameters and Efficacy Against *S. aureus* in a Murine Thigh Infection Model.

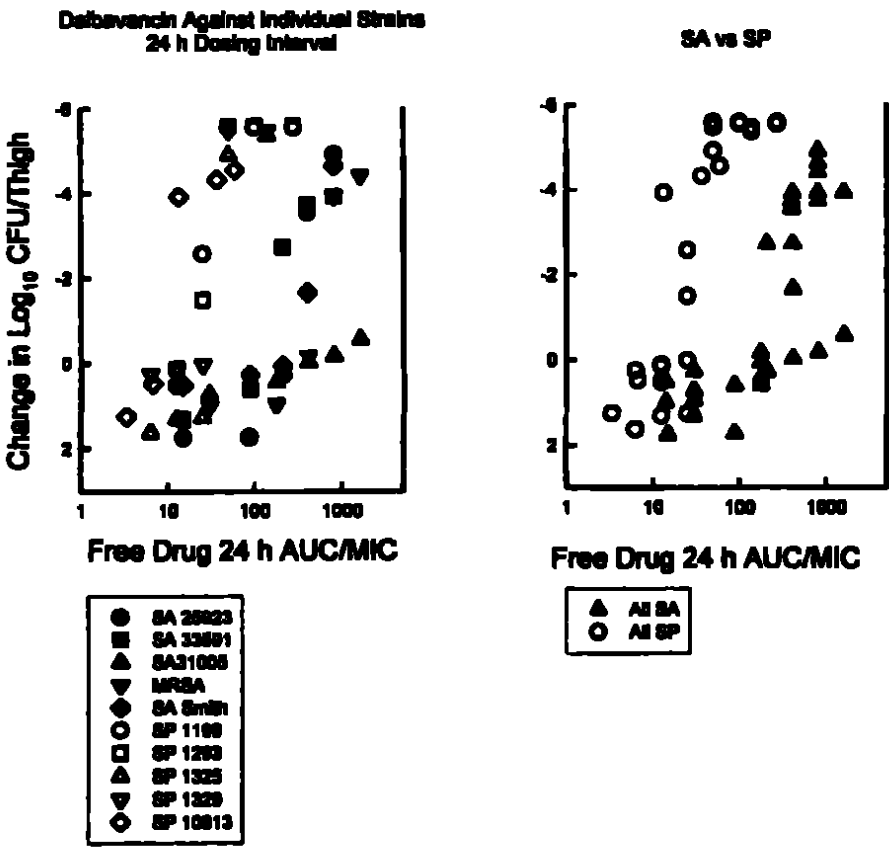


Fig. 51

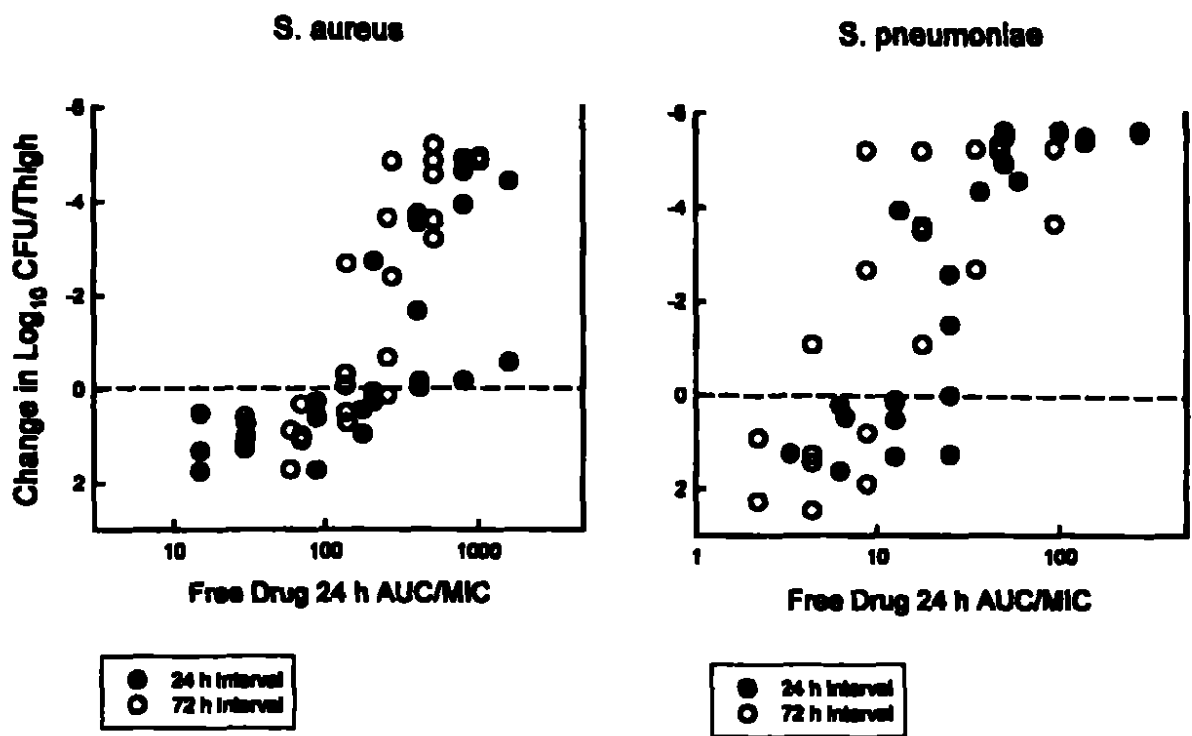


Fig. 52.

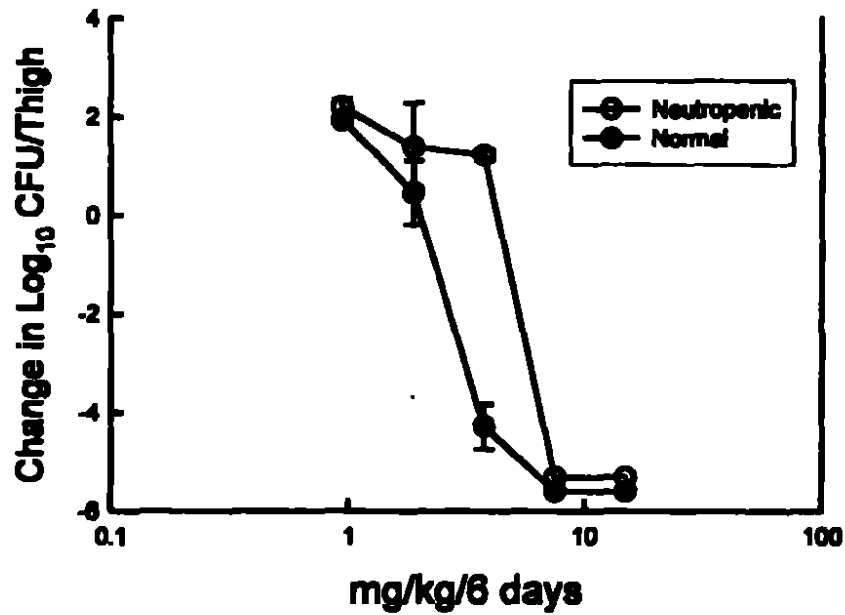


Fig. 53. Impact of Neutrophils on In Vivo Activity of Dalbavancin Against *S. pneumoniae* in a Murine Thigh Infection Model.

95
729

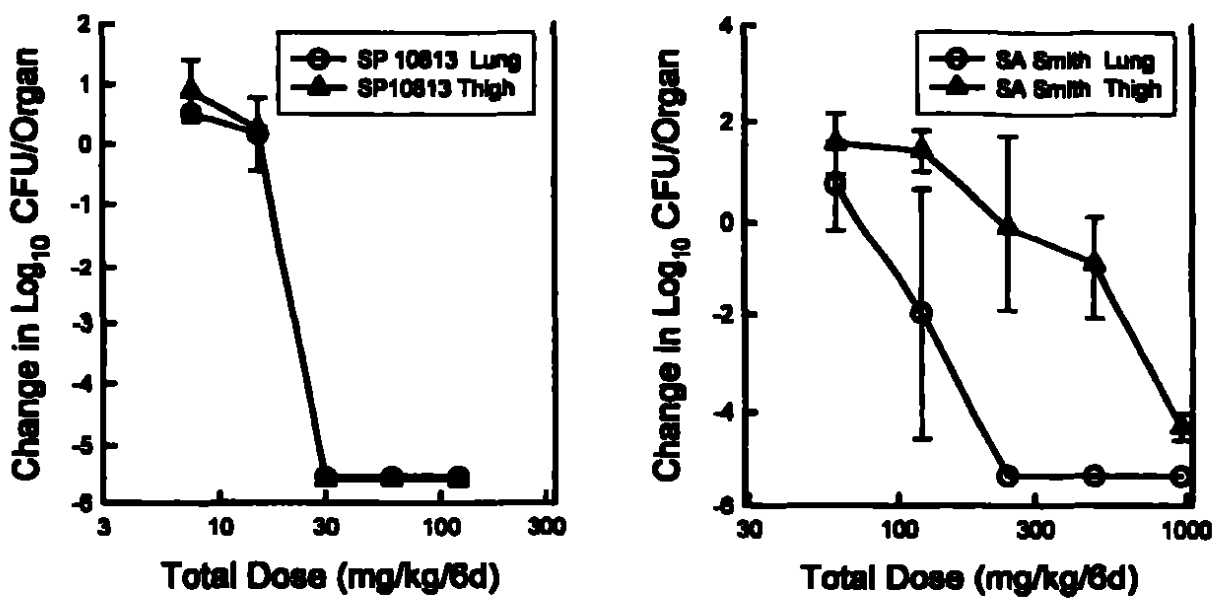


Fig. 54. Efficacy of Dalbavancin Against *S. pneumoniae* and *S. aureus* in both the Lung and Thigh Infection Models – Impact of Infection Site.

**COMPOSICIONES DE DALBAVANCINA PARA EL TRATAMIENTO DE
INFECCIONES BACTERIANAS**

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 Esta solicitud se refiere a composiciones de dalbavancina y procedimientos de uso de tales composiciones en procedimientos de tratamiento de infecciones bacterianas.

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 10 Esta solicitud es una presentación internacional basada en la Solicitud de Estados Unidos N° de serie [expediente del mandatario N° 892.280-225], presentado el 26 de abril de 2005, que es una continuación en parte de la Solicitud de Estados Unidos N° de serie 10/834.395, presentada el 27 de abril de 2004; que es una continuación en parte de la Solicitud de Estados Unidos N° de serie 10/714.261, presentada el 14 de noviembre de 2003, que reivindica el
- 15 beneficio de las solicitudes de Patente de Estados Unidos Provisional N° de serie 60/427.654, presentada el 18 de noviembre de 2002, 60/485.694, presentada el 8 de julio de 2003, 60/495.048, presentada el 13 de agosto de 2003 y 60/496.483, presentada el 19 de agosto de 2003, la descripción de todas las cuales se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

20 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- De acuerdo con el Centro de Estados Unidos para el Control y la Prevención de Enfermedades, las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo son una causa principal de muerte en los Estados Unidos. Aproximadamente el cinco por ciento de los siete millones de catéteres venosos
- 25 centrales (CVC) insertados anualmente en los Estados Unidos se asocian con al

menos un episodio de infección del torrente sanguíneo (aproximadamente 350.000 cada año). Las infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéteres ocurren cuando las bacterias entran en el torrente sanguíneo a través de un catéter intravenoso y puede amenazar la vida.

- 5 Las infecciones de la piel y de tejidos blandos (SSTI) (también conocidas como infecciones de la piel y de estructuras de la piel complicadas y/o no complicadas (SSSI)) son una afección médica común y a menudo la consecuencia de traumatismos o procedimientos quirúrgicos. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* son los patógenos más frecuentemente
- 10 aislados de pacientes con infecciones de tejidos profundos, aunque cualquier organismo patógeno, incluyendo aquellos que se encuentran en la piel sana, pueden causar infección. Muchas SSTI son leves a moderadas en gravedad, permitiendo un tratamiento exitoso con agentes antimicrobianos orales y limpieza de la zona. En contraste, las infecciones más graves o complicadas,
- 15 que ocurren frecuentemente en pacientes con factores de riesgo subyacentes (por ejemplo, insuficiencia vascular, diabetes) y/o infecciones causadas por bacterias difíciles de tratar o con resistencia múltiple, pueden requerir terapia antimicrobiana intravenosa potente y desbridamiento quirúrgico agresivo.

- Los estafilococos son un problema clínico y terapéutico y han estado
- 20 asociados cada vez más con infecciones nosocomiales desde principios de la década de los 60. La especie positiva a la coagulasa y resistente a la meticilina *Staphylococcus aureus* (MRSA) ha sido problemática durante mucho tiempo en infecciones adquiridas en la comunidad e infecciones nosocomiales, y se han reconocido varios estafilococos negativos a la coagulasa como patógenos
- 25 oportunistas humanos, especialmente en el tratamiento de pacientes

gravemente enfermos en unidades de cuidado intensivo. Otra causa principal de preocupación clínica es el aumento del aislamiento de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina en muchas partes del mundo.

Los antibióticos de glicopéptido vancomicina y teicoplanina se han usado
5 frente a infecciones nosocomiales graves causadas por patógenos Gram positivos resistentes a múltiples fármacos, particularmente MRSA, estafilococos negativos a la coagulasa (CoNS), y enterococos. La vancomicina y teicoplanina se usan para infecciones causadas por MRSA, y hasta hace poco, todos los aislados eran uniformemente susceptibles. Sin embargo, se ha informado ahora
10 cada vez con más frecuencia del aislamiento de cepas de *Staphylococcus aureus* con susceptibilidad intermedia o resistencia a la teicoplanina así como a la vancomicina. Se ha informado de varias cepas resistentes a la vancomicina, clasificadas como "VanA", "VanB", o "VanC" en base al mecanismo de resistencia. Por lo tanto, se necesitan opciones de tratamiento alternativo.

15 La teicoplanina es al menos tan activa como la vancomicina frente a la mayoría de las bacterias Gram positivas y parece que causa menos acontecimientos adversos. Ambas formas de tratamiento requieren al menos una dosis diaria para lograr una recuperación completa. Actualmente, las opciones terapéuticas para infecciones graves causadas por algunos de estos
20 patógenos son bastante limitadas. La resistencia emergente de patógenos Gram positivos a la vancomicina hace que sea sumamente deseable la disponibilidad de nuevos antibióticos con potencial para aumentar la eficacia.

Además, serían deseables regímenes de dosificación menos frecuentes que las terapias disponibles actualmente para potenciar la comodidad del
25 paciente, especialmente para administración parenteral del antibiótico, por

ejemplo, intravenosa o intramuscular. Algunas veces se necesita la estancia en el hospital por la necesidad de la administración del antibiótico varias veces al día por medios parenterales, y sería ventajosa una dosificación menos frecuente para permitir que tal tratamiento se haga en una base de pacientes no hospitalizados.

Aunque la dosificación menos frecuente es una característica deseable de un régimen de administración de un antibiótico, la "ventana farmacéutica", es decir, el perfil de toxicidad del antibiótico administrado debe ser suficientemente aceptable para permitir que se administre una única dosis grande sin poner en peligro el tratamiento por causar reacciones adversas graves en el paciente tratado. Además, incluso cuando un antibiótico muestra una ventana farmacéutica adecuada, la dosificación menos frecuente es sólo posible si el antibiótico muestra una semi-vida en suero adecuada para mantener la eficacia terapéutica durante del intervalo de dosificación deseado. La semi-vida en suero de un antibiótico dicta la longevidad de un fármaco *in vivo* y la cantidad de tiempo después de la administración en el que el nivel en suero alcanzará un nivel mínimo que es todavía bactericidamente eficaz. El nivel en suero a lo largo del tiempo después de la administración de una primera dosis de antibiótico dicta cuándo debe administrarse una dosis más para conservar un nivel bactericida mínimo del antibiótico *in vivo*.

Recientemente, se han sintetizado racionalmente antibióticos de glicopéptido exitosos a partir de glicopéptidos naturales. Por ejemplo, el glicopéptido semisintético dalbavancina se sintetizó a partir del antibiótico natural A 40926, originalmente aislado de un cultivo de *Actinomadura* (Malabarba y col., 1998 Patente de Estados Unidos N° 5.750.509). La

dalbavancina ha mostrado una mayor eficacia frente a diversas cepas bacterianas que la vancomicina o el antibiótico linezolid y representa un nuevo tratamiento prometedor para infecciones de la piel y de tejidos blandos (véase, por ejemplo, Jabés y col., 2004, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1118-1123).

- 5 De acuerdo con la Patente de Estados Unidos Nº 5.750.509, la dalbavancina es un antibiótico de glicopéptido con un resto monometilo en su amino N^{15} (véase la FIG. 1 para la numeración) y este N^{15} -monometilamino puede estar libre (es decir, $-NHCH_3$) o protegido con un grupo protector de amino tal como *t*-butoxicarbonilo, carbobenciloxi, arilalquilo o bencilo. El procedimiento para
- 10 fabricar ciertos de los componentes de la dalbavancina de los que se informa en la patente '509 también produjeron análogos N^{15},N^{15} -dialquilo de la dalbavancina en cantidades minoritarias, pero estas moléculas no se caracterizaron.

- En vista de los patógenos anteriores, serían de valor comercial otros antibióticos que posean actividad frente uno o más microbios, incluyendo
- 15 bacterias resistentes a antibióticos, y satisfacerían una necesidad largamente sentida en la técnica.

SUMARIO DE LA INVENCION

- La invención proporciona composiciones, procedimientos y kits para el tratamiento o la prevención de una infección bacteriana con dalbavancina.
- 20 Sorprendentemente, se ha descubierto que las formulaciones estabilizadas de dalbavancina muestran una ventana farmacéutica así como una semi-vida en suero prolongada que permiten regímenes de tratamiento de aproximadamente una vez cada 5-7 días o más largos, reteniendo las propiedades antibacterianas *in vivo*.

Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que incluye una dosis unitaria de dalbavancina en una cantidad suficiente para proporcionar un nivel de dalbavancina en plasma terapéutica o profilácticamente eficaz en un individuo durante al menos cinco días, un
5 estabilizador y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan generalmente en una forma farmacéuticamente aceptable para administrar a un individuo, tal como una formulación acuosa farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas se administran preferiblemente por vía parenteral,
10 por ejemplo intravenosa o intramuscular. Por consiguiente, en esta realización preferida, estas composiciones farmacéuticas son típicamente estériles.

En algunas realizaciones, se proporciona una dosis unitaria de dalbavancina en forma de polvo seco (por ejemplo, liofilizado) y reconstituido en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una formulación acuosa
15 estéril, antes de la administración a un individuo. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable incluye dextrosa al 5% en agua. Una composición farmacéutica de la invención puede administrarse a un mamífero en necesidad de tratamiento o prevención de una infección bacteriana, tal como un ser humano. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede incluir
20 al menos un antibiótico que no es dalbavancina, tal como un antibiótico que sea eficaz (por ejemplo, bactericida) frente a bacterias Gram negativas y/o un antibiótico que sea eficaz frente a especies Gram positivas frente a las cuales la dalbavancina no es eficaz, tales como cepas bacterianas resistentes a la vancomicina VanA.

La invención proporciona composiciones, procedimientos de fabricación y procedimientos para el tratamiento o la prevención de una infección bacteriana con una composición farmacéutica de dalbavancina estable a temperatura ambiente.

5 En algunas realizaciones, se emplean una o más sustancias estabilizadoras para inhibir la degradación de uno o más componentes de la dalbavancina durante su almacenamiento como una formulación de polvo seco (por ejemplo, liofilizado) y/o como una formulación acuosa antes de la administración a un individuo. Con el tiempo, la degradación puede provocar la
10 formación no deseable de componentes menos activos y/o inactivos que podrían causar potencialmente efectos adversos *in vivo*. Los estabilizadores preferidos incluyen componentes no iónicos tales como azúcares o alcoholes de azúcares, por ejemplo, mono, di, o polisacáridos, o derivados de los mismos, tales como, por ejemplo, manitol, lactosa, sacarosa, sorbitol, glicerol, celulosa, trehalosa,
15 maltosa o dextrosa, o mezclas de los mismos.

En una realización, la invención abarca una composición farmacéutica que comprende dalbavancina estable.

En otra realización, la invención abarca una composición farmacéutica que comprende dalbavancina y un estabilizador.

20 En otra realización más, la invención abarca una composición farmacéutica que comprende dalbavancina y un estabilizador a un pH de aproximadamente 1-7, más preferiblemente 2-6. En otra realización, la composición está a un pH de aproximadamente 3-5. El estabilizador puede comprender un carbohidrato o un aminoácido. El carbohidrato puede ser
25 manitol, lactosa, o una combinación de manitol y lactosa. El manitol y la lactosa

pueden añadirse en cantidades iguales o diferentes. En una realización, se añaden cantidades iguales de manitol y lactosa y el pH se ajusta a aproximadamente 4,5.

En otra realización, la invención abarca también una composición farmacéutica que comprende dalbavancina y manitol a un pH de aproximadamente 3. En una realización, el pH de la composición es aproximadamente 3,3. En otra realización, esta composición puede comprender además lactosa. La lactosa y el manitol pueden añadirse en cantidades iguales o diferentes.

En otra realización, la invención abarca también una composición farmacéutica que comprende dalbavancina y un estabilizador, en la que el estabilizador comprende manitol y lactosa. El manitol y la lactosa pueden añadirse en cantidades iguales. El pH de esta composición puede variar opcionalmente entre 1-7, más preferiblemente 2-6, más preferiblemente 3-5, más preferiblemente 4-5, más preferiblemente aproximadamente 4,5.

Los glicopéptidos, y la dalbavancina en particular, son muy inestables debido a la unión glicosídica. Puede existir algo de degradación a temperatura ambiente y más degradación a 40°C. Algunas de las formulaciones descritas anteriormente pueden necesitar condiciones de almacenamiento especiales. En particular, puede ser deseable la refrigeración (por ejemplo, -40°C a 10°C, alternativamente -20°C a 9°C, más preferiblemente 2°C a 8°C). Las formulaciones adicionalmente pueden esterilizarse. Cuando se administren, formarán una solución estable, transparente y libre de partículas. La solución debe ser estable y no contener ningún precipitado.

Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente se degradan preferiblemente en no más de aproximadamente el 4% a aproximadamente 25°C después de aproximadamente 2 años, más preferiblemente en no más de aproximadamente el 3%, más preferiblemente en no más de aproximadamente el 2%, más preferiblemente en no más de aproximadamente el 1%, más preferiblemente en no más de aproximadamente el 0,5%. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente tienen no más de aproximadamente el 4% de MAG a aproximadamente 25°C después de aproximadamente 2 años, más preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 3% de MAG, más preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 2% de MAG, más preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 1% de MAG, más preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 0,5% de MAG.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente se degradan preferiblemente en no más de aproximadamente el 6% a aproximadamente 40°C después de aproximadamente 3-6 meses, más preferiblemente en no más de aproximadamente el 5%, preferiblemente en no más de aproximadamente el 4%, preferiblemente en no más de aproximadamente el 3%, preferiblemente en no más de aproximadamente el 2%, preferiblemente en no más de aproximadamente el 1%. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 6% de MAG a aproximadamente 40°C después de aproximadamente 3-6 meses, más preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 5% de MAG, preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 4% de MAG, preferiblemente tienen no más de

aproximadamente el 3% de MAG, preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 2% de MAG, e incluso más preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 1% de MAG. Sería deseable un compuesto estable a 40°C, especialmente en lugares que no pueden almacenar los compuestos en una nevera o a temperatura ambiente (por ejemplo, países del tercer mundo y reservas indias).

En otra realización más, las composiciones farmacéuticas se degradan en no más del 3% a aproximadamente 2-8°C después de aproximadamente 2 años, más preferiblemente en no más de aproximadamente el 2%; más preferiblemente en no más de aproximadamente el 1%; más preferiblemente en no más de aproximadamente el 0,5%. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas tienen no más del 3% de MAG a aproximadamente 2-8°C después de aproximadamente 2 años, más preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 2% de MAG, más preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 1% de MAG, más preferiblemente tienen no más de aproximadamente el 0,5% de MAG.

La invención incluye composiciones de dalbavancina que pueden comprender una combinación de cualquiera de los factores de dalbavancina. Estos factores incluyen el factor de dalbavancina A₀, A₁, B₁, B₂, C₀, C₁, isoB₀ y MAG.

La invención incluye también un procedimiento de secado para reducir el nivel de disolvente en la composición de dalbavancina. El procedimiento incluye las etapas de proporcionar dalbavancina húmeda que comprende dalbavancina, agua y un disolvente, secar la dalbavancina húmeda a una temperatura de aproximadamente 30°C o menos y a una presión de vacío de aproximadamente

50 mbar (5 kPa) o menos, hasta que el nivel de agua de la dalbavancina húmeda es menor de aproximadamente el 20% (p/p). Después se añade agua a la dalbavancina húmeda y se repite la etapa de secado. Estas etapas de adición de agua y secado de la dalbavancina húmeda se repiten hasta que el nivel de

5 disolvente es menor de aproximadamente el 3,0% (p/p). Estas etapas pueden repetirse una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, o tantas como sea necesario para alcanzar el contenido de disolvente deseado. De forma similar, la invención también incluye una composición de dalbavancina que tiene un bajo nivel de disolvente. En una realización, el nivel de disolvente

10 puede estar por debajo del 3,0% (p/p), como alternativa por debajo del 2,5% (p/p), como alternativa menor del 2,0% (p/p), como alternativa por debajo del 1,5% (p/p), como alternativa por debajo del 1,0% (p/p), como alternativa por debajo del 0,5% (p/p), como alternativa por debajo del 0,1% (p/p). El disolvente puede ser acetona. Como alternativa, el disolvente puede ser cualquiera de

15 etanol, metanol, propanol, butanol, éter, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, cloroformo, 1,4-dioxano, tricloroetileno, benceno, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano, 1,1-dicloroetano, 1,1,1-tricloroetano, acetonitrilo, clorobenceno, ciclohexano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, *N,N*-dimetilacetamida, *N,N*-dimetilformamida, 1,4-dioxano, 2-etoxietanol, etilenglicol, formamida, hexano, 2-

20 metoxietanol, metilbutilcetona, metilciclohexano, *N*-metilpirrolidona, nitrometano, piridina, sulfolano, tetralina, tolueno, 1,1,2-tricloroetano, xileno, ácido acético, anisol, 1-butanol, 2-butanol, acetato de butilo, *terc*-butilmetil éter, cumeno, dimetilsulfóxido, acetato de etilo, etiléter, formiato de etilo, ácido fórmico, heptano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, 3-metil-1-butanol,

25 metiletilcetona, metilisobutilcetona, 2-metil-1-propanol, pentano, 1-pentanol, 1-

propanol, 2-propanol, propilacetato, 1,1-dietoxipropano, 1,1-dimetoximetano, 2,2-dimetoxipropano, isooctano, isopropiléter, metilisopropilcetona, metiltetrahidrofurano, éter de petróleo, ácido tricloroacético y ácido trifluoroacético. Además, el procedimiento de secado puede realizarse a una

5 temperatura de aproximadamente 28°C o menos, como alternativa a una temperatura de aproximadamente 26°C o menos, como alternativa a una temperatura de aproximadamente 24°C o menos, como alternativa a una temperatura de aproximadamente 22°C o menos, como alternativa a una temperatura de aproximadamente 20°C o menos, como alternativa a una

10 temperatura de aproximadamente 15°C o menos, como alternativa a una temperatura de aproximadamente 10°C o menos. La presión de vacío del procedimiento de secado puede ser aproximadamente 50 mbar (5 kPa) o menos, como alternativa aproximadamente 45 mbar (4,5 kPa) o menos, como alternativa aproximadamente 40 mbar (4 kPa) o menos, como alternativa

15 aproximadamente 35 mbar (3,5 kPa) o menos, como alternativa aproximadamente 30 mbar (3 kPa) o menos, como alternativa aproximadamente 25 mbar (2,5 kPa) o menos, como alternativa aproximadamente 20 mbar (2 kPa) o menos, como alternativa aproximadamente 15 mbar (1,5 kPa) o menos, como alternativa aproximadamente 10 mbar (1 kPa) o menos, como alternativa

20 aproximadamente 5 mbar (0,5 kPa) o menos. Además, el nivel de agua puede ser menor de aproximadamente el 25% (p/p), como alternativa menor de aproximadamente 20% (p/p), como alternativa menor de aproximadamente 15% (p/p).

Además del bajo contenido de disolvente, el procedimiento de secado

25 puede también reducir la cantidad de MAG presente en la composición de

dalbavancina. La cantidad de MAG presente puede estar por debajo de aproximadamente el 5% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 4,5% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 4,0% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 3,5% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 3,0% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 2,5% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 2,0% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 1,5% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 1,0% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 0,8% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 0,6% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 0,5% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 0,4% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 0,3% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 0,2% de la distribución de HPLC, como alternativa por debajo de aproximadamente el 0,1% de la distribución de HPLC.

La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende los factores de dalbavancina B_2 e $isoB_0$. El contenido de cada uno de B_2 e $isoB_0$ puede no exceder independientemente de aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa puede no exceder independientemente de aproximadamente el 2,5 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa puede no exceder independientemente de

aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa pueden no exceder independientemente de aproximadamente el 1,5 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa puede no exceder independientemente de aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa puede no exceder independientemente de aproximadamente el 0,5 por ciento de la distribución de HPLC, o como alternativa puede no exceder independientemente de aproximadamente el 0,1 por ciento de la distribución de HPLC.

Además, la invención incluye también una composición farmacéutica que comprende los factores de dalbavancina B₂, isoB₀ y MAG. El contenido de cada uno de B₂, isoB₀ y MAG puede no exceder independientemente de aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa puede no exceder independientemente de aproximadamente el 2,5 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa puede no exceder independientemente de aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa puede no exceder independientemente de aproximadamente el 1,5 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa puede no exceder independientemente de aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa puede no exceder independientemente de aproximadamente el 0,5 por ciento de la distribución de HPLC, o como alternativa puede no exceder independientemente de aproximadamente el 0,1 por ciento de la distribución de HPLC.

La invención incluye también procedimientos para tratar una infección bacteriana que comprenden proporcionar al menos una de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente a un paciente en necesidad de las

mismas y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dalbavancina estéril, estable, libre de partículas y transparente al paciente. El procedimiento puede incluir además la administración posterior de una única dosis terapéuticamente eficaz. La dosis terapéuticamente eficaz única posterior puede administrarse

5 aproximadamente de cinco a diez días, o aproximadamente una semana después de la dosis inicial. La dosis terapéuticamente eficaz única posterior puede también administrarse de aproximadamente cinco a diez días, o aproximadamente una semana después de la dosis inicial, sin ninguna dosis intermedia de dalbavancina. En otra realización, el procedimiento puede incluir

10 la administración de múltiples dosis posteriores. Las dosis múltiples posteriores pueden administrarse a intervalos de aproximadamente cinco a diez días, o intervalos de una semana. Las dosis múltiples posteriores pueden también administrarse a intervalos de aproximadamente cinco a diez días, o intervalos de una semana, sin ninguna dosis intermedia de dalbavancina. El procedimiento

15 puede incluir también la etapa adicional de control de la infección después de administrar la primera dosis y, opcionalmente, ajustar la o las dosis posteriores, en consecuencia.

La invención incluye también procedimientos para tratar una infección bacteriana en un paciente con deficiencia renal que comprenden administrar una

20 dosis terapéuticamente eficaz de dalbavancina estéril, estable, libre de partículas y transparente al paciente. La deficiencia renal puede variar de leve a grave. En una realización, la dosis terapéuticamente eficaz logra un pico de concentración en el paciente (C_{max}) de al menos 100 mg/l. En otra realización, la dosis terapéuticamente eficaz logra una exposición del paciente (área bajo la

25 curva) de al menos 13.000 mg•h/l. El procedimiento puede incluir la

administración de una dosis única de dalbavancina de aproximadamente 300-1200 mg, como alternativa aproximadamente 400 mg, como alternativa aproximadamente 500 mg, como alternativa aproximadamente 600 mg, como alternativa aproximadamente 700 mg, como alternativa aproximadamente 800 mg, como alternativa aproximadamente 900 mg, como alternativa aproximadamente 1000 mg, como alternativa aproximadamente 1100 mg, como alternativa aproximadamente 1200 mg.

El procedimiento para tratar una infección bacteriana en un paciente con deficiencia renal puede incluir también la administración de dosis múltiples de dalbavancina. En una realización, pueden administrarse dos dosis separadas por aproximadamente cinco a aproximadamente diez días, tal como separadas aproximadamente una semana, o como alternativa separadas por aproximadamente diez a aproximadamente dieciocho días, tal como aproximadamente dos semanas (o separadas 14 días). Como alternativa, la frecuencia de las dosis puede ser, por ejemplo, dosis de dos veces a la semana, dosis de tres veces a la semana, o dosis de múltiples veces a la semana. Como alternativa, el intervalo de dosis puede ser, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más días de separación. El número de dosis dada puede ser, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más dosis, dándose cada dosis después de la dosis inicial después del intervalo de dosificación seleccionado.

En una realización, la primera dosis puede ser de aproximadamente 750 mg y la segunda (o posterior) dosis puede ser de aproximadamente 250 mg. En otra realización, la primera dosis puede ser de aproximadamente 750 mg y la

segunda (o posterior) dosis puede ser de aproximadamente 150 mg. En otra realización, la primera dosis puede ser de aproximadamente 750 mg y la segunda (o posterior) dosis puede ser de aproximadamente 125 mg. En otra realización, la primera dosis puede ser de aproximadamente 1000 mg y la

5 segunda (o posterior) dosis puede ser de aproximadamente 500 mg.

En otra realización, la primera dosis puede ser de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1500 mg, como alternativa de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1300 mg, como alternativa de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1500 mg, como alternativa de aproximadamente 200 mg a

10 aproximadamente 1400 mg, como alternativa de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 1300 mg, como alternativa de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1200 mg, como alternativa de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1100 mg, como alternativa de aproximadamente 600 mg a aproximadamente 1000 mg, como alternativa aproximadamente 1000 mg, como

15 alternativa aproximadamente 950 mg, como alternativa aproximadamente 900 mg, como alternativa aproximadamente 850 mg, como alternativa aproximadamente 800 mg, como alternativa aproximadamente 750 mg, como alternativa aproximadamente 700 mg, como alternativa aproximadamente 650 mg, como alternativa aproximadamente 600 mg, como alternativa

20 aproximadamente 550 mg, o como alternativa aproximadamente 500 mg. La segunda dosis o posteriores pueden ser de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1500 mg, como alternativa de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1300 mg, como alternativa de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1500 mg, como alternativa de aproximadamente 200 mg a

25 aproximadamente 1400 mg, como alternativa de aproximadamente 300 mg a

aproximadamente 1300 mg, como alternativa de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1200 mg, como alternativa de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1100 mg, o como alternativa de aproximadamente 600 mg a aproximadamente 1000 mg, como alternativa aproximadamente 600 mg, como
5 alternativa aproximadamente 550 mg, como alternativa aproximadamente 500 mg, como alternativa aproximadamente 450 mg, como alternativa aproximadamente 400 mg, como alternativa aproximadamente 350 mg, como alternativa aproximadamente 300 mg, como alternativa aproximadamente 250 mg, como alternativa aproximadamente 200 mg, como alternativa
10 aproximadamente 150 mg, o como alternativa aproximadamente 100 mg. Debe entenderse que cualquiera de las primeras dosis anteriores puede combinarse con cualquiera de las segundas o posteriores dosis anteriores en un régimen de dosificación.

En un régimen de dosis múltiples para pacientes renales o normales, la
15 proporción entre la primera y segunda (o posteriores) dosis puede definirse por un factor. La cantidad de la primera dosis puede ser mayor de aproximadamente 1 vez la cantidad de la segunda dosis. Como alternativa, la primera dosis puede ser mayor de aproximadamente 1,5 veces, mayor de aproximadamente 2 veces, mayor de aproximadamente 2,5 veces, mayor de aproximadamente 3 veces,
20 mayor de aproximadamente 3,5 veces, mayor de aproximadamente 4 veces, mayor de aproximadamente 4,5 veces, mayor de aproximadamente 5 veces, mayor de aproximadamente 5,5 veces, o mayor de aproximadamente 6 veces la cantidad de la segunda (o posteriores) dosis.

De forma similar, la cantidad de la segunda (o posteriores) dosis puede
25 ser aproximadamente 6 veces menor que la cantidad de la primera dosis. Como

alternativa, la cantidad de la segunda (o posteriores) dosis puede ser de aproximadamente 5,5 veces, como alternativa menor de aproximadamente 5,0 veces, como alternativa menor de aproximadamente 4,5 veces, como alternativa menor de aproximadamente 4,0 veces, como alternativa menor de aproximadamente 3,5 veces, como alternativa menor de aproximadamente 3,0 veces, como alternativa menor de aproximadamente 2,5 veces, como alternativa menor de aproximadamente 2,0 veces, como alternativa menor de aproximadamente 1,5 veces, como alternativa menor de aproximadamente 1,0 veces la cantidad de la primera dosis.

10 El procedimiento para tratar una infección bacteriana en un paciente con deficiencia renal puede incluir la administración de una dosis única de dalbavancina. El paciente puede tener deficiencia renal leve, moderada, grave o en fase final. La cantidad de esta dosis única puede ser de aproximadamente 1200 mg, como alternativa de aproximadamente 1150 mg, como alternativa de
15 aproximadamente 1100 mg, como alternativa de aproximadamente 1050 mg, como alternativa de aproximadamente 1000 mg, como alternativa de aproximadamente 950 mg, como alternativa de aproximadamente 900 mg, como alternativa de aproximadamente 850 mg, como alternativa de aproximadamente 800 mg, como alternativa de aproximadamente 750 mg, como alternativa de
20 aproximadamente 700 mg, como alternativa de aproximadamente 650 mg, como alternativa de aproximadamente 600 mg, como alternativa de aproximadamente 550 mg, como alternativa de aproximadamente 500 mg. La cantidad de dosis única puede estar también entre aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1300 mg, como alternativa entre aproximadamente 300 mg a aproximadamente
25 1200 mg, como alternativa entre aproximadamente 350 mg a aproximadamente

1100 mg, como alternativa entre aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1000 mg, como alternativa entre aproximadamente 450 mg a aproximadamente 1000 mg, como alternativa entre aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1000 mg, como alternativa entre aproximadamente 550 mg a aproximadamente 950 mg, como alternativa entre aproximadamente 600 mg a aproximadamente 900 mg, como alternativa entre aproximadamente 650 mg a aproximadamente 850 mg.

La invención incluye también procedimientos para fabricar las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente que comprenden proporcionar dalbavancina y añadir un estabilizador. En una realización, el estabilizador es un carbohidrato o un azúcar. En otra realización, el estabilizador es manitol, lactosa o una combinación de los mismos.

En otra realización más, el procedimiento incluye además la etapa de ajustar el pH de la composición, si fuera necesario. En una realización, el pH se ajusta a aproximadamente 1-7, más preferiblemente a aproximadamente 2-6, más preferiblemente a aproximadamente 3-5. El pH puede ajustarse con un modificador del pH. Los modificadores del pH incluyen bases inorgánicas de metales alcalinos y alcalino-térreos tales como NaOH, Ca(OH)₂, KOH y Mg(OH)₂. Se pueden usar también como modificadores del pH óxidos, carbonatos, bicarbonatos inorgánicos de metales alcalinos y alcalino-térreos. También pueden usarse como modificadores del pH bases y sales alcalinas de ácidos inorgánicos débiles y ácidos anfóteros tales como ácido fosfórico, ácido bórico, ácido sulfúrico, y todos los otros ácidos que contienen azufre. Pueden usarse también para modificar el pH aminoácidos tales como lisina, meglumina, arginina, *N*-metilglucosamina. Pueden usarse también para modificar el pH de la

composición bases orgánicas, incluyendo todas las aminas, fenoles, ácidos carboxílicos débiles, ácidos dicarboxílicos, ácidos hidroxicarboxílicos y sus sales.

En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para tratar una infección bacteriana en un individuo en necesidad del mismo, incluyendo la administración de al menos una dosis unitaria de dalbavancina en una cantidad suficiente para proporcionar un nivel en plasma terapéuticamente eficaz de dalbavancina en el individuo durante al menos cinco días, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un nivel en plasma terapéuticamente eficaz de dalbavancina es generalmente de al menos aproximadamente 4 mg de dalbavancina por litro de plasma. En una realización, la cantidad de dosificación de dalbavancina administrada es una cantidad que es clínicamente eficaz y que también tiene efectos secundarios adversos reducidos en comparación con la norma de tratamiento con fármacos tales como teicoplanina y vancomicina.

La dalbavancina puede administrarse como una dosis única o como múltiples dosis. En algunas realizaciones, se administra una dosis única de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 4000 mg, por ejemplo 3000 mg, de dalbavancina. En diversas realizaciones, una dosis única de dalbavancina puede incluir al menos aproximadamente cualquiera de 0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, o 3 gramos.

En otras realizaciones, se administran dos dosis separadas por aproximadamente cinco a aproximadamente diez días, tal como aproximadamente una semana. La primera dosis puede ser de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 mg de dalbavancina y la segunda dosis puede ser de aproximadamente 250 mg a aproximadamente

131

2500 mg de dalbavancina. A menudo, la primera dosis incluye aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3 veces, a menudo al menos aproximadamente dos veces la cantidad de dalbavancina contenida en la segunda dosis. Por ejemplo, la primera dosis puede ser de aproximadamente 1000 mg y la segunda dosis de aproximadamente 500 mg de dalbavancina. En otra realización, la primera dosis puede ser de aproximadamente 1200 mg y la segunda dosis puede ser de aproximadamente 600 mg. En procedimientos en los cuales se administran dos dosis, el nivel en plasma de dalbavancina en un individuo antes de la administración de la segunda dosis es generalmente de al menos aproximadamente 4 mg, a menudo al menos aproximadamente 10 mg, a menudo al menos aproximadamente 20 mg, más a menudo al menos aproximadamente 30 mg de dalbavancina por litro de plasma, y aún más a menudo al menos aproximadamente 40 mg de dalbavancina por litro de plasma.

A menudo, los procedimientos de la invención incluyen administración parenteral, por ejemplo administración intravenosa. En algunas realizaciones, la administración es intravenosa con la velocidad de administración controlada tal que la administración ocurre en al menos aproximadamente 30 minutos o más tiempo.

Los procedimientos de la invención pueden usarse para tratar una infección bacteriana Gram positiva, tal como, por ejemplo infección de la piel o de tejidos blandos por *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*. En algunas realizaciones, la infección es resistente a la penicilina y/o a múltiples fármacos.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para prevenir una infección bacteriana que incluye administrar al menos una dosis unitaria de

dalbavancina en una cantidad suficiente para proporcionar un nivel en plasma de dalbavancina profilácticamente eficaz en el individuo durante al menos aproximadamente un día, tres días, cinco días, una semana o diez días o durante más tiempo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La dosificación del dalbavancina puede ser, por ejemplo aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1000 mg. En algunas realizaciones, la dalbavancina se administra antes de, durante o después de un procedimiento médico o una estancia en el hospital.

Los procedimientos terapéuticos o profilácticos de la invención pueden incluir la administración de al menos un antibiótico que no es dalbavancina, preferiblemente un antibiótico que es eficaz frente a bacterias Gram negativas y/o un antibiótico que es eficaz contra cepas Gram positivas frente a las cuales no es eficaz la dalbavancina, tales como las cepas VanA.

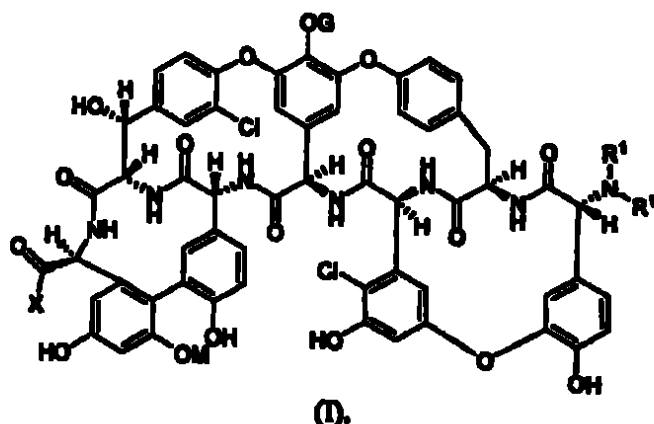
En otro aspecto, se proporcionan kits que incluyen al menos una dosis unitaria de dalbavancina en una cantidad suficiente para proporcionar un nivel en plasma terapéuticamente eficaz durante al menos aproximadamente cinco días o un nivel en plasma de dalbavancina profilácticamente eficaz durante al menos aproximadamente un día en un individuo, e instrucciones para su uso en un procedimiento de tratamiento o profilaxis de una infección bacteriana. Un kit puede contener dos dosificaciones unitarias, incluyendo una primera dosificación 1,5 a 3 veces, a menudo al menos aproximadamente dos veces la cantidad de dalbavancina incluida en una segunda dosificación. Los kits pueden incluir también un antibiótico que no sea dalbavancina, preferiblemente eficaz frente a bacterias Gram negativas.

En una realización, los kits que se proporcionan incluyen un primer recipiente que contiene una composición de dalbavancina en polvo seco (por ejemplo, liofilizado) y un segundo recipiente que contiene una cantidad predeterminada de una solución acuosa fisiológicamente aceptable para
5 mezclar con la composición de dalbavancina. Tales soluciones son preferiblemente soluciones acuosas estériles. En una realización, los kits incluyen un medio de suministro para administrar la composición de dalbavancina a un individuo, por ejemplo, una jeringa o un medio de administración intravenosa.

10 La presente invención proporciona también compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo con utilidad frente a microbios infecciosos. Los compuestos de la invención son útiles para tratar y/o prevenir infecciones microbianas, tales como SSTI y otras infecciones bacterianas.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de
15 compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo que tienen actividad antimicrobiana al menos comparable con, o incluso mayor que los compuestos antibióticos de N^{15} -monoalquilo previamente conocidos tales como los compuestos de dalbavancina. Además, como se describe en los ejemplos a continuación, ciertos compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención muestran
20 actividad frente a un espectro más amplio de microbios cuando se compara con los compuestos antibióticos de N^{15} -monoalquilo previamente conocidos tales como los compuestos de dalbavancina de N^{15} -monometilo.

En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo de acuerdo con la fórmula (I):



Los compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención (que tienen átomos numerados de acuerdo con la Fig. 26) comprenden dos sustituyentes alquilo en el nitrógeno amino terminal. En otras palabras, en la

5 fórmula (I) R^1 y $R^{1'}$ son alquilo. En las realizaciones más preferidas de la invención, R^1 y $R^{1'}$ son metilo. Los otros sustituyentes de la fórmula (I) se describen con detalle a continuación. Los sustituyentes preferidos incluyen los encontrados en los compuestos antibióticos de A 40926 y/o compuestos de dalbavancina conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, en

10 realizaciones preferidas G y M son restos glicosilo tales como los restos aminoglucuronilo y manopiranosilo descritos en las siguientes secciones. En ciertas realizaciones, el resto aminoglucuronilo está acilado, por ejemplo con un ácido graso, y en ciertas realizaciones, el resto manopiranosilo está acetilado.

En ciertas realizaciones, X es OH mientras que en realizaciones

15 adicionales X es un aminoalquilamino. El grupo aminoalquilamino puede ser cualquier grupo aminoalquilamino conocido por los especialistas en la técnica, incluyendo los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.750.509. En realizaciones preferidas, X es N,N -dimetilaminopropilamino. Como se describe con detalle en los siguientes ejemplos, los compuestos de acuerdo con la

21
157

fórmula (I) en los que X es aminoalquilamino muestran actividad antibiótica comparable o mayor que los correspondientes compuestos de dalbavancina, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.750.509. Aunque se prefieren los compuestos en los que X es aminoalquilamino, los compuestos
5 en los que X es OH son útiles, por ejemplo, para la preparación de compuestos de la invención en los que X es aminoalquilamino, y pueden ser útiles también por sí mismos para tratar y/o prevenir infecciones microbianas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención y un
10 segundo compuesto. El segundo compuesto puede ser cualquier compuesto conocido por los especialistas en la técnica. En realizaciones particulares, el segundo compuesto es un compuesto antibiótico, por ejemplo un compuesto A 40926 antibiótico o un compuesto de dalbavancina. En realizaciones adicionales, el segundo compuesto es también un compuesto antibiótico de
15 N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención. Composiciones ejemplares de la invención incluyen mezclas de compuestos A 40926 antibióticos y/o compuestos de dalbavancina que además comprenden un compuesto de acuerdo con la fórmula (I). En realizaciones particulares, las composiciones están enriquecidas en el compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención. El
20 enriquecimiento puede ser relativo a los compuestos A 40926 antibióticos y/o los compuestos de dalbavancina de la composición, o relativo a otros compuestos de la composición, o ambos. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo purificado de la invención, un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -

d
f
15b

dialquilo aislado de la invención o un compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo purificado y aislado, de la invención.

En un aspecto más, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo de la invención. Las composiciones preferidas comprenden compuestos de acuerdo con la fórmula (I) en la que X es aminoalquilamino. Las composiciones pueden comprender además otros ingredientes activos, incluyendo compuestos A 40926 antibióticos y/o compuestos de dalbavancina conocidos por los especialistas en la técnica. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden además un vehículo, un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables. En realizaciones particulares, la presente invención proporciona dosificaciones unitarias farmacéuticas de un compuesto de la invención para su uso, por ejemplo, en el tratamiento y/o prevención de infecciones microbianas.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una forma de dosificación que comprende un polvo de dalbavancina estéril, estable y libre de partículas adecuado para reconstituirse con un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende los factores de dalbavancina B_0 y B_2 . Los nombres B_2 , C_2 y N^{15},N^{15} -dimetildalbavancina B_0 se han usado de manera intercambiable. En una realización, el contenido de factor B_0 es no menor de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 80 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 85 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 90 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 95 por ciento de la distribución de HPLC. El contenido de B_2 es no menor de

aproximadamente el 4,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 5,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 6,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 7,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 8,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 9,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 10,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 15,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 20,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 25,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 30,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 40,0 por ciento de la distribución de HPLC. El porcentaje de la distribución de HPLC de componentes particulares se puede calcular comparando el área de cada componente individual con el área cromatográfica total. La forma de dosificación puede incluir además al menor un factor adicional, tal como el factor de dalbavancina A_0 , A_1 , B_1 , C_0 o C_1 .

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende los factores de dalbavancina B_0 y B_2 . En una realización, el contenido de factor B_0 es no menor de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 80 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 85 por ciento de la distribución de HPLC,

como alternativa no menor de aproximadamente el 90 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa, no menor de aproximadamente el 95 por ciento de la distribución de HPLC. El contenido de B₂ es no menor de aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa

5 no menor de aproximadamente el 4,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 5,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 6,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 7,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa

10 no menor de aproximadamente el 8,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 9,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 10,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 15,0 por ciento de la distribución de HPLC, como

15 alternativa no menor de aproximadamente el 20,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 25,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 30,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no menor de aproximadamente el 40,0 por ciento de la distribución de HPLC. Como se ha

20 definido anteriormente, el porcentaje de distribución de HPLC de componentes particulares puede calcularse comparando el área de cada componente individual con el área cromatográfica total. La composición farmacéutica puede incluir además al menos un factor adicional, tal como el factor de dalbavancina A₀, A₁, B₁, C₀ o C₁.

En otro aspecto, la presente invención proporciona también el desenriquecimiento del componente B₂. En una realización, el contenido de factor B₂ es no más de aproximadamente el 5,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no más de aproximadamente el 4,5 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no más de aproximadamente el 4,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no más de aproximadamente el 3,5 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no más de aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no más de aproximadamente el 2,5 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no más de aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no más de aproximadamente el 1,5 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no más de aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no más de aproximadamente el 0,5 por ciento de la distribución de HPLC, como alternativa no más de aproximadamente el 0,1 por ciento de la distribución de HPLC.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para tratar y/o prevenir infecciones microbianas en un sujeto que lo necesita. Los procedimientos pueden comprender la administración de una cantidad eficaz de un compuesto antibiótico de N¹⁵,N¹⁵-dialquilo o la composición de la invención al sujeto. La invención abarca la prevención o el tratamiento de infecciones bacterianas gram positivas o resistentes a antibióticos, tales como infecciones con los géneros *Bacillus*, *Corynebacteria*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria* o *Clostridium*, en particular *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus*

hemolyticus, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, grupos A y C de *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae* o *Clostridium difficile*. Otras infecciones que se pueden prevenir o tratar usando compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo, composiciones y procedimientos de la invención incluyen infecciones bacterianas gram negativas, tales como infecciones con los géneros *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* (así como otras *Proteobacterias*), *Francisella*, *Helicobacter*, *Hemophilus*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Morganella*, *Moraxella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio* y *Yersinia*, en particular *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e infecciones por levaduras tales como *Candida albicans*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A representa la cantidad de componente de dalbavancina B_0 frente al tiempo en diversas composiciones farmacéuticas, con o sin manitol, a 25°C.

La Figura 1B representa la cantidad de MAG frente al tiempo en diversas composiciones farmacéuticas, con o sin manitol, a 25°C.

La Figura 2A representa la cantidad del componente de dalbavancina B_0 frente al tiempo en diversas composiciones farmacéuticas, con o sin manitol, a 40°C.

La Figura 2B representa la cantidad de MAG frente al tiempo en diversas composiciones farmacéuticas, con o sin manitol, a 40°C.

La Figura 3A representa la cantidad del componente de dalbavancina B_0 frente al tiempo en diversas composiciones farmacéuticas que contienen manitol y/o lactosa a 25°C.

La Figura 3B representa la cantidad de MAG frente al tiempo en diversas composiciones farmacéuticas que contienen manitol y/o lactosa a 25°C.

La Figura 4A representa la cantidad de componente de dalbavancina B_0 frente al tiempo en diversas composiciones farmacéuticas que contienen manitol y/o lactosa a 40°C.

La Figura 4B representa la cantidad de MAG frente al tiempo en diversas composiciones farmacéuticas que contienen manitol y/o lactosa a 40°C.

La Figura 5 representa la concentración en plasma de dalbavancina frente al tiempo después de una infusión intravenosa única de 1000 mg de dalbavancina.

La Figura 6 representa los datos de valoración calorimétrica isotérmica para dalbavancina que se une a albúmina de suero humana (parte superior) y una representación gráfica de los datos ajustados a una curva determinada a partir de un modelo de unión 2:1 de dalbavancina:proteína (parte inferior).

La Figura 7 representa un espectro de masas de ionización por electronebulización de dalbavancina.

La Figura 8 es un gráfico de la concentración de dalbavancina frente a la proporción de población de dalbavancina multimérica a monomérica y representa un aumento en la proporción de población de dalbavancina multimérica a monomérica al aumentar la concentración de dalbavancina.

La Figura 9 es un gráfico del pH frente a la proporción de población de dalbavancina multimérica a monomérica y representa un aumento de la

proporción de población de dalbavancina multimérica a monomérica al aumentar el pH.

La Figura 10 representa un espectro de masas de ionización por electronebulización de dalbavancina en una solución a pH 5 de formiato de amonio 5 mM.

La Figura 11 representa un espectro de masas de ionización por electronebulización de dalbavancina en una solución a pH 5 de formiato de amonio 50 mM.

La Figura 12 representa un espectro de masas de ionización por electronebulización de dalbavancina en una solución a pH 5 de formiato de amonio 100 mM.

La Figura 13 representa un espectro de masas de ionización por electronebulización de teicoplanina (50 µg/ml) en agua.

La Figura 14 representa un espectro de masas de ionización por electronebulización de teicoplanina (100 µg/ml) en agua.

La Figura 15 representa el efecto de HSA en la constante de disociación aparente de la unión dalbavancina/tri-péptido a 26°C (pH 7,4).

La Figura 16 representa una comparación de los datos de calorimetría isotérmica (CIT) para la unión de tri péptido a vancomicina y dalbavancina en condiciones idénticas, usando la misma solución de tri péptido.

Las Figuras 17A y 17B representan la posible interacción de los monómeros y los multímeros (incluyendo dímeros) de dalbavancina con ligando tripeptídico y HSA. La Figura 17A representa la dalbavancina en equilibrio monómero-dímero en solución, uniéndose como monómero a dos sitios diferentes en HSA. La Figura 17B representa la unión del ligando al dímero de

dalbavancina en solución y más débilmente a monómeros de dalbavancina acoplados a HAS.

La Figura 18 proporciona perfiles de la concentración media en plasma de dalbavancina-tiempo.

5 La Figura 19 proporciona perfiles de la concentración media en plasma de dalbavancina-tiempo.

La Figura 20 proporciona perfiles adicionales de la concentración media en plasma de dalbavancina-tiempo.

10 La Figura 21 proporciona un gráfico de la exposición al dalbavancina a través del periodo de tratamiento relativo frente a la eliminación de creatinina.

La Figura 22 proporciona una comparación de la exposición durante el periodo de tratamiento relativo frente a la exposición total.

15 La Figura 23 proporciona perfiles de la concentración de dalbavancina-tiempo para sujetos con función renal normal y sujetos con deficiencia renal grave.

La Figura 24 proporciona perfiles de la concentración en plasma de dalbavancina-tiempo.

La Figura 25 proporciona una comparación de la exposición a dalbavancina a través del periodo de tratamiento.

20 La Figura 26 proporciona la estructura de los compuestos A 40926 antibióticos y de compuestos de dalbavancina incluyendo la numeración de átomos seleccionados.

La Figura 27 proporciona la estructura de la dalbavancina B₀.

25 La Figura 28 proporciona la estructura de un compuesto antibiótico de N¹⁵,N¹⁵-dimetilo ejemplar de la invención.

Las Figuras 29-31 proporcionan esquemas que ilustran ejemplos de la invención que verifican la estructura de un compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo de la invención.

Las Figuras 32-33 proporcionan cromatogramas IEN y HPLC que
5 verifican la estructura del compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo.

La Figura 34 proporciona la estructura de la dalbavancina B_2 .

La Figura 35 proporciona un espectro infrarrojo de la dalbavancina B_2 (N^{15},N^{15} -dimetil dalbavancina B_0).

La Figura 36 proporciona un espectro IEN-EM de la dalbavancina B_2
10 (N^{15},N^{15} -dimetil dalbavancina B_0).

La Figura 37 ilustra un rastro de HPLC de una composición de la invención.

La Figura 38 proporciona un espectro de masas de iso B_0 .

La Figura 39 ilustra un rastro de HPLC de iso B_0 .

15 La Figura 40A-C proporciona un espectro de masas de iso B_0 .

La Figura 41 proporciona un espectro ^1H -RMN de iso B_0 .

La Figura 42 proporciona un espectro ^{13}C -RMN de iso B_0 .

La Figura 43 proporciona la identificación de la localización de los protones de la dalbavancina.

20 La Figura 44 proporciona la farmacocinética en plasma de la dalbavancina en ratones infectados en el muslo.

La Figura 45 proporciona el efecto de dosis únicas de dalbavancina en la muerte in vivo de *S. pneumoniae* con el tiempo.

La Figura 46 proporciona el efecto de dosis únicas de dalbavancina en la
25 muerte in vivo de *S. aureus* con el tiempo.

La Figura 47 proporciona la relación entre el intervalo de dosis de dalbavancina y la eficacia frente a *S. pneumoniae*.

La Figura 48 proporciona la relación entre el intervalo de dosis de dalbavancina y la eficacia frente a *S. aureus*.

5 La Figura 49 proporciona la relación entre los parámetros PK/PD de la dalbavancina y la eficacia frente a *S. pneumoniae*.

La Figura 50 proporciona la relación entre los parámetros PK/PD de la dalbavancina y la eficacia frente a *S. aureus*.

10 La Figura 51 proporciona las curvas de respuesta a dosis para la dalbavancina frente a diversas cepas.

La Figura 52 proporciona las curvas de respuesta a dosis para la dalbavancina frente a *S. pneumoniae* y *S. aureus*.

15 La Figura 53 proporciona las curvas de respuesta a dosis para la dalbavancina en ratones normales y neutropénicos infectados con *S. pneumoniae*.

La Figura 54 proporciona las curvas de respuesta a dosis para la dalbavancina en modelos de infección de pulmón y de muslo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

20 Cuando se describen los compuestos de la invención, las composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos y procedimientos para usar tales compuestos y composiciones, los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario.

25 "Compuesto A 40926 antibiótico" se refiere a un antibiótico de glicopéptido conocido por los especialistas en la técnica. Se describen

91
166

compuestos A 40926 antibióticos ejemplares en las Patentes de Estados Unidos N° 4.935.238, 4.868.171 y 4.782.042, los contenidos de las cuales se incorporan por la presente como referencia en su totalidad.

5 "Compuesto de dalbavancina" se refiere a un antibiótico de glicopéptido descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.750.509 y en la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0142883, los contenidos de las cuales se incorporan en este documento como referencia en su totalidad. El nombre sistemático de un compuesto de dalbavancina ejemplar conocido por los especialistas en la técnica es ristomicina A, 5,31-dicloro-38-des(metoxicarbonil)-
10 7-desmetil-19-desoxi-58-O-(2-desoxi-2-((10-metil-1-oxoundecil)amino)-beta-D-glucopiranosil)-38-(((3-(dimetilamino)propil)amino)-carbonil)-42-O-alfa-D-manopiranosil-*N*¹⁵-metil-aglicona. Los ejemplos incluyen los representados en las Figuras 26 y 27. Los compuestos de dalbavancina incluyen aquellos compuestos con restos de azúcar opcionales en las posiciones 58 y 42 y grupos
15 acilo opcionales, tales como ácidos grasos, en los azúcares. Los compuestos de dalbavancina pueden obtenerse a partir del antibiótico natural A 40926 conocido por los especialistas en la técnica. Los compuestos de dalbavancina ejemplares incluyen los descritos en la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0142883 tales como dalbavancina A₀, A₁, B₀, B₁, C₀ y C₁.

20 "Compuesto antibiótico de *N*¹⁵,*N*¹⁵-dialquilo", descrito con detalle en las siguientes secciones, se refiere a un compuesto de la invención, es decir, un compuesto antibiótico que tiene dos grupos alquilo en su nitrógeno *N*¹⁵. Un compuesto antibiótico de *N*¹⁵*N*¹⁵-dialquilo de la invención puede obtenerse a partir de un compuesto A 40926 antibiótico o a partir de un compuesto de
25 dalbavancina tal como dalbavancina A₀, A₁, B₀, B₁, C₀ y C₁.

167

"Compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo", descrito con detalle en las siguientes secciones, se refiere a un compuesto de la invención, es decir, un compuesto antibiótico, que tiene dos grupos metilo en su nitrógeno N^{15} .

"Acilo" se refiere a un radical $-C(O)R$, en el que R es un alquilo.

5 "Alquilo" se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos saturados monovalentes que preferiblemente tienen de 1 a aproximadamente 11 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 8 átomos de carbono, y todavía más preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono. La cadena de hidrocarburo puede ser lineal o ramificada. Este término se ejemplifica con grupos tales como metilo, etilo, *N*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo, *n*-hexilo, *n*-octilo, *terc*-octilo y similares. La expresión "alquilo inferior" se refiere a grupos alquilo que
10 tienen de 1 a 6 átomos de carbono.

"Alquilenos" se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos saturados bivalentes que tienen preferiblemente de 1 a 11 átomos de carbono y más preferiblemente
15 de 1 a 6 átomos de carbono y que pueden ser lineales o ramificados. Este término se ejemplifica con grupos tales como metileno ($-CH_2-$), etileno ($-CH_2CH_2-$), los isómeros del propileno (por ejemplo, $-CH_2CH_2CH_2-$ y $-CH(CH_3)CH_2-$) y similares.

"Amino" se refiere al radical $-NH_2$.

20 "Alquilamino" se refiere al radical $-NH$ -alquilo o $-N$ (alquilo)₂.

"Aminoalquilamino" se refiere a un radical de la forma $-NR-(alquil)-NR'R''$ en el que cada R, R' y R'' representan independientemente un grupo hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, heteroarilo o
25 heteroarilo sustituido. Los grupos R, R' y R'' preferidos incluyen hidrógeno y

168

alquilo. Los grupos aminoalquilamino ejemplares se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.750.509, los contenidos de la cual se incorporan en este documento como referencia en su totalidad.

"Carboxi" se refiere al radical $-C(O)OH$.

5 "Dialquilamino" quiere decir un radical NRR' en el que cada uno de R y R' representa independientemente un grupo alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido definidos en este documento.

10 "Halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo. Los grupos halo preferidos son flúor o cloro.

El "porcentaje de distribución de HPLC" de un componente particular se calcula comparando el área del pico correspondiente al componente particular con el área cromatográfica total.

15 "Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado (por una agencia reguladora para uso comercial o de investigación) del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para el uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

20 "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto parental. Tales sales incluyen: (1) sales de adición de ácidos formadas con ácidos orgánicos o inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, acético, 25 trifluoroacético, tricloroacético, propiónico, hexanoico, ciclopentilpropiónico,

glicólico, glutárico, pirúvico, láctico, malónico, succínico, sórbico, ascórbico, málico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, pícrico, cinámico, mandélico, ftálico, láurico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etano-disulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, 5 bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, 2-naftalenosulfónico, 4-toluenosulfónico, alcanfórico, alcanforsulfónico, 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, glucoheptónico, 3-fenilpropiónico, trimetilacético, *terc*-butilacético, laurilsulfúrico, glucónico, benzoico, glutámico, hidroxinaftoico, salicílico, esteárico, mucónico y ácidos similares; o (2) sales formadas cuando un protón 10 ácido presente en el compuesto parental (a) se reemplaza por un ión metálico, por ejemplo, un ión de metal alcalino, un ión alcalino térreo o un ión de aluminio, o hidróxidos de metal alcalino o hidróxidos de metal alcalino térreo, tales como hidróxido de sodio, potasio, calcio, magnesio y bario, amoniaco o (b) se coordina con una base orgánica, tal como aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas, o 15 aromáticas, tales como metilamina, dimetilamina, dietilamina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, *N*-metilglucamina y similares (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.606.036).

Las sales incluyen adicionalmente, a modo de ejemplo sólo, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares, y cuando el 20 compuesto contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos, tales como clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. La expresión "catión farmacéuticamente aceptable" se refiere a un contraión catiónico no tóxico, farmacéuticamente aceptable de un grupo funcional ácido. Tales cationes se ejemplifican por

170

cationes sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio y tetraalquilamonio y similares.

5 "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra un compuesto de la invención.

"Solvato" se refiere a un compuesto de la presente invención o a una sal del mismo, que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes. Cuando el disolvente es agua, el solvato es un hidrato.

10 "Prevenir" o "prevención" se refiere a una reducción del riesgo de adquirir una enfermedad o trastorno (es decir, causando que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un sujeto que puede estar expuesto o predispuesto a la enfermedad pero que todavía no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad). Preferiblemente, prevención se refiere al
15 uso de un compuesto o composición en un sujeto no aquejado todavía de la enfermedad o trastorno o que todavía no muestra un síntoma de la enfermedad o trastorno, por ejemplo un sujeto que no está infectado todavía o que todavía no muestra los síntomas de la infección.

20 "Sujeto" incluye a seres humanos. Los términos "ser humano", "paciente" y "sujeto" se usan de forma intercambiable en este documento.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto o composición que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo de, entre otras

cosas, el compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, etc. del sujeto a tratar.

"Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma) que existe en un sujeto. En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a mejorar al menos un parámetro físico, que puede ser indistinguible por el sujeto. Todavía en otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno, físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma distinguible) o fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o de ambas maneras. Todavía en otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a retrasar la aparición de la enfermedad o trastorno.

Debe entenderse que los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero difieren en la naturaleza o secuencia de unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio se conocen con el término de "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de los átomos en el espacio se llaman "estereoisómeros".

Los estereoisómeros que no son imágenes especulares uno del otro se llaman "diastereoisómeros" y aquellos que son imágenes especulares no superponibles uno del otro se llaman "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, cuando está unido a cuatro grupos diferentes, es posible que haya un par de enantiómeros. Un enantiómero puede caracterizarse por la configuración absoluta de su centro asimétrico y se designa como (*R*) o (*S*) de acuerdo con las reglas de Cahn y Prelog, o puede caracterizarse por la manera en que la molécula rota el plano de luz polarizada y

172

se designa por dextrorrotatorio o levorrotatorio (es decir, como isómeros (+) o (-) respectivamente). Un compuesto quiral puede existir como enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que contenga proporciones iguales de enantiómeros se llama "mezcla racémica".

5 En ciertas realizaciones, los compuestos de esta invención pueden poseer uno o más centros asimétricos; tales compuestos pueden producirse por lo tanto como enantiómeros (*R*) o (*S*) individuales o como una mezcla de los mismos. A menos que se indique lo contrario, por ejemplo, por designación de la estereoquímica en cualquier posición de una fórmula, la descripción o el nombre
10 de un compuesto particular en la memoria descriptiva y reivindicaciones pretende incluir ambos enantiómeros individuales y mezclas, racémicas o de otra manera, de los mismos. Los procedimientos para determinar la estereoquímica y la separación de los estereoisómeros se conocen bien en la técnica. En realizaciones particulares, la presente invención proporciona los
15 estereoisómeros de los compuestos representados en este documento después de tratamiento con una base.

La presente invención proporciona nuevas composiciones farmacéuticas de dalbavancina, procedimientos para fabricar las composiciones farmacéuticas y procedimientos de tratamiento de infecciones bacterianas usando estas
20 nuevas composiciones. En particular, la invención proporciona composiciones de dalbavancina estables que tienen actividad bactericida, que pueden refrigerarse o almacenarse a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo prolongado, más preferiblemente al menos un año a temperatura ambiente, más preferiblemente al menos dos años a temperatura ambiente, sin
25 degradación significativa del componente de dalbavancina activo.

La presente invención proporciona también regímenes de dosificación mejorados y nuevas composiciones de dalbavancina, y procedimientos mejorados de tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos. En particular, la invención proporciona composiciones de dalbavancina que

5 tienen actividad frente a una o más cepas de bacterias resistentes a antibióticos, tales como MRSA, que pueden administrarse en un régimen de dosificación de una vez cada 5-7 días o más.

La dalbavancina, a la que la bibliografía científica se refiere también como BI 397 o VER001, es una mezcla de glicopéptidos semi-sintéticos, sobre las

10 propiedades de los cuales se ha informado en las Patentes de Estados Unidos N° 5.608.036, 5.750.509, 5.843.679 y 5.935.238.

Como se usa en este documento, el término "dalbavancina" se refiere a composiciones que comprenden uno o más, preferiblemente dos o más, en algunos casos tres o más, en algunos casos cuatro o más, en algunos casos

15 cinco o más homólogos muy relacionados, llamados "A₀", "A₁", "B₀", "B₁", "C₀", "C₁", "B₂" o "C₂", "D₀" y "D₁" como se describe a continuación, o monómeros, multímeros (es decir, dímeros o multímeros de orden superior), tautómeros, ésteres, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Como se usa en este documento, "dímero" o "multímero" se refiere a un homodímero o

20 un homomultímero, es decir, un dímero o multímero compuesto de monómeros del mismo homólogo de dalbavancina, o un heterodímero o heteromultímero, es decir, un dímero o multímero compuesto de monómeros de al menos dos homólogos de dalbavancina diferentes. Los factores difieren en las estructuras de las cadenas laterales de ácidos grasos del resto de ácido N-

25 acilaminoglucurónico, con la excepción de C₂ (también conocido como B₂). La

\$
174

espectrometría de masas del componente C₂ ha indicado la presencia de un grupo metileno adicional en el grupo amino terminal. La dalbavancina a menudo incluye "MAG", una variante no homóloga descrita a continuación que carece del resto acilglucuronamina. Individualmente, los homólogos de dalbavancina y
5 MAG se mencionan a veces en este documento como "componentes de dalbavancina".

La dalbavancina se prepara por modificación química del complejo de glicopéptido natural A 40926, como se describe en Malabarba y Donadio (1999) *Drugs of the future* 24(8):839-846. El componente predominante de la
10 dalbavancina es el factor B₀, que supone >75% del total del complejo.

La cantidad de cada componente presente en una composición de dalbavancina se dicta por una diversidad de factores, incluyendo, por ejemplo, las condiciones de fermentación empleadas en la preparación del complejo de glicopéptido natural A-40926, que es el precursor de la dalbavancina (véase, por
15 ejemplo la Patente de Estados Unidos N° 5.843.679), las condiciones empleadas para recuperar el A-40926 del caldo de fermentación, las reacciones químicas empleadas para esterificar selectivamente el grupo carboxilo del resto de azúcar de A-40926, las condiciones empleadas para amidar el grupo peptidilcarboxilo, las condiciones empleadas para saponificar el éster del grupo
20 carboxilo de la función ácido N-acilaminoglucurónico, las condiciones empleadas para recuperar la dalbavancina de la mezcla sintética, y similares.

En realizaciones preferidas, las composiciones de dalbavancina comprenden al menos aproximadamente del 80 a aproximadamente el 98% en peso del componente B₀. En realizaciones particularmente preferidas, la
25 dalbavancina comprende las siguientes cantidades de B₀:

175

Tabla 1. Cantidades Preferidas Del Componente B₀ En Composiciones De Dalbavancina.

Preferido¹	Más preferido¹	Incluso más preferido¹
80-98	80-97	80-96
81-98	81-97	81-96
82-98	82-97	82-96
83-98	83-97	83-96
84-98	84-97	84-96
85-98	85-97	85-96
86-98	86-97	86-96
87-98	87-97	87-96
88-98	88-97	88-96
89-98	89-97	89-96
90-98	90-97	90-96

1 cada intervalo representa el % en moles de B₀ relativo al total de componentes de dalbavancina presentes en la composición de dalbavancina incluyendo el MAG.

En una realización, la composición o la formulación de dalbavancina contiene una cantidad mínima, si los hay, de Componentes C₀, C₁ y C₂ (B₂). En otra realización, la composición o la formulación de dalbavancina no contiene ninguno de los Componentes C₀, C₁ y C₂ (B₂).

Los factores de dalbavancina individuales se han purificado previamente por HPLC y se han caracterizado por RMN. En la Patente de Estados Unidos N°

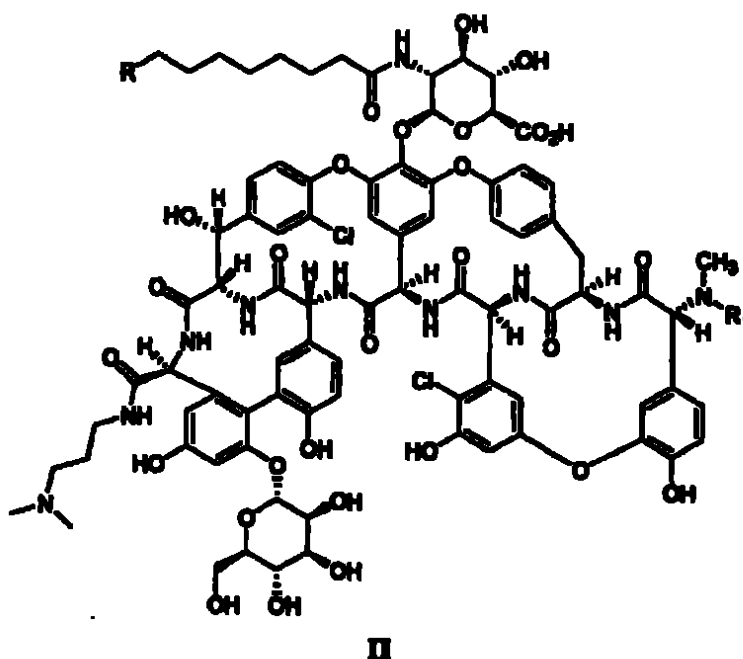
176

5.750.509, Malabarba y col. describen el derivado del antibiótico A 40926, que se caracterizó como poseedor de un sustituyente carboxi, alcoxi(C₁-C₄)-carbonilo, aminocarbonilo, alquil(C₁-C₄)-aminocarbonilo o hidroximetilo en el resto *N*-acilaminoglucuronilo y un sustituyente hidroxilo o poliamina en la

5 posición 63 de la molécula. Se descubrió que los compuestos de la invención tenían alta actividad in vitro contra Enterococos y Estafilococos resistentes a glicopéptido. Malabarba y col., sin embargo, ni reconocieron combinaciones de factores que fueran farmacéuticamente beneficiosos ni identificaron o

10 caracterizaron el producto de degradación que carece del resto de acilglucuronamina. Malabarba y col. nunca controlaron el MAG o produjeron una forma estéril. Malabarba y col. sólo purificaron una pequeña cantidad por HPLC y no hicieron un análisis de masa cuantitativo.

La estructura química de varios de los componentes de dalbavancina se representa en la Fórmula II a continuación:



177

Componente de dalbavancina	R	R ₁	Peso Molecular
A ₀	-CH(CH ₃) ₂	H	1802,7
A ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	1802,7
B ₀	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	1816,7
B ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	1816,7
B ₂ o C ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	1830,74
C ₀	-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	1830,7
C ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	1830,7
D ₀	-(CH ₃) ₂	H	1788,66
D ₁	-CH ₂ CH ₃	H	1788,66
MAG	-	H	1459,27

Todos los componentes de dalbavancina anteriores son bactericidamente activos frente a varias bacterias Gram positivas. Sin embargo, un componente de dalbavancina no homólogo, llamado "MAG", que carece del resto acilglucuronamina presente en otros componentes, es menos eficaz como bactericida, tanto *in vivo* como *in vitro*, que otros componentes de dalbavancina. (Véanse las Tablas 2 y 3). Se piensa que MAG es un producto de descomposición de uno o más de los otros componentes de dalbavancina. Por consiguiente, en una realización preferida, la cantidad de MAG en la dalbavancina es menor de aproximadamente el 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1 o 0,5 por ciento en moles de todos los componentes de dalbavancina presentes, incluyendo al MAG.

178

Tabla 2. DE₅₀ de MAG en comparación con dalbavancina y vancomicina frente a septicemias de *Staphilococcus aureus* en ratones.

Microorganismo	Compuesto	MIC (µg/ml)	DE ₅₀ (mg/kg)
MSSA (<i>S. aureus</i> meticilina sensible) <i>Staph. aureus</i> Smith 819	MAG	0,5	0,3
	Dalbavancina	0,06	0,05
	Vancomicina	0,5	1,7
MRSA (<i>S. aureus</i> meticilina resistente) <i>Staph. aureus</i> 3817	MAG	0,5	1,6
	Dalbavancina	≤0,03	0,7
	Vancomicina	0,5	1,0

** Tratamiento: una vez en los 10 minutos a partir de la infección por vía sc.

5

Tabla 3. Actividad microbiológica

Microorganismo	MIC µg/ml	
	MAG	Dalbavancina
L 819 <i>S aureus</i> Smith	0,5-0,5-0,25	≤0,13-0,06-<0,03
L 819 <i>S aureus</i> Smith 50% de suero	1-1-1	1-2-2
L 613 <i>S aureus</i> aislado clin.	1-0,5-0,5	0,5-0,06-<0,03
3797 <i>S aureus</i> aislado clin. GISA	0,5-0,5	2-2
3817 <i>S aureus</i> aislado clin.	0,5	<0,03
L 147 <i>S epidermidis</i>	0,25-0,13-0,13	≤0,13-<0,03- <0,03

L 49 S pyogenes C203	0,5-0,5-0,25	≤0,13-<0,03- <0,03
L 44 S pneumoniae UC41	1-0,5-0,5	0,25-<0,03-<0,03
L 602 S haemolyticus aislado clin.	>32-32	>32->32
L 149 E faecalis	0,25-0,5-0,5	0,08-0,08
L 562 E faecalis aislado clin	32->32->32	>32->32->32
L 1666 E. faecium Van-A	>32->32->32	>32->32->32
L 102 B subtilis ATCC	0,13-0,13	<0,03-<0,03
L 47 E coli SKF12140	>32->32->32	>32->32->32
G 16440 E coli Iperperm	8-8-16	16-8-16
L 79 P vulgaris	>32->32->32	>32->32->32
L 4 P aeruginosas ATCC10145	>32->32->32	>32->32->32
L 145 C albicans SKF2270	>32->32->32	>32->32->32

Se originan modificaciones adicionales en la sustancia de fármaco final a partir del procedimiento de fermentación, las posteriores etapas químicas, o el secado. IsoB₀ (RRT 0,76) es un diastereómero de dalbavancina B₀ provocado por la epimerización de un protón inestable en la estructura central de dalbavancina. Se origina durante la desacetilación del precursor A-40926 con una base, formando el diastereómero de A-40926. Este diastereómero se convierte posteriormente en IsoB₀ en las siguientes etapas de modificación química. IsoB₀ se resuelve bien en el procedimiento de liberación por HPLC y es el único estereoisómero detectado en el API. Los datos de laboratorio han demostrado que IsoB₀ no se forma durante el procedimiento de hidrólisis básica que convierte la forma éster (MA-A-1) en dalbavancina. IsoB₀ se ha

caracterizado por RMN y EM y ha demostrado actividad biológica *in vivo* que es comparable a la de la dalbavancina B₀.

El nivel de IsoB₀ en una composición de dalbavancina es menor de aproximadamente el 3,5%, como alternativa menor de aproximadamente el 3,0%, como alternativa menor de aproximadamente el 2,5%, como alternativa menor de aproximadamente el 2,0%, como alternativa menor de aproximadamente el 1,5%, como alternativa menor de aproximadamente el 1,0%, como alternativa menor de aproximadamente el 0,5%, como alternativa menor de aproximadamente el 0,4%, como alternativa menor de aproximadamente el 0,3%, como alternativa menor de aproximadamente el 0,2% o como alternativa menor de aproximadamente el 0,1%.

El nivel de IsoB₀ en una composición de dalbavancina puede estar como alternativa entre aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 3,0%, como alternativa entre aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 2,8%, como alternativa entre aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 2,5%, como alternativa entre aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 2,3%, como alternativa entre aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 2,0%, como alternativa entre aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1,8%, como alternativa entre aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1,5%, como alternativa entre aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1,3%, o como alternativa entre aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1,0%, o como alternativa entre aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5%.

El nivel de IsoB₀ en una composición de dalbavancina es como alternativa no menor de aproximadamente el 1,0%, como alternativa no menor de aproximadamente el 1,5%, como alternativa no menor de aproximadamente

el 2,0%, como alternativa no menor de aproximadamente el 2,5%, como alternativa no menor de aproximadamente el 3,0%, como alternativa no menor de aproximadamente el 3,5%, como alternativa no menor de aproximadamente el 4,0%, como alternativa no menor de aproximadamente el 4,5%, o como
5 alternativa no menor de aproximadamente el 5,0%.

Se piensa que la dalbavancina inhibe la biosíntesis de la pared celular bacteriana al unirse a los precursores de terminación D-alanil-D-alanina de los peptidoglicanos. Los dímeros o multímeros de orden superior de la dalbavancina pueden poseer propiedades antibacterianas adicionales por interacción de las
10 cadenas laterales lipófilas con la membrana citoplasmática de las bacterias. Véase, por ejemplo, Malabarba y Ciabatti, y col. (2001) *Current Medicinal Chemistry* 8:1759-1773. Se puede encontrar una elaboración adicional de multímeros de dalbavancina en el documento de Estados Unidos N° de serie 10/714.166, titulado "DALBAVANCIN COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF
15 BACTERIAL INFECTIONS", presentada el 14 de noviembre de 2003, con el expediente del mandatario N° 34231-20052,00, la descripción de la cual se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

In vitro, los datos clínicos y no clínicos indican que la dalbavancina es beneficiosa para el tratamiento de infecciones graves Gram positivas causadas
20 por MRSA y CoNS, y todas las especies de estreptococos y de los enterococos no VanA, incluyendo los fenotipos VanB y VanC poco susceptibles o resistentes a la vancomicina.

La dalbavancina es más activa *in vitro* frente a estafilococos (incluyendo algunas cepas resistentes a la teicoplanina) que la teicoplanina y vancomicina.
25 La dalbavancina tiene mejor actividad frente a estreptococos, incluyendo cepas

4
182

resistentes a la penicilina, que la teicoplanina o vancomicina. La dalbavancina es activa *in vitro* e *in vivo* frente a varias bacterias Gram positivas, incluyendo la mayoría de cepas resistentes a fármacos.

La dalbavancina se administra típicamente a un individuo en forma de una composición de dalbavancina. Como se usa en este documento, la expresión "composición de dalbavancina" o "formulación de dalbavancina" se refiere a una composición, típicamente una composición farmacéutica que comprende dalbavancina, como se ha definido anteriormente, y uno o más componentes que no son dalbavancina, tales como, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un estabilizador, un tampón u otros componentes similares.

Como se muestra en el Ejemplo 1, la dalbavancina es eficaz a intervalos de dosis de una semana. Por lo tanto, una ventaja de la dalbavancina frente a otras opciones de tratamiento es la capacidad de administrar este antibiótico en una base de una vez a la semana, maximizando de este modo la conformidad del paciente y minimizando potencialmente la necesidad o disminuyendo el tiempo de estancia en un hospital para la administración parenteral del antibiótico. Las dosis menos frecuentes del antibiótico permiten a menudo tratamientos en una base de pacientes externos, disminuyendo de este modo los costes del tratamiento. Como se muestra adicionalmente en el Ejemplo 1, una segunda dosis de dalbavancina aproximadamente una semana después de la administración de la primera dosis, en la que la segunda dosis es aproximadamente la mitad de la primera dosis, proporciona inesperadamente una mejora significativa en la eficacia del tratamiento.

25 **Procedimientos de uso**

Previamente, se ha informado de diversos regímenes de dosis para la dalbavancina, incluyendo regímenes de dosis única y de dosis múltiples. Leighton y col. informaron de una administración multi-dosis con una proporción de dosis óptima (dosis de carga (DC)/dosis de mantenimiento (DM)) de 10:1. En este estudio, el aumento de la dosis transcurrió hasta 1120 mg de dosis única (DU) y un régimen de dosis múltiples hasta de 500 mg BID el Día 1 seguido por 100 mg diariamente durante 6 días sucesivos. Leighton y col., "Dalbavancin: Phase I Single and Multiple-Dose Placebo controlled Intravenous Safety, Pharmacokinetic Study in Healthy Volunteers", 41st ICAAC Abstracts, Chicago, IL, 22-25 de septiembre de 2001, Resumen N° 951, pág. 25.

Leighton y col. describieron también otras administraciones de dosis única y múltiples. En los estudios de dosis únicas, informaron de un aumento de la dosis que transcurrió por medio de una serie de dosis de 140 mg, 220 mg, 350 mg, 500 mg, 630 mg, 840 mg, y 1120 mg. En la fase de dosis múltiples, la dosificación constó de una dosis de carga, administrada como dos dosis iguales separadas por 12 horas, seguido de dosis de mantenimiento. El régimen de comienzo fue una dosis de carga de 150 mg BID seguido por una dosis de mantenimiento de 30 mg al día durante 6 días. El aumento de las dosis transcurrió del siguiente modo: 200 mg BID/40mg, 300 mg BID/60 mg, 400 mg BID/80 mg, y 500 mg BID/100 mg. Leighton y col., "Dalbavancin: Phase I Single and Multiple-Dose Placebo Controlled Intravenous Safe Pharmacokinetic Study in Healthy Volunteers", 41st ICAAC, Chicago, IL, diciembre de 2001, Póster N°. 951.

White y col. informaron de regímenes de dosis de inyección intravenosa única de media hora de 70 mg, 140 mg, 220 mg o 360 mg. El régimen de multi-

dosis constó de 70 mg administrados diariamente durante 7 días. White y col. "V-Glycopeptide: Phase 1 Single and Multiple-Dose Placebo Controlled Intravenous Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study in Healthy Subjects" 40th ICAAC, Toronto, Canadá, 17-20 de septiembre, Póster N° 2196 y
5 Resumen N°. 2196. Todas las referencias mencionadas anteriormente se incorporan expresamente por la presente como referencia en su totalidad.

Se proporcionan nuevos procedimientos para la administración de dalbavancina a un individuo en necesidad de tratamiento para una infección bacteriana. El tratamiento puede incluir profilaxis, terapia, o cura. Los
10 procedimientos incluyen la administración de una o más dosis unitarias de dalbavancina en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz.

Como se usa en este documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de dalbavancina que dará un resultado terapéutico deseado (por ejemplo, reducción o eliminación de una infección bacteriana). Una cantidad
15 terapéuticamente eficaz puede administrarse en una o más dosis. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de dalbavancina suficiente para prevenir o reducir la gravedad de una futura infección bacteriana cuando se administra a un individuo que es susceptible de y/o puede contraer una infección bacteriana, por ejemplo, en virtud de un procedimiento médico o la estancia en
20 un hospital, o de la exposición a un individuo con una infección bacteriana. La dalbavancina se administra generalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La dalbavancina se proporciona a menudo en forma de una sal clorhidrato, que es libremente soluble en agua.

Típicamente, la dalbavancina se administra como una "dosis unitaria" en una formulación de dalbavancina que incluye una cantidad de dalbavancina suficiente para proporcionar un nivel en plasma de dalbavancina terapéutica o profilácticamente eficaz durante varios días, a menudo al menos 5 aproximadamente 5 días, una semana o 10 días, cuando se administra a un individuo.

Como se usa en este documento, "individuo" se refiere a un vertebrado, típicamente un mamífero, a menudo un ser humano.

Todos los homólogos de dalbavancina descritos anteriormente muestran una semi-vida prolongada en plasma, a menudo 9 días o más, aunque el MAG se piensa que tiene una semi-vida más corta que los otros homólogos. La semi-vida larga permite intervalos más largos entre las dosificaciones que con vancomicina o teicoplanina. Como se describe en el Ejemplo 1, dosis semanales de dalbavancina son eficaces para el control de infecciones bacterianas, en contraste con el programa de dos dosis diarias que se usa a menudo para la vancomicina o el programa de una dosis al día usado generalmente para la teicoplanina. Dosis menos frecuentes de dalbavancina ofrecen ventajas en el tratamiento significativas sobre la vancomicina y la teicoplanina, particularmente en relación con la mejora de la comodidad y la conformidad del paciente con el régimen de tratamiento. Sorprendentemente, se pueden administrar dosis altas (es decir, que provocan niveles altos en suero y de larga duración sorprendentes) y con menos frecuencia que con otras opciones de tratamiento disponibles. El nuevo régimen de dosificación disponible para la dalbavancina provoca una eficacia mejorada porque a las concentraciones requeridas para lograr dosis menos frecuentes, la dalbavancina muestra mínimos efectos

adversos *in vivo*, evidenciando una amplia ventana farmacéutica, y además porque los niveles en sangre de dalbavancina se mantienen por encima de unos niveles bactericidas mínimos durante el protocolo de tratamiento entero, evidenciando una prolongada semi-vida en suero para la dalbavancina. La
5 combinación de una amplia ventana farmacéutica unida con una semi-vida en suero prolongada permite una dosificación menos frecuente de dalbavancina.

Además, la dalbavancina se formula preferentemente con un estabilizador que inhibe la degradación de uno o más de los componentes de dalbavancina. En una realización preferida, la dalbavancina se formula con una proporción en
10 peso 1:2 de manitol:dalbavancina. En otra realización preferida, la dalbavancina se formula con una proporción en peso de 1:1:4 de manitol:lactosa:dalbavancina.

En algunas realizaciones, se administra una formulación de dalbavancina a una dosificación que provoca niveles en plasma terapéuticamente eficaces (es
15 decir, bactericidas) del fármaco durante varios días, a menudo de al menos aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días, a menudo al menos aproximadamente una semana. Generalmente, la dalbavancina se mantiene en el plasma a o por encima de la concentración bactericida mínima de aproximadamente 4 mg/l durante al menos 5 días. A menudo, la dalbavancina
20 se mantiene a un nivel en plasma de al menos aproximadamente 5 mg/l, a menudo al menos aproximadamente de 10 mg/l, a menudo al menos aproximadamente de 20 mg/l, a menudo al menos aproximadamente de 30 mg/l, a menudo al menos aproximadamente de 40 mg/l, durante al menos 5 días, a menudo al menos aproximadamente una semana o más tiempo. Los niveles en
25 plasma de dalbavancina se pueden medir por procedimientos que son bien

conocidos en la técnica, tales como cromatografía líquida, espectrometría de masas o bioensayo microbiológico. En el Ejemplo 5 se proporciona un ejemplo de un procedimiento para cuantificar la dalbavancina en plasma.

Los límites superiores para los niveles de concentración en plasma de dalbavancina están dictados generalmente por dosificaciones que inhiben efectos adversos inaceptables en la población de pacientes tratada.

Las composiciones de dalbavancina pueden administrarse en una dosis única o en múltiples dosis. Cuando se administra como una dosis única, la composición de dalbavancina se formula preferiblemente para que contenga cantidades suficientes de dalbavancina para lograr propiedades antibacterianas *in vivo* durante al menos 5 días, preferiblemente al menos 7 días, y más preferiblemente al menos 10 días.

Cuando se emplean múltiples dosis, la dalbavancina puede administrarse semanalmente durante dos o más semanas. En una realización, la dalbavancina se administra en al menos dos dosis, a menudo en dos dosis separadas por aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días, más a menudo una vez a la semana durante dos semanas. Como se muestra en el Ejemplo 1, tales regímenes de dosificación proporcionan ventajas significativas sobre los protocolos de tratamiento con antibióticos convencionales.

Las composiciones de dalbavancina pueden administrarse también en múltiples dosis separadas por dos o más días o al menos una semana, o en una o más dosis bisemanales. En algunas realizaciones, se administra una composición de dalbavancina semanalmente, seguido por administración bisemanal o mensual. En algunas realizaciones, la dalbavancina se administra a intervalos semanales durante 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas.

Lo más ventajoso es que no se requieren dosis diarias porque se usan dosis menos frecuentes y más altas. Las dosis únicas o múltiples pueden variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 g a aproximadamente 5 gramos. Se puede administrar para diversos tratamientos de infecciones una dosis única de

5 aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 gramos, por ejemplo aproximadamente 3 gramos. Cuando se administran múltiples dosis, por ejemplo semanalmente, cada dosis puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 5,0 gramos.

Para realizaciones en las que se administra una dosis única para tratar

10 una infección, la cantidad de la dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 gramos, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 gramos, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3,5 gramos, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 gramos, por ejemplo aproximadamente 3 gramos. En algunas realizaciones, se administra una dosis

15 única de aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, o 3 gramos para el tratamiento de una infección bacteriana. Para realizaciones en las que se administra una dosis única para profilaxis, la cantidad de la dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 gramos, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 gramo, por ejemplo aproximadamente 0,5 o

20 aproximadamente 0,25 gramos.

En esquemas de dosificación que incluyen dosis múltiples, las dosis únicas pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones, se administra una primera dosis más alta, es decir, por ejemplo aproximadamente 1,5 a 10 veces más alta, en ciertos casos 9 veces más alta, en otros casos 8 veces más

25 alta, en otros casos 7 veces más alta, en otros casos 6 veces más alta, en otros

casos 5 veces más alta, en otros casos 4 veces más alta, en otros casos 3 veces más alta, en otros casos 2 veces más alta, que una o más dosis posteriores. Por ejemplo, la primera dosis puede ser de aproximadamente 0,5 gramos a aproximadamente 5 gramos y la segunda dosis de aproximadamente 0,25 gramos a aproximadamente 2,5 gramos, la primera dosis puede ser de aproximadamente 0,8 gramos a aproximadamente 2 gramos y la segunda dosis de aproximadamente 0,4 gramos a aproximadamente 1 gramo, o la primera dosis puede ser de aproximadamente 0,4 gramos a aproximadamente 3 gramos y la segunda dosis de aproximadamente 0,2 gramos a 1,5 gramos.

10 En algunas realizaciones, se administran al menos dos dosis en las que la primera dosis incluye aproximadamente dos veces la cantidad de dalbavancina de las dosificaciones posteriores. En una realización, una primera dosificación incluye aproximadamente 1 gramo de dalbavancina y una dosificación posterior incluye aproximadamente 0,5 gramos. En otra realización, una primera dosificación incluye aproximadamente 0,5 gramos de dalbavancina y una dosificación posterior incluye aproximadamente 0,25 gramos.

En algunas realizaciones, se administra una composición de dalbavancina en dos dosis de igual o diferente cantidad separadas por dos o más días o al menos aproximadamente por una semana. A menudo, se administran dos dosis de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1,5 gramos de dalbavancina separadas por aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días, más a menudo separadas aproximadamente 1 semana. En una realización, se administran una primera dosificación de aproximadamente 1 gramo de dalbavancina y una segunda dosificación de aproximadamente 0,5 gramos de dalbavancina, separadas aproximadamente 1 semana.

En un régimen de dosificación múltiple, el tiempo entre las dosis puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días, a menudo aproximadamente una semana, como alternativa aproximadamente dos semanas. La frecuencia de dosis puede ser, por ejemplo, dosis dos veces por semana, o múltiples dosis semanales. El intervalo de dosificación, o tiempo entre las dosis, puede ser, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más días. El número de dosis dadas puede ser, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más dosis, dándose cada dosis después de la dosis inicial después del intervalo de dosificación seleccionado.

En un programa de dosificación múltiple, a menudo el "nivel más bajo" o el nivel de dalbavancina en plasma después de una primera dosis de dalbavancina y justo antes de la administración de una segunda dosis, es de al menos aproximadamente 4 mg/l. Preferiblemente, el nivel más bajo al final de un intervalo de dosis tal como de aproximadamente una semana es de al menos aproximadamente 20 mg/l, más preferiblemente al menos aproximadamente 30 mg/l, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 40 mg/l.

La dalbavancina puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo por vía intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) (inyección en embolada o lenta), subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) o intratecal (i.t.). El programa de dosificación y la dosificación real administrada pueden variar dependiendo de factores tales como la naturaleza y gravedad de la infección, la edad, el peso y la salud general del paciente y la tolerancia de un paciente particular a la dalbavancina, pero se podrá determinar por profesionales de la salud. En una

realización, a una dosis intravenosa de un gramo de dalbavancina le sigue una segunda dosis intravenosa de 0,5 gramos una semana más tarde.

La administración y el suministro del fármaco al paciente, por ejemplo por vía intravenosa, pueden hacerse a una velocidad controlada, de forma que la
5 concentración en la sangre no aumenta demasiado deprisa o provoque la precipitación. En algunas realizaciones, la dalbavancina se administra a una velocidad apropiada para que el fármaco forme un complejo con proteína o proteínas endógenas en el torrente sanguíneo. Sin pretender estar unidos a una teoría particular, se cree que la proteína endógena, tal como la albúmina de
10 suero humana, puede formar un complejo *in vivo* con una o dos moléculas de monómeros homólogos de dalbavancina. Cuando está presente una cantidad suficiente de dalbavancina, se cree que se unirán hasta dos moléculas de homólogos de dalbavancina a la proteína endógena y además se cree que este complejo se forma por la unión de moléculas homólogas diferentes de
15 dalbavancina a dos sitios de unión diferentes. Como alternativa, es posible que la dalbavancina dimérica se una a un sitio de unión único en la proteína endógena. Se puede encontrar una elaboración adicional sobre complejos dalbavancina-proteína endógena analizados anteriormente en el documento de Estados Unidos N° de serie 10/713.924, titulado "COMPOSITIONS AND
20 METHODS FOR TREATING BACTERIAL INFECTIONS WITH PROTEIN-DALBAVANCIN COMPLEXES", presentado el 14 de noviembre de 2003, como expediente del mandatario N° 34231-20053,00, la descripción de la cual se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

La duración de la infusión puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1
25 minuto a aproximadamente 2 horas, o como alternativa, de aproximadamente 15

minutos a aproximadamente 2 horas. Por ejemplo, se puede usar una duración de infusión de aproximadamente 30 minutos cuando la dosis es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 gramo. La administración intravenosa en condiciones de velocidad controlada puede generar

5 concentraciones de dalbavancina en el cuerpo que están en gran exceso de lo que se puede lograr en fase de solución a pH fisiológico *in vitro*. Aunque no se desea limitarse por la teoría, esto puede deberse a la formación de un complejo de dalbavancina con proteína o proteínas endógenas tales como albúmina de suero, que puede aumentar la solubilidad de la dalbavancina en el plasma

10 comparado con estudios *in vitro*.

La formación de un complejo de dalbavancina *in vitro* o *ex vivo* puede permitir una administración más rápida, tal como de al menos aproximadamente 1 minuto, al menos aproximadamente 10 minutos o al menos aproximadamente 20 minutos. Tal complejo puede lograrse mezclando albúmina de suero humana

15 y/u otra proteína endógena con la dalbavancina, formando de ese modo el complejo *in vitro* o *ex vivo*, y después administrando este complejo al paciente tratado. Como alternativa, la albúmina de suero humana u otra proteína endógena pueden obtenerse de fuentes autólogas o por expresión a partir de un microorganismo modificado para que contenga el gen para la proteína.

20 La cantidad de dalbavancina administrada puede ser cualquiera de las dosis descritas en este documento. La dosis de dalbavancina generalmente se elige para que el fármaco se mantenga a un nivel en plasma terapéutica o profilácticamente eficaz (es decir, bactericida) durante un periodo de tiempo prolongado, a menudo al menos 5 días, mas a menudo aproximadamente una

25 semana o más tiempo. Se prefiere la administración de una dosis de

dalbavancina que produzca y mantenga concentraciones bactericidas durante al menos aproximadamente una semana (o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días). Una concentración bactericida se define como la concentración de dalbavancina requerida para matar al menos el 99% de las bacterias presentes al comienzo de un experimento *in vitro* en un periodo de 24 horas. Una concentración bactericida mínima de dalbavancina en plasma es típicamente de aproximadamente 4 mg/l.

Ejemplos de indicaciones que pueden tratarse incluyen infecciones de tejidos blandos y de la piel complicadas y no complicadas (SSTI) (también conocidas como infecciones de la piel y de estructuras de la piel complicadas y no complicadas (SSSI)), infecciones del torrente sanguíneo (BSI), infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéteres (CRBSI), osteomielitis, infecciones de la articulación prostética, profilaxis quirúrgica, endocarditis, neumonía adquirida en hospitales o comunitaria, neumonía por pneumococos, tratamiento empírico de neutropenia febril, infecciones del espacio de las articulaciones, e infecciones por dispositivos (por ejemplo marcapasos y desfibriladores cardiacos internos). Se pueden tratar infecciones bacterianas resistentes a antibióticos o Gram positivas, tales como infecciones de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, o *Clostridium*, en particular *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* grupos A y C, *Neisseria gonorrhoeae*, o *Clostridium difficile*.

La invención proporciona procedimientos para el tratamiento de infecciones de la piel y tejidos blandos (SSTI). Los pacientes que pueden beneficiarse de este tratamiento pueden tener infecciones profundas o

superficiales. Las SSTI pueden implicar a tejidos blandos más profundos y/o requerir intervención quirúrgica significativa, tal como por ejemplo un absceso importante, úlcera infectada, quemadura importante o celulitis profunda y extensiva. Se pueden tratar también heridas quirúrgicas infectadas. La eficacia
5 de la dalbavancina en el tratamiento de la piel es un resultado inesperado y sorprendente porque la dalbavancina forma complejos con proteínas in vivo (véase Ejemplo 5).

La presentación clínica de la infección de la piel y estructura de la piel puede variar de foliculitis leve a fascitis necrotizante grave. El modo de
10 adquisición puede variar también con infecciones de la estructura de la piel e infecciones de la piel adquiridas en comunidad, que están precedidas a menudo por heridas provocadas por la exposición profesional o actividades recreativas, y están asociadas normalmente con una mayor diversidad de patógenos. Las infecciones de la estructura de la piel e infecciones de la piel adquiridas en
15 hospitales están asociadas generalmente con procedimientos quirúrgicos, el desarrollo de úlceras de presión y cateterización. Las infecciones post-quirúrgicas son la tercera infección nosocomial más frecuente y suponen el 17% de todas las infecciones nosocomiales informadas al Sistema Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial (NNIS). La fuente de infección más frecuente
20 es la flora endógena del paciente. *Staphylococcus aureus*, estafilococos negativos a la coagulasa y *Enterococcus spp.* son los patógenos aislados más frecuentemente en las SSTI.

Los síntomas de las infecciones SSTI pueden incluir eritema, dolor, calor o calor localizado, drenaje o descarga, hinchazón o inflamación dura,
25 enrojecimiento o fluctuación. Los pacientes que pueden beneficiarse del

tratamiento con los procedimientos de la invención incluyen aquéllos con infecciones profundas o complicadas o infecciones que requieren intervención quirúrgica, o pacientes con diabetes mellitus subyacente o enfermedad vascular periférica. Estas infecciones están causadas a menudo por bacterias Gram

5 positivas tales como especies de *Staphylococcus* o *Streptococcus*, tales como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*. Los procedimientos para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel o de tejidos blandos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dalbavancina a un individuo en necesidad de tratamiento, en una cantidad de acuerdo con un régimen de

10 dosis analizado anteriormente. En algunas realizaciones, se administra una composición de dalbavancina por vía intravenosa en dos dosis, a menudo separadas aproximadamente de 5 a aproximadamente 10 días, más a menudo separadas aproximadamente 1 semana. En algunas realizaciones, la primera dosis incluye al menos dos veces la cantidad de dalbavancina de la segunda

15 dosis. En una realización, la primera dosis es aproximadamente de 1000 mg y la segunda dosis es aproximadamente de 500 mg. En otra realización, la primera dosis puede ser aproximadamente de 1200 mg y la segunda dosis puede ser aproximadamente de 600 mg.

La invención proporciona también procedimientos para la prevención

20 profiláctica de la aparición de una infección bacteriana, por ejemplo una infección causada por *Staphylococcus aureus* o por bacterias del género *Neisseria* o *Clostridium*. En un procedimiento profiláctico de la invención, se administra una cantidad profilácticamente eficaz de dalbavancina a un individuo que puede ser susceptible a contraer una infección bacteriana, por ejemplo por

25 un procedimiento médico. A menudo, la dalbavancina se administra en una

cantidad suficiente para proporcionar un nivel en plasma profilácticamente eficaz durante al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, o al menos aproximadamente una semana o más tiempo. Las composiciones de dalbavancina pueden administrarse, por ejemplo, por vía parenteral, por ejemplo por inyección intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), subcutánea (s.c) o intratecal (i.t.), antes o después de la cirugía como una etapa preventiva frente a la infección. Las composiciones de dalbavancina pueden administrarse inmediatamente antes o después de, 1 o más días o aproximadamente una semana antes o después de, o durante un procedimiento médico invasivo tal como cirugía o una estancia en una instalación de cuidados médicos tal como un hospital para prevenir la infección. Se puede usar un procedimiento profiláctico en cualquier situación en la que sea posible o probable que un individuo pueda contraer una infección bacteriana, incluyendo situaciones en las que un individuo ha estado expuesto a o es probable que esté expuesto a individuos infectados con bacterias. Para los procedimientos profilácticos, las composiciones de dalbavancina se pueden administrar como una dosis única o como dos o más dosis de igual o diferente cantidad que se administran separadas por varios días a aproximadamente una semana. En una realización, se puede administrar una composición de dalbavancina antes de o simultáneamente con la inserción de un catéter intravenoso para prevenir infecciones relacionadas con el torrente sanguíneo.

Para procedimientos profilácticos, pueden administrarse composiciones de dalbavancina en una dosis única o en dosis múltiples, de acuerdo con cualquiera de los programas de dosis descritos anteriormente. A menudo, se administra una composición de dalbavancina como una dosis única que

comprende aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 gramos, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 gramo, por ejemplo aproximadamente 0,25 gramos o aproximadamente 0,5 gramos. En una realización, se administra por vía intravenosa una dosis única de
5 aproximadamente 0,25 gramos en un marco de tiempo de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 1 hora, por ejemplo aproximadamente 30 minutos. En otra realización, la composición de dalbavancina se administra por vía intravenosa simultáneamente con la administración de otro tratamiento farmacéutico (por ejemplo, antibiótico).

- 10 En cualquiera de los procedimientos terapéuticos o profilácticos descritos anteriormente, la composición de dalbavancina puede administrarse de forma simultánea o secuencial con al menos otro antibiótico. En algunas realizaciones, se administra además de la dalbavancina al menos un antibiótico diferente que es eficaz (por ejemplo, bactericida) frente a una o más especies de bacterias
- 15 Gram negativas y/o cepas de bacterias Gram positivas frente a las cuales la dalbavancina no es eficaz. En algunas realizaciones, se administra dalbavancina y al menos un antibiótico que es eficaz (por ejemplo bactericida) frente al menos una especie de bacterias Gram negativas, como una mezcla en la composición de dalbavancina.

20 Farmacocinética

Los estudios en animales de dalbavancina se realizaron usando ratones, ratas, conejos, perros y cerdos enanos.

Se usaron diversos procedimientos validados para cuantificar la dalbavancina. API de dalbavancina consta de 5 homólogos (A_0 , A_1 , B_0 , B_1 y B_2).

- 25 Los procedimientos basados en la actividad antibacteriana midieron todos los

componentes de dalbavancina microbiológicamente activos. Con procedimientos cromatográficos, se midió el componente principal B₀ en combinación con el componente B₁ (juntos, del 90% al 95% de dalbavancina) y el resultado se dio en términos de dalbavancina total. El recuento por escintilación líquida (LSC) y la cromatografía líquida con detección radioquímica (CL/DR) permitieron la medida de dalbavancina y metabolitos en plasma, orina y heces de los animales a los que se les había dado el fármaco radiomarcado. Siempre que se cuantificaron la dalbavancina y la radiactividad derivada del fármaco en el plasma de animales a los que se les había dado dosis clínicamente relevantes, las curvas de concentración-tiempo para el fármaco y la radiactividad eran superponibles. Esto indica que prácticamente toda la radiactividad derivada del fármaco en el plasma era fármaco intacto.

El fármaco se distribuyó ampliamente en el cuerpo dentro de todos los órganos y tejidos analizados después de la administración de la dosis IV. La dalbavancina penetró en la piel de las ratas y de los cerdos enanos. La cinética de la dalbavancina se comportó de una forma predecible en las especies. Se descubrió que la eliminación en plasma (CL) era proporcional al peso corporal de las especies. Además, la dalbavancina cruzó la placenta de la rata y se encontró en el plasma del feto de la rata.

La dalbavancina no es un sustrato, inhibidor o inductor de las isoenzimas hepáticas citocromo P450. El fármaco no se metaboliza *in vitro* por los microsomas hepáticos de la rata, del perro o del ser humano; por los hepatocitos de la rata, del perro o del ser humano; o microsomas del riñón humano. La dalbavancina no afecta al metabolismo de sustratos marcadores por

microsomas hepáticos humanos aislados. La administración de dalbavancina a ratas no induce ninguna actividad P450.

Se observan perfiles del metabolito dalbavancina similares a través de las especies. Dos (2) metabolitos (OH-dalbavancina y MAG) se han observado en la orina de ratas, perros y seres humanos. Ambos metabolitos son indetectables o están cercanos al límite de detección ($<0,4$ mg/l) en el plasma humano, tienen menos actividad antibacteriana que la dalbavancina, y contribuyen poco (si acaso algo) a la actividad *in vivo*. Con dosis clínicas relevantes, se observaron generalmente resultados similares en el plasma de los animales.

El fármaco tiene vías duales (renal y fecal) de excreción y se excreta como fármaco intacto y metabolitos. La dalbavancina se excreta en la orina y heces de ratas, perros y seres humanos. La mayoría de la dosis se excreta como fármaco intacto en la orina. La OH-dalbavancina y el MAG se encuentran en la orina también. Se encuentra algo del fármaco intacto en las heces animales junto con cantidades traza de metabolitos. Las heces humanas contenían componentes de dalbavancina microbiológicamente activos. La dalbavancina se excreta también en la leche de rata. Por lo tanto, la dalbavancina se elimina del cuerpo mediante el metabolismo, excreción urinaria y excreción fecal. Esto predeciría que se requerirían pocos, si acaso algún ajuste de la dosis basándose en la demografía de los pacientes. Sorprendentemente, los pacientes con fallo renal grave (eliminación de creatinina CL_{CR} menor de 30 ml/min) lograron mayores niveles que pacientes renales normales (eliminación de creatinina CL_{CR} mayor de 80 ml/min). Los pacientes graves con una dosis de 1 g en el Día 1 tuvieron niveles similares a un paciente normal que recibió 100 mg en el Día 1 y 500 mg en el Día 8.

Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas formuladas para la administración de dalbavancina de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar

5 en forma de una dosis unitaria de dalbavancina que incluye una cantidad de dalbavancina suficiente para proporcionar un nivel en plasma de dalbavancina terapéutica o profilácticamente eficaz durante varios días, a menudo al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días o al menos aproximadamente una semana o más tiempo cuando la composición se

10 administra a un individuo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Generalmente, un nivel en plasma de dalbavancina terapéutica o profilácticamente eficaz es de al menos aproximadamente 4 mg por litro de plasma. Los niveles en el plasma de dalbavancina pueden medirse por procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como los descritos

15 anteriormente.

La dalbavancina puede estar opcionalmente en una forma farmacéuticamente aceptable para la administración a un individuo, opcionalmente como una sal farmacéuticamente aceptable, no tóxica.

Los ejemplos de sales adecuadas de dalbavancina incluyen sales

20 formadas por reacción convencional con ácidos orgánicos e inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, tricloroacético, succínico, cítrico, ascórbico, láctico, maleico, glutámico, alcanfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, metanosulfónico, bencenosulfónico, sórbico, plúrico, benzoico,

25 cinnámico, y similares. Los ejemplos representativos de bases que pueden

7/2011

formar sales con la dalbavancina incluyen hidróxidos de metales alcalinos o hidróxidos de metales alcalino térreos, tales como hidróxido de sodio, potasio, calcio, magnesio e hidróxido de bario, amoniaco y aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas o aromáticas tales como metilamina, dimetilamina, dietilamina, etanolamina y picolina. (Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.606.038).

En algunas realizaciones, se proporciona una formulación acuosa farmacéuticamente aceptable de dalbavancina que es adecuada para la administración parenteral, tal como, por ejemplo, inyección intravenosa. Para preparar tal formulación acuosa, se pueden usar procedimientos bien conocidos en la técnica, y cualesquiera vehículos, diluyentes, excipientes farmacéuticamente aceptables u otros aditivos usados normalmente en la técnica. En una realización, una formulación acuosa farmacéuticamente aceptable para inyección intravenosa incluye dextrosa al 5%.

La dalbavancina puede administrarse de forma parenteral, es decir, la vía de administración es por inyección bajo o a través de una o más capas de la piel o de las membranas mucosas. Como esta vía evita estas barreras protectoras altamente eficaces del cuerpo humano, se debe lograr una forma de dosis parenteral de pureza excepcional libre de microorganismos y partículas insolubles. El procedimiento usado en la preparación de tal forma de dosis debe incorporar buenas prácticas de fabricación que producirán y mantendrán la calidad requerida del producto en términos de esterilidad y eficacia terapéutica. Además, la forma debe ser estable cuando se almacena a temperatura ambiente para una forma de dosificación práctica y conveniente.

Existen varios procedimientos convencionales disponibles generalmente para convertir la masa de los materiales del fármaco en una forma de dosificación adecuada para la administración parenteral. Estos procedimientos se resumen en Remington's Pharmaceutical Sciences, decimo-octava edición, 5 1990 ("Remington").

Esterilización por Vapor

La USP define la esterilización por vapor como aquella que emplea vapor saturado a presión durante al menos 15 minutos a un mínimo de 121°C en un recipiente presurizado. Un fármaco en su forma sólida puede ponerse en un 10 autoclave para experimentar la esterilización por vapor. Un fármaco en su forma en solución puede ponerse directamente en un autoclave o se contiene en un recipiente sellado y se pone en un autoclave para experimentar el mismo tipo de esterilización por vapor.

Esterilización por Calor Seco

15 En la esterilización por calor seco, se somete la masa de material de fármaco a elevadas temperaturas a humedad relativamente baja. Debido a que el calor seco es menos eficaz que el calor húmedo en la esterilización, se requieren tiempos de exposición más largos y temperaturas más altas que los usados en la esterilización por vapor. El objetivo es matar a los microorganismos 20 por un proceso de oxidación. Aunque establecer ciclos de tiempo-temperatura exactos y correctos no es rutina, las temperaturas típicas usadas son 140-170°C de 1 a 3 horas.

Esterilización por Radiación

La esterilización por radiación puede emplear radiación electromagnética 25 o de partículas. La radiación electromagnética, comprendida por fotones de

energía, incluye radiación ultravioleta, gamma, rayos x y radiación cósmica. La radiación gamma, emitida por materiales radiactivos tales como cobalto 60 o cesio 137, es la que se usa más frecuentemente como fuente de esterilización electromagnética. La radiación de partículas más ampliamente empleada en la
5 esterilización es la radiación de partículas beta o electrones.

Esterilización por Filtración

La esterilización por filtración es un proceso que mata, pero no destruye, los microorganismos de un fluido. Tal filtración es un procedimiento de elección para soluciones que son inestables con otros tipos de procedimientos de
10 esterilización.

Secado por Congelación en Esterilidad (Liofilización)

Este procedimiento emplea filtración esterilizante con la etapa posterior de separación del fármaco esterilizado de la solución por sublimación de la solución después de que la misma se haya congelado, dejando detrás la
15 sustancia del fármaco. Este procedimiento comprende típicamente las siguientes etapas:

- 1) disolver la masa del fármaco en solución acuosa.
- 2) esterilizar la solución por filtración con membrana
- 3) cargar la solución esterilizada en viales pre-esterilizados abiertos y ponerlos
20 en una cámara de secado por congelación
- 4) congelar la solución en los viales
- 5) evacuar la cámara para sublimar el hielo a baja temperatura.
- 6) aumentar la temperatura a la temperatura ambiente o por encima para eliminar el agua residual.

Secado por Congelación en Esterilidad (Liofilización) con adición de agua estéril (vapor)

Este procedimiento emplea filtración esterilizante con las etapas posteriores de separación del fármaco esterilizado de la solución por secado por congelación (liofilización), y adición de agua estéril en forma de vapor.

Precipitación en Esterilidad

Este procedimiento emplea filtración esterilizante con la etapa posterior de precipitación del fármaco esterilizado de la solución. Más específicamente, una masa del fármaco se disuelve primero en agua a una elevada temperatura (por encima de la temperatura ambiente), la solución calentada se filtra después en condiciones asépticas para eliminar cualquier microorganismo, y la solución filtrada se enfría después para precipitar el fármaco de la solución. El fármaco precipitado se separa después de la solución por filtración o centrifugación, y se carga en recipientes por carga en polvo en condiciones asépticas. Para que esta carga en polvo sea práctica, el fármaco debe tener buenas propiedades de flujo -el polvo generalmente debe ser granular, no cristalino y de tamaño de partícula uniforme.

Una composición farmacéutica para administración parenteral incluye dalbavancina y un diluyente fisiológicamente aceptable tal como agua estéril o desionizada, para inyección, solución salina fisiológica, dextrosa al 5%, disolvente miscible con agua (por ejemplo, alcohol etílico, polietilenglicol, propilenglicol, etc.), vehículo no acuoso (por ejemplo aceite tal como aceite de maíz, aceite de la semilla del algodón, aceite de cacahuete y aceite de sésamo), u otros diluyentes habitualmente usados. La formulación puede incluir adicionalmente un agente solubilizante tal como polietilenglicol, polipropilenglicol

105

u otros agentes solubilizantes conocidos, tampones para estabilizar la solución (por ejemplo citratos, acetatos y fosfatos) y/o antioxidantes (por ejemplo ácido ascórbico o bisulfito sódico). (Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.143.739). Otros vehículos farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Como se sabe en la técnica, las preparaciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar también para que contengan niveles aceptables de partículas (por ejemplo, libres de partículas) y para que no sean pirogénicos (por ejemplo, cumpliendo los requisitos de un inyectable de la Farmacopea de Estados Unidos).

En una realización, se proporciona una composición farmacéutica disolviendo una dosis seca (por ejemplo liofilizada) de dalbavancina, que a menudo contiene un estabilizador o una mezcla de estabilizadores, en una cantidad de agua y preferiblemente agua desionizada en un volumen suficiente para disolver el liofilizado. Típicamente, la cantidad de agua suficiente para la disolución es aproximadamente 10 ml y el pH resultante de la solución de dalbavancina está por encima de 3,0, y aproximadamente de 3,5 a 4,5. Esta solución además se diluye en un diluyente secundario, que a menudo contiene dextrosa al 5%, tal como una cantidad contenida en una bolsa de goteo para administración intravenosa, que aumenta el pH de la solución de dalbavancina a aproximadamente 5 a 5,5. En otra realización, el pH de la solución de dalbavancina en una bolsa de goteo es aproximadamente 4,5. El diluyente secundario puede ser agua desionizada y estéril para inyección. En una realización, el diluyente acuoso es dextrosa al 5%.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral pueden fabricarse en viales estériles que contienen una o más dosis unitarias de dalbavancina en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz como se ha descrito anteriormente, incluyendo opcionalmente un excipiente, en condiciones
5 en las que la eficacia bactericida de la dalbavancina se retiene. La composición puede estar en forma de un polvo seco (por ejemplo, liofilizado). Antes de su uso, el polvo se reconstituye con un diluyente fisiológicamente aceptable y después se retira con una jeringa para administrar a un paciente. Una formulación farmacéutica como se ha descrito anteriormente puede esterilizarse
10 por cualquier medio aceptable incluyendo, por ejemplo procedimientos de esterilización con haz de electrones o radiación gamma, o por filtración en esterilidad.

Una formulación típica para administración parenteral puede incluir dalbavancina a una concentración tal como aproximadamente 0,1 a
15 aproximadamente 100 mg, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg o aproximadamente 2 a aproximadamente 4 mg de dalbavancina por ml de preparación final.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención incluye una mezcla de dalbavancina y uno o más antibióticos
20 adicionales. Preferiblemente, al menos uno de los antibióticos de la mezcla que no es dalbavancina es eficaz (por ejemplo bactericida) frente a una o más especies de bacterias Gram negativas, tal como, por ejemplo, azthreonam, y/o frente a una o más cepas de bacterias Gram positivas frente a las cuales la dalbavancina no es eficaz, tal como, por ejemplo, ilnezolida o daptomicina. La

2025-02-08

mezcla puede incluir también un vehículo farmacéuticamente aceptable como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una o más sustancias estabilizadoras que inhiben la degradación de uno o más de los componentes de dalbavancina a materiales, homólogos o materiales relacionados menos activos o inactivos, por ejemplo, MAG. Como se usa en este documento, "sustancia estabilizadora" o "estabilizante" se refiere a una sustancia que estabiliza el nivel de uno o más componentes constituyentes de dalbavancina, por ejemplo B₀, en la composición. Una "cantidad estabilizadora eficaz" se refiere a una cantidad de un estabilizador suficiente para potenciar la estabilidad a largo plazo de uno o más componentes de una composición de dalbavancina. En algunas realizaciones, una cantidad estabilizadora eficaz puede proporcionarse por una mezcla de dos o más sustancias estabilizadoras, cada una de las cuales sola no está presente en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto estabilizador.

Los ejemplos de estabilizadores incluyen, por ejemplo, sustancias no iónicas tales como azúcares, por ejemplo mono, di o polisacáridos, o derivados de los mismos, alcoholes de azúcares, o polioles. Tales sustancias estabilizadoras incluyen, por ejemplo, manitol, lactosa, sacarosa, sorbitol, glicerol, celulosa, trehalosa, maltosa, rafinosa, dextrosa, dextranos de bajo y alto peso molecular, o mezclas de los mismos.

Además de los azúcares, los estabilizadores pueden ser también aminoácidos. Los aminoácidos estabilizadores incluyen aminoácidos naturales y sintéticos y derivados de aminoácidos. En una realización preferida, los

aminoácidos son glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano y asparagina. Los estabilizadores pueden incluir también ciclodextrinas, amidas cíclicas tales como niacinamida y benzamida, ácido salicílico y sus hidroxilácidos y ésteres *orto*-, *meta*-, *para*-sustituidos.

- 5 Además de la adición de estabilizadores, se descubrió que ajustar el pH de los compuestos aumentaba la estabilidad de la composición. El pH particular de la composición que aumenta o maximiza la estabilidad depende del tipo y cantidad del estabilizador añadido. El pH puede ser preferiblemente aproximadamente 1-7, más preferiblemente 2-6, más preferiblemente 3-5, más
10 preferiblemente 4-5, más preferiblemente aproximadamente 4,5.

- En una realización, la composición farmacéutica incluye una proporción en peso de 1:2 de manitol:dalbavancina. En otra realización, la composición farmacéutica incluye una proporción en peso de 1:1:4 de manitol:lactosa:dalbavancina. Sorprendentemente, se ha encontrado que una
15 combinación de manitol y lactosa proporciona un mayor efecto estabilizador que cualquiera de las sustancias sola. A menudo, el pH de una composición farmacéutica de la invención es, por ejemplo, aproximadamente 3 a aproximadamente 5, por ejemplo aproximadamente 3,5 o aproximadamente 4,5.

- En algunas realizaciones, se pueden emplear uno o más procedimientos
20 para reducir la formación de MAG. Por ejemplo, el secado por congelación de dalbavancina en presencia de una sustancia estabilizadora, tal como manitol y/o lactosa, puede emplearse para reducir la cantidad de MAG formado.

- El almacenamiento de las composiciones de dalbavancina es a menudo a temperaturas más bajas que la ambiental, tal como aproximadamente 5°C, para
25 potenciar la estabilidad.

2022
209

Secado

La retirada de la acetona de productos naturales de alto peso molecular puede ser bastante difícil debido a que puede formar aductos con ellos. Su retirada puede efectuarse en presencia de agua que reemplaza a la acetona en el producto sólido. Además, el proceso de secado de dalbavancina es más delicado debido a la posibilidad de formación de MAG, que depende del pH, temperatura, vacío y tiempo. Para minimizar la formación de MAG y acelerar el procedimiento de secado, se añade o se pulveriza sobre el producto agua con nivel bajo de endotoxinas durante el procedimiento de secado para reemplazar a la acetona. El exceso de agua se reduce más tarde con horas adicionales de secado.

El secado se realiza en vacío (temperatura interna de $<25^{\circ}\text{C}$). Cuando la mayoría de la acetona se ha retirado del producto, se pulveriza aproximadamente un 20% en peso de agua con un bajo nivel endotoxinas sobre el producto sólido y se continúa el secado en las mismas condiciones. Para seguir el procedimiento de secado, se realizan análisis de acetona y de Karl Fischer (K.F.), y se pulveriza agua adicional sobre el producto sólido hasta que la acetona residual es menor del 1,5%.

Estudio 25

20 **Secado a $20-30^{\circ}\text{C}$ a 50 mbar. (5 kPa)**

Este procedimiento se simuló primero en el laboratorio usando un rotavapor. El lote de dalbavancina 027 se secó a 30°C sin adición de agua dando un producto que contenía un 6,4% de MAG y 3,2% de acetona. Se cargaron 126 g de este lote de dalbavancina seco (lote 027, proporción HCl/dalbavancina 1,7 moles/mol) en un matraz de fondo redondo de 1 l y el

210

sólido se pulverizó con 25 ml de agua cada dos horas, manteniendo la temperatura del baño de agua a 20-30°C y el vacío a 50 mbar (5 kPa). Se tomaron muestras de dalbavancina a tiempos específicos y se hicieron análisis de acetona, K.F. y MAG. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 4A.

- 5 Todos los porcentajes de MAG mostrados en esta tabla son la diferencia entre la cantidad real y la cantidad de partida.

2017
214

Tabla 4A

Tiempo h	T °C	P mbar (x 0,1 kPa)	Agua %	Acetona %	Delta MAG %	Agua pulverizada %
0	-	-	1,6	3,2	-	20
2	20-25	50	8,3	2,8	0	20
4	20-25	50	15,6	1,9	0	20
6	20-25	50	23,3	0,9	0	-
8	30	50	22,6	0,56	-	-
10	30	50	21,8	0,43	0	-
12	30	50	20,8	0,22	0	-

Este experimento se completó con algunas horas adicionales de secado a las mismas condiciones, reduciendo el contenido en agua por debajo del 15%.

5 *Secado a 30°C a 10 mbar (1 kPa).*

Se secaron 125 g de dalbavancina lote 027, 6,4% de MAG (% de área de HPLC) a 30°C y 10 mbar (1 kPa) durante 24 horas usando el mismo equipo del experimento previo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4B.

Tabla 4B

Tiempo h	T °C	P mbar (x 0,1 kPa)	KF %	Acetona %	Delta MAG %	Agua pulverizada %
0	-	-	1,6	3,21	-	20

272

2	30	10	13,0	1,09	0	20
4	30	10	15,08	1,18	0	20
6	30	10	16,8	0,02	0	-
24	30	10	8,89	0,02	0	

A partir de estos experimentos de laboratorio, se pudo concluir que el proceso de secado puede simplificarse por la adición de agua al producto sólido. Estos resultados fueron inesperados ya que la degradación de la dalbavancina a

5 MAG es una etapa de hidrólisis, y uno puede esperar que el aumento de agua aumentaría el proceso de degradación. De este modo, la acetona se elimina rápidamente del producto, de ese modo se reduce el tiempo de secado y se evita la formación de MAG adicional. Además, se puede observar (Tabla 4B) que una presión residual inferior dió una reducción significativa del

10 procedimiento de secado. Es también sorprendente que el nivel de acetona se redujera en presencia de una gran cantidad de agua.

Secado de Dalbavancina en Secador centrífugador

La dalbavancina húmeda se puso en un secador centrífugador, DR 216, y se secó a 29-32°C (temperatura externa) con un vacío máximo (<50 mbar (< 5

15 kPa)). Al principio, la temperatura interna disminuyó de 30 a 17-18°C y después, cuando comenzó a aumentar, se tomó una muestra del producto para analizar (17,2% de agua y 9,5% de acetona). En este punto, se pulverizó agua con bajo nivel de endotoxinas (aproximadamente 20% en peso) dentro del secador sobre el producto agitado y se tomaron muestras adicionales en el tiempo para

20 analizar. Después de dos horas, se pulverizó agua con bajo nivel de

endotoxinas de nuevo hasta que la cantidad de acetona fue menor del 0,5%,
(Tabla 4C)

274

Tabla 4C

Temperatura externa 29 - 30°C

Presión = 10 - 15 mbar (1 – 1,5 kPa)

Tiempo h	Peso Kg	Temp. Int	Agua añadida ml (*)	Análisis Nº	Agua %	Acetona %	%Área MAG
0		19,1					0,11
1		17,4					**
2		18,3					**
3		23,5		200201019	17,27	9,52	**
4,5		26,8	500		13,59	4,10	0,13
6,5		28,1	500		19,60	0,61	0,16
8,5		28,1			22,38	0,13	0,12
9,5		28,5			19,86	0,12	0,13
11,5		21,9			17,68	0,09	0,31
15		29,5			14,11	n.d.	0,38

Peso final 2592 g, An. Nº 200201027: agua (KF) 13,93%, acetona 0,12%, MAG
5 0,38%.

(*) el agua se pulverizó en el secador centrifugador después de tomar la muestra.

Comparación del secado en presencia y ausencia de agua

10 Este estudio es una comparación entre el lote de dalbavancina 027 y el procedimiento de secado 027/R realizado en ausencia (lote 027) y presencia de

2022
5/12

agua (027/R). Los lotes de dalbavancina 027 (14,6 kg) y 027/R (8,3 kg) se secaron al vacío a 25-35°C (temperatura interna) usando un secador centrifugador (DR 216). El lote 027 se secó sin adición de agua. En contraste, se pulverizaron cuatro adiciones de 400 ml cada una de agua con bajo nivel
5 endotoxina sobre el lote 027/R. Durante cada secado, se tomaron muestras de dalbavancina a tiempos específicos para analizar. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Para el lote 027, sólo se determinó MAG al final del procedimiento de secado.

Tabla 5

Horas	Lote 027					Lote 027/R					
	Tem (°C)	Pres. (mbar) (x 0,1 kPa)	KF (%)	Acetona (%)	MAG (%)	Tem (°C)	Pres. (mbar) (x 0,1 kPa)	KF (%)	Acetona (%)	MAG (%)	Agua añadida (ml)
0	32	280			0,52(*)	30	171			0,22(*)	
2	29	32									
3	-	-				23	57	16	6,7	0,23	
7	-	-				29	1	7,4	3,94	0,44	400
9	-	-				28,4	2	8	2,6	0,48	400
11	-	-				28	4	10	1,5	0,59	400
12,5	-	-				27	12	13,9	1	0,74	400
16	-	-				27,3	9	12	0,45	0,88	-
17	35	0	5,5	2,9							
18	-	-	-	-		27,5	8	11,5	0,26	0,96	-
26	37,8	-	-	-							
65	35,7	0	1,6	3,1	n.a.						
Análisis N°. 200101408						Análisis N°. 200101944					

276

MAG	6,46%	MAG	1,81%
KF	1,63%	KF	11,86%
Acetona	3,14%	Acetona	0,27%

(*) An. N°. 200101392 (*) An. N°. 200101913

Datos de producción a gran escala

5 A continuación en la Tabla 6 se proporciona un resumen de los procedimientos y de los niveles de MAG entre las campañas a gran escala de 2002 y 2004.

Tabla 6

Campaña	2002			2004		
Lote	020004/R	020005/R	020006	DA204001	DA2040002	DA2040003
% MAG	2,3	0,8	1,7	0,4	0,3	0,3

10 En el procedimiento de 2002, el producto de dalbavancina se seca al vacío a menos de 30°C. A tiempos diversos, se pulveriza agua con bajo nivel de endotoxinas sobre el producto. El secado se continúa hasta que el contenido en acetona es menor del 0,5%.

15 En el procedimiento de 2004, se recupera API dalbavancina por centrifugación, se lava con acetona fría (0-10°C) y se seca al vacío (temperatura interna a <25°C). El MAG es el degradado primario de la dalbavancina y su formación depende de la temperatura. Durante el proceso de secado, se añade agua para desplazar la acetona y lograr por último un contenido en acetona de
20 temperatura en presencia de agua conduce a una cantidad inesperadamente

22/17

inferior de acetona presente (compárese el 0,27% en el Lote 027/R con el 3,14% en el Lote 027), y una cantidad inesperadamente baja del producto de degradación MAG (compárese el 1,81% en el lote 027/R con el 6,46% en el lote 027).

- 5 Por lo tanto, un procedimiento para secar dalbavancina incluye las etapas de adición de agua al producto de dalbavancina para desplazar la acetona. Una cantidad de agua preferida a añadir es aproximadamente el 20% del producto seco final supuesto. Como alternativa, la cantidad de agua puede ser aproximadamente el 15%, como alternativa aproximadamente el 25%, como
- 10 alternativa aproximadamente el 30%, como alternativa aproximadamente el 40%, como alternativa aproximadamente el 45%, como alternativa aproximadamente el 50% del producto seco final supuesto.

- Un procedimiento para secar la dalbavancina puede incluir la etapas de secado del producto de dalbavancina durante aproximadamente 2 horas sin la
- 15 adición de agua a aproximadamente 100 torr (13,33 kPa) y a una temperatura de menos de aproximadamente 25°C. Después se pulveriza agua con bajo nivel de endotoxinas sobre el producto y después se seca el producto durante aproximadamente dos horas más. El nivel de acetona se muestrea y analiza después. Si el nivel es mayor de aproximadamente el 1,5%, se pulveriza agua
- 20 adicional sobre el producto y se seca de nuevo hasta que el nivel de acetona es menor de aproximadamente el 1,5%.

Fabricación

- Todas las operaciones de fabricación de la solución a granel se realizaron en un área de clase 100.000 (Grado D). La carga aséptica tiene lugar en un área
- 25 de flujo de aire laminar de clase 100 (Grado A).

278

- Se carga un recipiente de fabricación adecuado con aproximadamente el 80% del volumen teórico del lote con agua para inyecciones. La solución se mezcla y la temperatura se mantiene entre 15-30°C. Se añade la dalbavancina y se mezcla hasta que se disuelve. Se añade al menos un estabilizador a la
- 5 solución y se mezcla hasta que se disuelve. Se añade el agua para inyección para llevar la solución a un volumen final y se ajusta el pH, si es necesario, con HCl 0,1 N o NaOH 1,0 N hasta un pH apropiado. La solución a granel se esteriliza por filtración a través de dos filtros esterilizantes de 0,2 micrómetros en serie dentro de un recipiente estéril que recibe la solución. (Se puede usar si es
- 10 necesario un prefiltro para ayudar en la claridad del filtro o para reducir la carga de partículas en los filtros esterilizantes). La solución se pone asépticamente dentro de viales de vidrio Tipo I estériles/despirogenados. Se insertan parcialmente tapones de liofilización siliconizados estériles hasta la posición de liofilización y los viales se transfieren a la cámara de liofilización.
- 15 El procedimiento de liofilización se controla usando sondas de termopar para viales representativos. Los viales se congelan a -45°C y se mantienen durante 3 horas, después de lo cual se aplica vacío. La temperatura del compartimiento se ajusta a -25°C. Cuando los termopares están todos a -29°C o más calientes, la temperatura del compartimiento se ajusta a 0°C. Cuando todos
- 20 los termopares están a -5°C o más calientes, la temperatura del compartimiento se ajusta a +30°C. Cuando todos los termopares están a +27°C o más calientes los viales se mantienen durante 14 ± 2 horas. La cámara se restaura a presión atmosférica por la introducción de nitrógeno estéril que ha sido filtrado a través de un filtro de 0,2 micrómetros y los viales se sellan después por hundimiento de

2/2
2/2

los compartimientos de liofilización. Los viales se sacan entonces de la cámara y se aplican precintos de aluminio.

Todos los componentes y equipo se esterilizan por procedimientos apropiados. Los viales se lavan y se esterilizan en un horno de aire caliente a una temperatura no menor de 255°C durante no menos de 3 horas. Los tapones se esterilizan en autoclave al vapor a una temperatura de 123-125°C a una presión de cámara de aproximadamente 227,46 kPa (33 psi). El tiempo de residencia en el intervalo estéril es típicamente de 50-60 minutos.

La validación del procedimiento de esterilización usa la aproximación "sobreesterilización" para los ciclos de esterilización de calor seco y de vapor. Todos los ciclos de esterilización proporcionan una letalidad suficiente para proporcionar al menos una probabilidad de supervivencia microbiana de 10^{-6} sin tener en cuenta los microorganismos de origen natural. Todos los ciclos se diseñaron con letalidades suficientes para proporcionar reducciones no inferiores a 12 log. Los ciclos de calor seco proporcionarán un mínimo de una reducción de endotoxinas de 3 log.

Estudios de estabilidad

Se descubrió que la dalbavancina se descomponía durante el procedimiento de secado por congelación. Se descubrió que la adición de un estabilizador disminuía la cantidad de descomposición del componente activo B_0 durante los estudios de estabilidad.

En las Figuras 1-4 se muestra la estabilidad en el tiempo de diversas formulaciones liofilizadas de dalbavancina a 25°C y 40°C. Según las directrices de FDA, un producto que es estable durante tres a seis meses a 40°C se supone que es estable durante dos años a temperatura ambiente. Las Figuras

24
20

1A, 2A, 3A y 4A muestran la disminución en la cantidad del componente de dalbavancina B₀, que es uno de los componentes de dalbavancina activos bactericidamente. Como se ha analizado anteriormente, el componente B₀ es también uno de los componentes principales de la mayoría de las composiciones de dalbavancina. Las Figuras 1B, 2B, 3B y 4B muestran el aumento en la cantidad de MAG, un componente menos activo que se piensa que es un producto de descomposición de uno o más de los otros componentes de dalbavancina. La Tabla 7 enumera las composiciones de cada una de las formulaciones usadas en los estudios de estabilidad, los resultados de los cuales se muestran en las Figuras 1-4. Cualquiera de estas composiciones se podría usar para producir una forma de dosificación estable, estéril y libre de partículas.

Tabla 7. Composiciones de diversas formulaciones de dalbavancina.

Composición	Dalbavancina (mg/vial)	Manitol (mg/vial)	Lactosa (mg/vial)	pH
A	250	62,5	—	3,4
B	250	—	—	3,69
C	250	62,5	—	3,80
D	250	—	—	3,01
E	250	62,5	—	3,01
F	250	—	—	4,5
G	250	62,5	—	4,5
H	250	62,5	—	5,3
I	250	125	—	5,0
J	250	62,5	—	5,0

221. 24

K	250	125	—	4,5
L	250	62,5	—	4,5
M	250	62,5	62,5	4,5
N	250	—	125	4,5
O	250	125	—	3,3

Como se ve en las Figuras 1B y 2B, a $T=0$, hay todavía una cantidad significativa (mayor del 4%) de MAG presente en la Composición D, que contiene dalbavancina sin otros componentes que no sean dalbavancina y a la que no se le ha ajustado el pH (pH aproximadamente de 3,01), a 25°C y 40°C, respectivamente. A temperaturas más altas, aumenta la formación de MAG a una velocidad mucho mayor. Después de 3 y 6 meses a 40°C, la Composición D tenía un 21,0% de MAG y 23,7% de MAG, respectivamente (véase la Figura 2B). Esto implica que la dalbavancina pura es altamente inestable, y que simplemente el secado por congelación de la dalbavancina resulta en degradación significativa. Además, el secado normal también da como resultado la formación del producto de degradación MAG. Se requiere el almacenamiento a -20°C para algunas formulaciones de dalbavancina.

Cuando aumenta el pH, sin la adición de ningún otro componente no dalbavancina, la estabilidad aumenta. A la composición D no se le ajustó el pH y tenía un pH de aproximadamente 3,01. La composición B se ajustó a pH 3,69. La composición F se ajustó a pH 4,5. Como se ve en las Figuras 1A y 2A, según aumentaba el pH, había menos degradación inicial de B_0 y menos degradación general con el tiempo. De manera análoga, en las Figuras 1B y

2B, había menos formación de MAG en las composiciones que se ajustaron a un pH más alto, tanto inicialmente como en el tiempo a ambas temperaturas.

Se demostró también que la adición de manitol aumentaba la estabilidad de la dalbavancina de forma significativa. La degradación del factor B_0 y el aumento de MAG con el tiempo también se redujo de manera significativa en comparación con la Composición D, a la que tampoco se le ajustó el pH ni contenía manitol. Como se ve en la Composición E (62,5 mg de manitol, aproximadamente pH 3,01), incluso sin ningún ajuste del pH, había una mejora significativa en la estabilidad, tanto en el procedimiento inicial de secado por congelación como con el tiempo. A tiempo $T=0$, hay aproximadamente un 2% de MAG presente a $T=25^\circ\text{C}$ (véase la Figura 1A) y $T=40^\circ\text{C}$ (véase la Figura 2A), que es menos de la mitad de la cantidad de MAG presente en la Composición D a $T=0$.

Según aumentaba el pH y la cantidad de manitol se mantenía constante, la estabilidad de la dalbavancina también aumentó. Una comparación de las composiciones E, C y G ilustra que, según aumentaba el pH de aproximadamente 3,01 a 3,8 a 4,5, la cantidad de degradación de la dalbavancina también disminuyó. Como se ve en las Figuras 1A y 2A, según aumentaba el pH, había menos degradación inicial de B_0 y menos degradación general con el tiempo. De manera análoga, en las Figuras 1B y 2B, había menos formación de MAG en las composiciones que se ajustaron a un pH más alto, tanto inicialmente como con el tiempo.

El aumento de la cantidad de manitol, mientras se mantiene constante el pH, también resultó en un aumento de la estabilidad. Por ejemplo, aunque los compuestos L y K, que contienen 62,5 mg y 125 mg de manitol a pH 4,5,

5
23

respectivamente, tienen cantidades similares de B_0 a $T=0$, el cambio en el porcentaje de B_0 después de 12 meses fue significativamente menor para el compuesto K. Un patrón similar puede observarse para los compuestos J e I, que contienen 62,5 mg y 125 mg de manitol a pH 5,0, respectivamente.

5 Aunque el cambio del pH de las composiciones que contienen solo manitol resultó en cambios en la cantidad de degradación de B_0 , no existía una tendencia predecible. Los compuestos L, J, y H contienen 62,5 mg de manitol a pH 4,5, 5,0 y 5,3 respectivamente. Los cambios en el porcentaje de B_0 después de 12 meses fueron 1,0, 1,2 y 0,7, respectivamente, a 25°C. Los compuestos O,
10 K e I contienen 125 mg de manitol a pH 3,3, 4,5 y 5,0 respectivamente. Los cambios en el porcentaje de B_0 para estas composiciones después de 12 meses fueron 0,5, 0,1 y 0,3, respectivamente, a 25°C. Notablemente, después de 2 meses a 40°C, la cantidad del componente B_0 disminuyó sólo en un 1,9 % en el compuesto O y en un 1,0% en el compuesto M (véase la Figura 4A).

15 Aunque el cambio en el porcentaje de B_0 para el compuesto O (125 mg de manitol, pH 3,3) es similar a las otras diferencias encontradas para las composiciones que contienen 125 mg de manitol (véase las composiciones I y K), como se ve en la Figura 3A, la cantidad de degradación inicial de B_0 a $T=0$ es significativamente menor para el compuesto O (88,3% de B_0). Esto es
20 especialmente el caso cuando se compara con el compuesto K (pH 4,5) y el compuesto I (pH 5,0), que tienen 85,3% de B_0 y 85,5% de B_0 respectivamente. Las diferencias entre la cantidad de B_0 presente y la cantidad de MAG presente en el compuesto O (véase las Figuras 3A y 3B) pueden explicarse más probablemente por el hecho de que, como se explicó previamente, B_0 no es el
25 único componente de la dalbavancina que se degrada para formar MAG.

972
724

La lactosa también parece que es un estabilizador adecuado de la dalbavancina. Para el Compuesto N, que contiene 125 mg de lactosa a pH 4,5, el cambio en el porcentaje de B₀ después de 12 meses fue de solo 0,6 a 25°C. Después de 2 meses a 40°C, el cambio en el porcentaje de B₀ fue de sólo 1,4.

- 5 La lactosa sola, sin embargo, no parece que estabilice la dalbavancina tan bien como el manitol. A pH 4,5, el componente B₀ del compuesto K (125 mg de manitol) sólo disminuyó en 1,0 después de 2 meses a 40°C.

- La combinación de manitol y lactosa también parece que estabiliza la dalbavancina y se prefiere particularmente. La lactosa y el manitol tienen
- 10 propiedades estabilizadoras similares. El manitol, sin embargo, es un diurético. Por lo tanto, en una realización preferida, la cantidad de manitol se minimiza. El compuesto M contiene manitol y lactosa, 62,5 mg de cada uno. Como se ve en la Figura 3A, el cambio en el porcentaje de MAG a los 12 meses a 25°C fue sólo 0,6. Además, como se ve en la Figura 4A, la cantidad de MAG sólo
- 15 aumentó en un 2,1% después de 3 meses a 40°C. Esto es menor degradación que la vista para los compuestos N (125 mg de lactosa) y K (125 mg de manitol), que muestran ambos un aumento en la cantidad de MAG de 2,9% después de 3 meses a 40°C. Fue inesperado que una combinación de la mitad de cada una de las cantidades de manitol y lactosa usados en otras formulaciones condujera a
- 20 un mayor aumento en la estabilidad de la dalbavancina.

En las Tablas 8A-D a continuación se muestran datos adicionales de estabilidad para dalbavancina estabilizada con manitol y lactosa a aproximadamente pH 4,5 para diversas temperaturas.

Tabla 8A. Estabilidad de Dalbavancina para inyección Lote 554399 a 40°C/75% RH (humedad relativa) (vial de 500 mg, manitol y lactosa, pH 4,5)

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)			
	0	1	3	6
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	95,4	95,7	92,2	91,6
Distribución de componentes				
(A ₀ + A ₁)	2,6	2,5	2,4	2,5
B ₀	87,0	86,0	85,4	84,9
(B ₁ + B ₂)	5,8	6,2	6,3	6,4
Degradantes				
MAG	1,0	1,5	1,9	2,2
Máximo individual Inespecífico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Degradantes totales	1,0	1,5	1,9	2,2
Tiempo de reconstitución	115	57	47	55
Apariencia de la solución	Solución transparente a amarilla pálida	Solución transparente a amarilla pálida	Solución transparente a amarilla pálida	Solución transparente a amarilla pálida
Materia particulada				
Partículas ≥10 micrómetros	Cumple USP	—	—	—

226-248

Partículas ≥25 micrómetros	Cumple USP	—	—	—
Humedad	0,4	0,5	0,5	0,6
pH de la solución reconstituida	4,3	4,6	4,5	4,5
Esterilidad	Cumple USP	—	—	—

n.d. no detectado

— no analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad.

Tabla 8B. Estabilidad de Dalbavancina para inyección Lote 554399 a 30°C/65%

5 RH (humedad relativa) (vial de 500 mg, manitol y lactosa, pH 4,5)

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)					
	0	1	3	6	9	12
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	95,4	97,3	94,2	93,7	94,0	93,8
Distribución de componentes						
(A ₀ + A ₁)	2,6	2,5	2,5	2,5	2,4	2,4
B ₀	87,0	86,2	85,8	85,3	86,7	85,9
(B ₁ + B ₂)	5,8	6,2	6,4	6,5	5,5	6,4
Degradantes						
MAG	1,0	1,1	1,3	1,5	1,7	1,7
Máximo Individual	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,1	n.d.

27222

Inespecífico						
Degradantes totales	1,0	1,1	1,3	1,5	1,8	1,7
Tiempo de reconstitución	115	148	53	40	37	49
Apariencia de la solución	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido
Materia particulada						
Partículas ≥10 micrómetros	Cumple USP	–	–	–	–	–
Partículas ≥25 micrómetros	Cumple USP	–	–	–	–	–
Humedad	0,4	0,4	0,4	0,5	0,8	0,5
pH de la solución reconstituida	4,3	4,5	4,5	4,4	4,5	4,5
Esterilidad	Cumple USP	–	–	–	–	–

n.d. no detectado

– No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad.

23

Tabla 8C. Estabilidad de Dalbavancina para inyección Lote 554399 a 25°C/ 60% RH (vial de 500 mg, manitol y lactosa, pH 4,5)

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)				
	0	3	6	9	12
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	95,4	94,6	93,2	93,9	92,8
Distribución de componentes					
(A ₀ + A ₁)	2,6	2,5	2,5	2,5	2,4
B ₀	87,0	86,0	85,9	87,0	86,2
(B ₁ + B ₂)	5,8	6,4	6,3	5,7	6,4
Degradantes					
MAG	1,0	1,2	1,2	1,4	1,4
Máximo individual Inespecífico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Degradantes totales	1,0	1,2	1,2	1,4	1,4
Tiempo de reconstitución	115	55	68	54	50
Apariencia de la solución	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido
Materia					

27
229

particulada					
Partículas ≥10 micrómetros	Cumple USP	—	—	—	Cumple USP
Partículas ≥25 micrómetros	Cumple USP	—	—	—	Cumple USP
Humedad	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5
pH de la solución reconstituida	4,3	4,5	4,5	4,6	4,6
Esterilidad	Cumple USP	—	—	—	Cumple USP

n.d. no detectado

— No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad.

5 **Tabla 8D. Estabilidad de Dalbavancina para inyección Lote 554399 a 5°C (vial de 500 mg, manitol y lactosa, pH 4,5)**

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)				
	0	3	6	9	12
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	95,4	94,7	92,7	93,7	93,4
Distribución de componentes					
(A ₀ + A ₁)	2,6	2,5	2,5	2,5	2,4
B ₀	87,0	86,2	86,1	87,6	86,9
(B ₁ + B ₂)	5,8	6,4	6,3	5,7	6,4
Degradantes					

230
822

MAG	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9
Máximo individual Inespecífico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Degradantes totales	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9
Tiempo de reconstitución	115	90	88	75	72
Apariencia de la solución	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido
Materia particulada					
Partículas ≥10 micrómetros	Cumple USP	—	—	—	Cumple USP
Partículas ≥25 micrómetros	Cumple USP	—	—	—	Cumple USP
Humedad	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4
pH de la solución reconstituida	4,3	4,5	4,5	4,5	4,6
Esterilidad	Cumple USP	—	—	—	Cumple USP

n.d. no detectado

— No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad.

Los datos de estudios de estabilidad a largo plazo posteriores se muestran en las Tablas 9-11. Las muestras se analizaron por HPLC en fase inversa utilizando un gradiente de fase móvil binaria y un sistema de detección

23

UV para determinar la estabilidad de la formulación de dalbavancina. El contenido de dalbavancina se determinó usando un patrón de referencia externo. El porcentaje de distribución de los componentes de la dalbavancina se calculó comparando el área de cada componente individual con el área total de todos los componentes principales del fármaco. El porcentaje de distribución de impurezas se calculó comparando cada área de impureza individual con el área total cromatográfica.

Las muestras se analizaron con el ensayo por HPLC, bioensayo, contenido en agua, límites microbianos, pH, distribución por HPLC o impurezas totales. Los resultados se muestran en las Tablas 9-11. Los datos de estabilidad para el Lote 025 se muestran en las Tablas 9A, 10A y 11A, que tienen un 1,5% de MAG a T=0. Los datos de estabilidad para el Lote 020005/R se muestran en las Tablas 9B, 10B y 11B, que tienen un 0,8% de MAG a T=0, como resultado de un procedimiento de secado diferente que se describe a continuación.

La dalbavancina demostró buena estabilidad durante el almacenamiento a -20°C (véase las Tablas 9A-B), sin cambios significativos en el bioensayo, ensayo por HPLC, distribución por HPLC o impurezas totales. El pH se mantuvo sin cambios y se observó un ligero aumento en el contenido en agua.

Se observó degradación durante 36 meses a 5°C (véase la Tabla 10A) como se evidencia por un aumento en el contenido en MAG de aproximadamente un 2,9% y una correspondiente disminución en el factor B₀ de aproximadamente 3,6%. No se observó una tendencia en las impurezas totales y el bioensayo y el pH permanecieron esencialmente sin cambios. Se vieron resultados similares para el Lote 020005 (véase la Tabla 10B)

Se observó una degradación más extensa durante el almacenamiento a

2324

25°C durante 12 meses (véase la Tabla 11A) con un incremento en MAG de aproximadamente 10,2% y una disminución en el factor B₀ de aproximadamente 8,5%. Los niveles de otros factores, sustancias relacionadas y pH permanecieron sin cambios. El contenido en agua aumentó en 5 aproximadamente un 1,6%.

Tabla 9A. Datos de estabilidad para el Lote de dalbavancina no formulado 025 a -20°C (pH 3,5)

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
Apariencia física	—	—	—	—	—	—	—	—
Ensayo HPLC (base libre, anhidra, % en peso)	92,0	93,3	90,1	88,6	88,4	91,1	89,6	90,3
Distribución de Componentes (HPLC % AUC)								
A ₀ + A ₁	4,0	4,0	4,0	4,0	3,9	3,9	3,9	3,8
B ₀	83,4	83,5	82,1	82,9	84,4	83,8	83,5	82,7
B ₁ + B ₂	7,5	7,4	8,1	8,0	7,4	7,3	7,5	7,9
Sustancias relacionadas (HPLC %AUC)								
MAG	1,5	1,5	1,3	1,6	1,3	1,5	1,4	1,2
Máximo individual inespecífico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Impurezas totales	5,1	5,1	5,8	5,2	4,3	4,9	5,2	5,6
Humedad (% en peso)	11,0	13,3	12,1	12,6	12,1	12,8	12,2	14,2
pH	3,0	2,9	3,0	2,9	2,9	2,9	2,9	2,8
Límites microbianos*	<10, <10	—	—	—	—	—	—	—

233

	ufc/g							
--	-------	--	--	--	--	--	--	--

– no analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad

* Recuento aeróbico total, recuento total combinado de mohos y levaduras.

5 **Tabla 9B. Datos de estabilidad para el Lote de dalbavancina no formulado 020005/R a -20°C**

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)					
	0	3	6	9	12	18
Apariencia física	Polvo blanco a marrón	Polvo blanco a marrón	Polvo blanco a marrón	Polvo blanco a marrón	Polvo blanco a marrón	Polvo blanco a marrón
Ensayo HPLC (base libre, anhidra, % en peso)	92,0	94,4	92,5	94,6	91,0	92,1
Distribución de Componentes (HPLC %AUC)						
A ₀ + A ₁	2,5	2,5	2,5	2,5	2,4	2,5
B ₀	87,1	87,5	86,7	86,6	86,5	87,3
B ₁ + B ₂	6,2	5,6	6,2	6,2	6,6	5,9
Sustancias relacionadas (HPLC %AUC)						
MAG	0,8	0,9	0,9	0,8	0,9	0,9
Máximo individual inespecífico	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
Impurezas totales	4,3	4,5	4,6	4,7	4,4	4,4
Humedad (% en peso)	18,2	20,1	20,1	20,3	20,0	19,6

226
232

pH	2,4	2,5	2,4	2,5	2,5	2,6
Límites microbianos*	2,1 ufc/g	—	—	—	—	—

—No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad

* Recuento aeróbico total, recuento total combinado de mohos y levaduras.

Tabla 10A. Datos de estabilidad para el Lote de dalbavancina no formulado 025 a 5°C.

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
Apariencia física	—	—	—	—	—	—	—	—
Ensayo HPLC (base libre, anhidra, % en peso)	92,0	91,0	90,3	91,8	90,5	89,3	88,2	87,3
Distribución de Componentes (HPLC %AUC)								
A ₀ + A ₁	4,0	4,0	3,9	3,9	3,8	3,9	3,8	3,7
B ₀	83,4	83,1	81,3	81,8	83,3	82,2	81,3	79,8
B ₁ + B ₂	7,5	7,4	7,9	7,7	7,2	7,2	7,2	7,5
Sustancias relacionadas (HPLC %AUC)								
MAG	1,5	1,8	2,0	2,5	2,8	3,3	3,8	4,4
Máximo individual inespecífico	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
Impurezas totales	5,1	5,5	6,9	6,5	5,7	6,7	7,7	9,0
Humedad (% en peso)	11,0	12,3	11,8	13,2	15,0	14,8	14,9	17,6

227
235

pH	3,0	3,0	3,0	2,9	2,9	2,9	2,9	2,8
Límites microbianos*	<10, <10 ufc/g	—	—	—	<1, 3 ufc/g	—	<1, 1 ufc/g	<1, <1 ufc/g

— No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad.

* Recuento aeróbico total, recuento combinado total de mohos y levaduras.

Tabla 10B. Datos de estabilidad para el Lote de dalbavancina no formulado
5 020005/R a 5°C.

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)					
	0	3	6	9	12	18
Apariencia física	Polvo blanco a marrón	Polvo blanco a marrón	Polvo blanco a marrón	Polvo blanco a marrón	Polvo blanco a marrón	Polvo blanco a marrón
Ensayo HPLC (base libre, anhidra, % en peso)	92,0	92,0	91,7	91,8	89,2	89,7
Distribución de Componentes (HPLC %AUC)						
A ₀ + A ₁	2,5	2,5	2,5	2,4	2,4	2,3
B ₀	87,1	87,1	85,6	85,3	84,6	84,3
B ₁ + B ₂	6,2	5,6	6,2	6,1	6,4	5,5
Sustancias relacionadas (HPLC %AUC)						
MAG	0,8	1,5	1,9	2,1	2,6	4,1
Máximo individual Inespecífico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3

228
222
226

Impurezas totales	4,3	4,9	5,8	6,3	6,6	7,9
Humedad (% en peso)	18,2	17,4	17,2	18,4	15,4	14,2
pH	2,4	2,5	2,4	2,5	2,5	2,5
Límites microbianos*	2,1 ufc/g	–	–	–	<1, <1 ufc/g	–

–No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad

* Recuento aeróbico total, recuento total combinado de mohos y levaduras.

5 **Tabla 11A. Datos de estabilidad para el Lote de dalbavancina no formulado 025 a 25°C/ 60% RH**

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)				
	0	1	3	6	12
Apariencia física	–	–	–	–	–
Ensayo HPLC (base libre, anhidra, % en peso)	92,0	90,9	87,0	85,2	78,8
Distribución de Componentes (HPLC %AUC)					
A ₀ + A ₁	4,0	3,9	3,8	3,7	3,4
B ₀	83,4	81,6	79,5	76,3	74,9
B ₁ + B ₂	7,5	7,4	7,0	7,3	6,3
Sustancias relacionadas (HPLC %AUC)					
MAG	1,5	3,6	6,0	8,1	11,7
Máximo individual inespecífico	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3
Impurezas totales	5,1	7,1	9,6	12,7	15,4
Humedad (% en peso)	11,0	11,3	12,1	12,9	12,6

237

pH	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Límites microbianos*	<10, <10 ufc/g	–	–	–	1, <1 ufc/g

– No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad.

* Recuento aeróbico total, recuento total combinado de mohos y levaduras.

Tabla 11B. Datos de estabilidad para el Lote de Dalbavancina no formulado

5 020005/R a 25°C/ 60% RH

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)			
	0	1	3	6
Apariencia física	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco
Ensayo HPLC (base libre, anhidra, % en peso)	92,0	91,2	87,2	83,3
Distribución de Componentes (HPLC % AUC)				
A ₀ + A ₁	2,5	2,5	2,3	2,3
B ₀	87,1	84,9	82,3	78,7
B ₁ + B ₂	6,2	5,3	5,3	5,8
Sustancias relacionadas (HPLC %AUC)				
MAG	0,8	3,8	6,1	8,2
Máximo individual inespecífico	0,2	0,2	0,3	0,7
Impurezas totales	4,3	7,3	10,1	13,2
Humedad (% en peso)	18,2	15,2	13,8	12,8
pH	2,4	2,6	2,5	2,5
Límites microbianos*	2,1 ufc/g			

– No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad

* Recuento aeróbico total, recuento combinado total de mohos y levaduras.

Se realizaron también análisis de esterilidad del producto esterilizado. Se analizó en las muestras la apariencia de la torta y la solución, el tiempo de reconstitución, pH, ensayo de HPLC, bioensayo, contenido en agua, esterilidad, distribución de HPLC y sustancias relacionadas. Los resultados se muestran en las Tablas 12-14.

El producto liofilizado muestra buena estabilidad cuando se almacena a 5°C con solo cambios menores en el ensayo por HPLC o la distribución por HPLC (véase las Tablas 12A y B). Al aumentar la temperatura (véase las Tablas 13 y 14), hay una disminución en el factor B_0 con un aumento correspondiente en MAG. Los otros factores no parece que estén afectados por la temperatura. La apariencia del producto y el pH no parecen que estén afectados por la temperatura. Tampoco es posible determinar una tendencia clara en el tiempo de reconstitución, considerando que la inspección visual del producto solubilizado puede requerir algunos segundos.

739

Tabla 12A. Estabilidad del lote de Dalbavancina para inyección 149570 a 5°C (lío­filizado, manitol, pH 3,5)

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	97,3	99,8	100,7	100,2	100,0	100,2	99,3	104,4
Distribución de componentes								
(A ₀ + A ₁)	3,6	3,6	3,6	3,7	3,6	3,6	3,7	3,7
B ₀	79,4	79,6	80,3	80,1	80,0	80,1	80,0	81,3
Post B ₀ *	12,8	12,3	11,3	11,6	11,6	11,7	11,6	10,6
Degradantes								
MAG	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7
Tiempo de reconstitución	80	45	40	45	40	40	41	68
Apariencia de la solución	Solución transparente a amarillo	Solución transparente a amarillo	Solución transparente a amarillo	Solución transparente a amarillo	Solución transparente a amarillo	Solución transparente a amarillo	Solución transparente a amarillo	Solución transparente a amarillo

235

	pálido	pálido	pálido	pálido	pálido	pálido	pálido	pálido
Materia particulada								
Partículas ≥10 micrómetros	—	—	—	—	—	—	—	—
Partículas ≥25 micrómetros	—	—	—	—	—	—	—	—
Humedad	0,8	1,4	1,2	nd	1,1	1,8	1,5	1,3
pH de la solución reconstituida	3,7	3,5	3,5	3,5	3,5	3,4	3,4	3,5
Esterilidad	Estéril	—	—	—	Estéril	—	Estéril	Estéril

— No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad

* Análisis realizado con el procedimiento de desarrollo de HPLC. La dalbavancina B₁ y B₂ no se resolvieron con este procedimiento.

EE

Tabla 12B. Estabilidad del Lote de dalbavancina para inyección 442378 a 5°C (liofilizado, manitol, pH 3,5)

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)					
	0	3	6	9	12	18
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	101,8	102,9	100,8	99,9	101,4	99,4
Distribución de componentes						
(A ₀ + A ₁)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
B ₀	85,7	85,5	85,8	85,3	85,3	85,5
(B ₁ + B ₂)	5,5	5,8	5,8	5,7	6,2	5,7
Degradantes						
MAG	1,7	1,8	1,8	1,7	1,7	1,9
Máximo Individual Inespecífico	n.d.	n.d.	0,1	n.d.	n.d.	n.d.
Degradantes totales	1,7	1,8	1,8	1,7	1,7	1,9
Tiempo de	75	48	43	43	32	32

25

reconstitución						
Apariencia de la solución	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido
Materia particulada						
Partículas ≥10 micrómetros	Cumple USP	—	—	—	Cumple USP	—
Partículas ≥25 micrómetros	Cumple USP	—	—	—	Cumple USP	—
Humedad	0,3	0,3	0,4	0,7	0,4	0,6
pH de la solución reconstituida	3,4	3,4	3,4	3,2	3,4	3,3
Esterilidad	Esteril	—	—	—	Esteril	—

n.d. no detectado

— No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad

09

Tabla 13A. Estabilidad del Lote de dalbavancina para inyección 149570 a 25°C/ 60% RH (liofilizado, manitol, pH 3,5)

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)					
	0	1	3	6	9	12
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	97,3	99,4	98,3	100,3	99,7	98,7
Distribución de componentes						
(A ₀ + A ₁)	3,6	3,7	3,6	3,6	3,6	3,7
B ₀	79,4	81,0	79,3	80,0	79,7	78,9
Post B ₀ *	12,8	10,6	12,1	11,1	10,9	11,6
Degradantes						
MAG	0,6	0,8	1,1	1,3	1,8	1,8
Tiempo de reconstitución	90	50	45	45	30	40
Apariencia de la solución	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido
Materia particulada						

23

Partículas ≥10 micrómetros	–	–	–	–	–	–
Partículas ≥25 micrómetros	–	–	–	–	–	–
Humedad	0,8	nd	1,6	1,4	nd	1,6
pH de la solución reconstituida	3,7	3,6	3,6	3,5	3,5	3,5
Esterilidad	Estéril	–	–	–	–	Estéril

– No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad

* Análisis realizado con el procedimiento de desarrollo de HPLC. La dalbavancina B₁ y B₂ no se resolvieron con este procedimiento.

Tabla 13B. Estabilidad del Lote de dalbavancina para inyección 442378 a 25°C/ 60% RH (lío­filizado, manitol, pH 3,5)

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)					
	0	3	6	9	12	18
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	101,8	103,9	100,2	98,8	100,7	98,0
Distribución de componentes						
(A ₀ + A ₁)	2,5	2,5	2,4	2,5	2,4	2,5
B ₀	85,7	85,0	85,5	84,4	84,3	83,9
(B ₁ + B ₂)	5,5	5,8	5,4	5,7	6,1	5,8
Degradantes						
MAG	1,7	2,3	2,4	2,8	2,9	3,5
Máximo individual inespecífico	n.d.	n.d.	0,2	n.d.	n.d.	0,1
Degradantes totales	1,7	2,3	2,5	2,8	2,9	3,6
Tiempo de reconstitución	75	45	38	33	25	31

Apariencia de la solución	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido
Materia particulada						
Partículas ≥10 micrómetros	Cumple USP	–	–	–	Cumple USP	–
Partículas ≥25 micrómetros	Cumple USP	–	–	–	Cumple USP	–
Humedad	0,3	0,7	0,8	0,7	0,7	0,8
pH de la solución reconstituida	3,4	3,4	3,4	3,3	3,4	3,4
Esterilidad	Estéril	–	–	–	Estéril	–

n.d. no detectado.

– No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad.

~~258~~

Tabla 13C. Estabilidad del lote de dalbavancina para inyección 442378 a 30°C/ 85% RH (liofilizado, manitol, pH 3,5).

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)					
	0	1	3	6	9	12
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	100,0	98,5	99,7	100,0	95,3	98,8
Distribución de componentes						
(A ₀ + A ₁)	2,5	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
B ₀	88,3	85,8	84,7	84,3	83,2	83,0
(B ₁ + B ₂)	5,5	5,5	5,7	5,9	6,3	5,8
Degradantes						
MAG	1,7	2,1	2,5	3,0	3,5	4,2
Máximo individual inespecífico	0,1.	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Degradantes totales	1,8	2,3	2,9	3,3	3,8	4,5
Tiempo de reconstitución	45	55	31	27	48	28
Apariencia de la solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución	Solución

259

	transparente a amarillo pálido	transparente a amarillo pálido	transparente a amarillo pálido	transparente a amarillo pálido	transparente a amarillo pálido	transparente a amarillo pálido
Materia particulada						
Partículas ≥10 micrómetros	Cumple USP	–	–	–	–	–
Partículas ≥25 micrómetros	Cumple USP	–	–	–	–	–
Humedad	0,5	0,7	0,9	0,7	0,9	0,9
pH de la solución reconstituida	3,5	3,6	3,3	3,4	3,3	3,3
Esterilidad	Estéril	–	–	–	–	–

– No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad.

749

Tabla 14A. Estabilidad del lote de dalbavancina para inyección 149570 a 40°C/ 75% RH (lío­filizado, manitol, pH 3,5).

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)			
	0	1	3	6
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	97,3	98,6	94,7	95,1
Distribución de componentes				
(A ₀ + A ₁)	3,6	3,7	3,5	3,5
B ₀	79,4	79,8	77,1	76,5
Post B ₀ *	12,8	10,5	11,9	10,7
Degradantes				
MAG	0,6	2,0	3,7	5,5
Tiempo de reconstitución	90	55	45	40
Apariencia de la solución	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido
Materia particulada				
Partículas ≥10 micrómetros	—	—	—	—
Partículas ≥25 micrómetros	—	—	—	—
Humedad	0,8	n.d.	2,0	1,7
pH de la solución reconstituida	3,7	3,5	3,6	3,5
Esterilidad	Estéril	—	—	—

— No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad.

150 22

* Análisis realizado con procedimiento de desarrollo por HPLC. La dalbavancina B₁ y B₂ no se resolvieron con este procedimiento.

Tabla 14B. Estabilidad del lote de dalbavancina para inyección 442378 a 40°C/
5 75% RH (liofilizado, manitol, pH 3,5).

ANÁLISIS	TIEMPO (MESES)			
	0	1	3	6
Apariencia física	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido	Sólido blanco a blanquecino a amarillo pálido
Ensayo HPLC	101,8	101,5	98,6	91,8
Distribución de componentes				
(A ₀ + A ₁)	2,5	2,4	2,4	2,2
B ₀	85,7	84,2	82,0	80,6
(B ₁ + B ₂)	5,5	5,8	5,6	5,2
Degradantes				
MAG	1,7	3,2	5,3	6,8
Máximo individual inespecífico	n.d.	0,3	0,2	0,5
Degradantes totales	1,7	3,8	5,6	7,4
Tiempo de reconstitución	75	46	46	41
Apariencia de la solución	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido	Solución transparente a amarillo pálido
Materia particulada				
Partículas ≥10	Cumple USP			

151 2

micrómetros		—	—	—
Partículas ≥25 micrómetros	Cumple USP	—	—	—
Humedad	0,3	0,6	0,8	0,8
pH de la solución reconstituida	3,4	3,4	3,4	3,4
Esterilidad	Estéril	—	—	—

n.d. no detectado.

— No analizado en este punto temporal, por protocolo de estabilidad.

Fotoestabilidad

5 Se evaluó también la fotoestabilidad de la dalbavancina para inyección (viales de 500 mg) en viales etiquetados. Se introdujeron 10 viales etiquetados dentro de una cámara de fotoestabilidad, junto con un control oscuro consistente en 10 viales etiquetados envueltos en papel de aluminio. Las muestras a analizar se expusieron a no menos de 1,2 millones de lux horas y a una energía
10 integrada en el ultravioleta cercano de no menos de 200 watios horas/metro². Se evaluó la apariencia de las muestras, la apariencia de la solución, el pH, la humedad y el ensayo de HPLC. Los resultados de esta evaluación se representan en la Tabla 15.

15 TABLA 15. Resultados inmediatos del paquete de fotoestabilidad del producto del fármaco 500 mg/vial.

Análisis	Resultados	
	Expuestos a la luz	Control oscuro
Apariencia	Sólido blanco a blanquecino	Sólido blanco a blanquecino
Apariencia de la solución	Solución amarilla	Solución amarilla

15/11/24

	pálida	pálida
Ensayo (anhidro, base libre)	91,8%	92,8%
Contenido en humedad	0,3%	0,3%
pH	4,5	4,5
Tiempo de reconstitución (seg.)	43,	68
Distribución de componentes (% AUC)		
- A ₀	0,7%	0,7%
- A ₁	1,7%	1,8%
- B ₀	86,0%	86,2%
- B ₁	4,2%	4,3%
- B ₂	1,9%	2,0%
Sustancias relacionadas (% AUC)		
- C ₀	0,3%	0,3%
- C ₁	0,1%	0,1%
- D ₀	0,2%	0,2%
- D ₁	0,3%	0,3%
- IsoB ₀	0,9%	1,0%
- MAG	1,2%	1,1%
- Tricloro	0,5%	0,5%
- RRT 0,85	0,1%	n.d.
Impurezas Totales (% AUC)	5,4%	5,0%

n.d. no detectado.

La comparación entre las muestras expuestas a la luz y las muestras control oscuras muestra que las muestras expuestas a la luz permanecen de manera comparable, con ligeros cambios en potencia, niveles de componentes

153/2

API e impurezas totales.

Las muestras expuestas a la luz demostraron la presencia de un nivel muy bajo de una impureza inespecífica a RRT 0,85, que no fue detectada en las muestras de control oscuras. La evaluación de este componente por HPLC/EM
5 ha indicado que es el derivado monoclorado de los homólogos de la dalbavancina B.

En base a estos resultados, la dalbavancina para inyección se considera fotoestable en su empaquetado inmediato.

Eficacia mejorada y efectos secundarios reducidos

10 Las dosis semanales de dalbavancina a niveles de dosificación altos (es decir, resultando en niveles en el suero sorprendentemente altos y duraderos) muestran un perfil de seguridad sorprendentemente bueno, similar a, o mejor que el observado con la terapia convencional de dosis más bajas de antibióticos convencionales administrados diariamente o incluso 2-4 veces al día, como se
15 demuestra en los Ejemplos en este documento. Puede administrarse una dosis sorprendentemente alta de dalbavancina (es decir, resultando en niveles en el suero sorprendentemente altos y duraderos), con menos frecuencia que otros antibióticos y sin efectos secundarios adversos, posibilitando una eficacia mejorada y una conformidad del paciente.

20 Como se discute en el Ejemplo 1, el tratamiento con dalbavancina resulta en una baja incidencia de acontecimientos adversos. Los acontecimientos adversos graves incluyen cualquier experiencia adversa del fármaco que ocurra a cualquier dosis y que resulte en muerte, peligro de muerte, hospitalización o prolongación de la hospitalización, o discapacidad o incapacidad persistente o
25 significativa. En la prueba de Fase II descrita en el Ejemplo 1, el 90% de las

reacciones adversas, tales como diarrea, náusea, hiperglucemia, dolor de extremidades, vómitos y estreñimiento, fueron de leves a moderados en su gravedad. El uso de la dalbavancina en la prueba en el Ejemplo 1 resultó en acontecimientos adversos no graves en relación con el tratamiento del fármaco de estudio.

Kits

La invención proporciona también kits para usar en procedimientos de tratamiento o profilaxis de infecciones bacterianas. Los kits incluyen una composición farmacéutica de la invención, por ejemplo que incluya al menos una dosis unitaria de dalbavancina, e instrucciones que proporcionan información a un profesional de la salud con respecto a su uso para tratar o prevenir una infección bacteriana. Las instrucciones pueden proporcionarse en forma impresa o en forma de un medio electrónico tal como un disco flexible, CD, o DVD, en la forma de una dirección de página web donde se pueden obtener tales instrucciones. A menudo, una dosis unitaria de dalbavancina incluye una dosificación tal que cuando se administra a un individuo, se mantiene en el individuo un nivel terapéutica o profilácticamente eficaz de dalbavancina en el plasma durante al menos 5 días. En algunas realizaciones, un kit incluye dos dosis unitarias para administrarse separadas al menos por 5 días, a menudo aproximadamente separadas por una semana, a menudo incluyen una primera dosis de dalbavancina que es aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3 veces mayor que la segunda dosis. La dalbavancina se incluye a menudo como una composición farmacéutica acuosa estéril o una composición de polvo seco (por ejemplo, liofilizado).

Se proporciona un empaquetado adecuado. Como se usa en este

155

documento, "empaquetado" se refiere a una matriz sólida o un material usado normalmente en un sistema y capaz de mantener dentro de límites fijados una composición de dalbavancina adecuada para administrar a un individuo. Tales materiales incluyen botellas de vidrio y plástico (por ejemplo, polietileno, polipropileno y policarbonato), viales, envoltorios de papel, plástico, y papel de plástico laminado y similares. Si se emplean técnicas de esterilización por haces de electrones, el empaquetado debe tener densidad suficientemente baja para permitir la esterilización de los contenidos.

Los kits pueden también incluir opcionalmente equipamiento para la administración de la dalbavancina, tal como, por ejemplo, jeringuillas o equipamiento para la administración intravenosa, y/o una solución estéril, por ejemplo un diluyente tal como dextrosa al 5%, para preparar una composición de polvo seco (por ejemplo liofilizado) para la administración.

Los kits de la invención pueden incluir, además de la dalbavancina, un antibiótico que no sea dalbavancina o una mezcla de antibióticos que no sean dalbavancina, para usarlos con la dalbavancina tal como se ha descrito en los procedimientos anteriores.

En los ejemplos de a continuación, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Si una abreviatura no está definida, tiene su significado generalmente aceptado.

AcOH	= ácido acético
AcONa	= acetato de sodio
ac.	= acuoso
AST	= aspartato amino transferasa
ALT	= Alanina amino transferasa

156 27

	BV	= volumen del lecho
	CV	= coeficiente de variación
	d	= diámetro
	D	= dalton
5	DCC	= diciclohexilcarbodiámina
	DMEPA	= 3-(dimetilamino)-propilamina
	DMSO	= dimetilsulfonamida
	eq	= equivalentes
	UE	= unidades de endotoxina
10	g	= gramos
	CG	= cromatografía de gases
	HCl	= ácido clorhídrico
	H₂O	= agua
	HOBT	= 1-hidroxibenzotiazol hidrato
15	HPLC	= cromatografía líquida de alta resolución
	H₂SO₄	= ácido sulfúrico
	IPA	= isopropilamina
	UI	= unidad internacional
	KF	= fluoruro de potasio
20	Kg	= kilogramo
	l	= litro
	CL/EM/EM	= cromatografía líquida/espec. de masas/espec. de masas
	LDH	= lactato deshidrogenasa.
25	LSC	= recuento por centelleo de líquido

154 f

	m ³	= metro cúbico
	MeOH	= metanol
	mg	= miligramo
	ml	= mililitro
5	mol	= molar
	PM	= peso molecular
	N	= normal
	NaOH	= hidróxido de sodio
	NMP	= N-metil-2-pirrolidona
10	DTC	= distribución de tejido cuantitativa
	Rt	= tiempo de retención
	dt	= desviación típica
	TEA	= trietilamina

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar pero no a limitar la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Eficacia y seguridad de Dalbavancina una vez a la semana en infecciones de la piel profundas y tejidos blandos.

Este estudio aleatorio y controlado evaluó la seguridad y la eficacia de dos regímenes de dosis de dalbavancina. Los pacientes adultos con infecciones de la piel y tejidos blandos (SSTI) que implican a estructuras profundas de la piel o que requieren intervención quirúrgica se distribuyen aleatoriamente en tres grupos: El brazo de estudio 1 recibió 1100 mg de dalbavancina por vía de inyección intravenosa (IV) en el día 1, el brazo del estudio 2 recibió 1 g de dalbavancina IV el día 1 y 500 mg de dalbavancina IV en el día 8; el brazo de

estudio 3 recibió la "norma de tratamiento". Se analizaron la respuesta clínica y microbiológica y los acontecimientos adversos.

Poblaciones de análisis

Había 62 pacientes aleatorizados en el estudio, todos recibieron al menos una dosis de la medicación de estudio. Se evaluaron en cuatro poblaciones de estudio la seguridad y eficacia y se definieron como sigue: la población destinada a tratar (DT) incluye todos los pacientes que recibieron al menos una dosis del fármaco de estudio (todos los sujetos de estudio aleatorizados). La población destinada a tratar microbiológicamente (MDT) eran todos pacientes DT que tenían un patógeno Gram positivo confirmado en cultivo como línea basal. La población evaluable clínicamente se definió como aquellos que 1) satisfacían todos los criterios de entrada del estudio, 2) no tenían cambios en la terapia antimicrobiana para la infección Gram positiva a partir del día 4, excepto para la terapia oral de disminución por etapas (solo aplicado al grupo norma de tratamiento), 3) volvieron para la visita de seguimiento (VS) de valoración (a menos que hubiera un fallo del tratamiento), 4) no recibieron un antimicrobiano concomitante no aprobado en el protocolo (a menos que falle el tratamiento). La población evaluable microbiológicamente fue el subconjunto de pacientes evaluables clínicamente que tenían un patógeno Gram positivo confirmado por cultivo como línea basal (inicialmente).

Las poblaciones de estudio se muestran en la Tabla 16.

1598

Tabla 16. Poblaciones de estudio para el tratamiento SSTI de la dalbavancina.

Poblaciones	Brazo de estudio 1 1100 mg de dalbavancina el día 1	Brazo de estudio 2, 1000 mg de dalbavancina el día 1, 500 mg el día 8	Brazo de estudio 3 "Norma de Tratamiento"
DT aleatorizada	20	21	21
Tratada	20 (100%)	21 (100%)	21 (100%)
Estudio completado	18/20 (90%)	20/21 (95,2%)	21/21 (100%)
Evaluada clínicamente en FDT	16/20 (80%)	17/21 (81%)	21/21 (100%)
Evaluada clínicamente en VS	13/20 (65%)	17/21 (81%)	21/21(100%)
MDT	14/20 (70%)	13/21 (61,9%)	14/21 (66,7%)
Microevaluado en FDT	13/20 (65%)	11/21 (52,4%)	14/21 (66,7%)
Microevaluado en VS	11/20 (55%)	11/21 (52,4%)	14/21 (66,7%)

DT- destinado a tratar

MDT- subconjunto de población DT con infección Gram positiva confirmada con
5 cultivo.

FDT- fin de tratamiento

VS- visita de seguimiento.

La edad media de los sujetos era de 50-55 años (con un intervalo de 18 a 86 años). No había diferencias aparentes en la edad a través de los brazos de estudio. Había diferencias en género a través de los brazos de tratamiento, pero en general el estudio inscribió números iguales de hombres y mujeres. La población de pacientes era predominantemente caucásicos. Estos resultados eran consistentes para ambas poblaciones DT y evaluables clínicamente.

Se inscribieron 62 pacientes, 20 en el brazo de estudio 1 y 21 en cada brazo de estudio 2 y 3. Los comparadores más comunes para la norma de tratamiento fueron la clindamicina, ceftriaxona, vancomicina y cefazolina. La duración media del tratamiento en el brazo de estudio 3 fue de 15 días.

Patógenos de la línea basal y susceptibilidad

De los 62 pacientes DT, el 66% (14 de dosis única de dalbavancina, 13 de dos dosis de dalbavancina, 14 de norma de tratamiento) tuvieron una preterapia de patógenos Gram positivos aislados (población MDT). El patógeno más común fue *S. aureus*. La distribución de patógenos en la línea basal se muestra en la Tabla 17.

167

Tabla 17. patógenos Gram positivos en la línea basal e intervalo de Dalbavancina MIC para la población MDT.

Número con patógenos (MIC)	Dosis Individual de Dalbavancina (1100 mg) (N=14)	Dos dosis de Dalbavancina (1000/500 mg) (N=13)	Regímenes norma de tratamiento (N=14)
Todo <i>S. aureus</i>	13 (0,12)	11 (0,12)	10 (0,016-0,25)
Sensible a meticilina	7	6	8
Resistente a meticilina	6	5	2
<i>Streptococos</i> grupo B	0	2 (0,016)	2 (0,016)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	1 (0,016)	1 (0,016)
<i>Streptococcus</i> variado y cepas no tipificables	3 (0,016)	2 (0,016)	4 (0,016)

Respuestas clínica y microbiológica

5 La eficacia de los tres regímenes de tratamiento se determinó por análisis de la respuesta clínica de los pacientes y las respuestas microbiológicas presumidas o documentadas. El punto final de la eficacia primaria era la respuesta clínica en la visita de seguimiento para la población evaluable clínicamente. La respuesta clínica, para visitas FDT y VS, se categorizó como

10 éxito (cura o mejora) o fracaso (incluyendo resultados indeterminados). Los

162

pacientes clasificados como éxitos no deben haber recibido tratamiento antibacteriano sistémico adicional para su infección. El fracaso se definió como la persistencia de uno o más signos locales o sistémicos y síntomas de SSTI tales que se requiera tratamiento con nuevos o adicionales agentes antibacterianos sistémicos para la SSTI.

El resultado microbiológico, una variable de eficacia secundaria, se analizó en la subpoblación de pacientes que tenían SSTI documentada microbiológicamente (es decir, al menos un patógeno de línea basal identificado). Se analizó una respuesta microbiológica para cada patógeno Gram positivo identificado en la línea basal (es decir, erradicación, erradicación supuesta, persistencia, persistencia presumida). Para pacientes para los cuales no se realizaron cultivos de seguimiento, las respuestas microbiológicas para los patógenos de la línea basal se presumieron en la base de la respuesta clínica. La respuesta microbiológica por paciente en las visitas FDT y VS se calificó como éxito (es decir, todos los organismos Gram positivos erradicados o presuntamente erradicados) o fracaso (es decir, al menos un organismo Gram positivo persistía, o presuntamente persistía, patógenos múltiples con erradicación parcial). En ambas visitas FDT y VS, se analizó la colonización y la sobreinfección. En la visita VS, una respuesta bacteriológica de un paciente pudo también incluir recurrencia.

Eficacia clínica

Las tasas de éxitos clínicos se muestran en la Tabla 18. En la población evaluable clínicamente, el 61,5% de los pacientes con la dosis única de dalbavancina, el 94,1% con las dos dosis de dalbavancina y el 76,2% del grupo de norma de tratamiento se clasificaron como éxitos en el momento de la

163

valoración VS. En un subanálisis exploratorio de aquellos pacientes categorizados con SSTI profunda o complicada en la línea basal, la terapia de dos dosis de dalbavancina proporcionó también una tasa más alta de éxitos clínicos (93,8%), comparado con la dosis única de dalbavancina y las terapias de norma de tratamiento, 58,3% y 73,7%, respectivamente.

Se encontraron tasas de éxito similares en ambas valoraciones FDT y VS en las poblaciones de apoyo DT y en la evaluable microbiológicamente con una tendencia consistente hacia una respuesta más favorable siguiendo el tratamiento con dos dosis de dalbavancina (Tabla 17). Para la población MDT, las tasas de éxitos clínicos en la valoración VS para aquéllos con *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) fueron del 50% (3/6) para dosis única de dalbavancina, 80% (4/5) para dos dosis de dalbavancina, y 50% (1/2) para los pacientes tratados con un régimen de norma de tratamiento.

Tabla 18. Tasas de éxitos clínicos para la población de análisis y el grupo de tratamiento.

Población	Dosis individual de Dalbavancina (1100 mg)	Dos dosis de Dalbavancina (1000/500 mg)	Regímenes norma de tratamiento
DT en FDT	15/20 (75,0)	19/21 (90,5)	17/21 (81,0)
DT en VS	12/20 (60,0)	19/21 (90,5)	16/21 (76,2)
MDT en FDT	10/14 (71,4)	12/13 (92,3)	10/14 (71,4)
MDT en VS	7/14 (50,0)	12/13 (92,3)	9/14 (64,3)
Clinicamente evaluable en VS	13/16 (81,5)	16/17 (94,1)	17/21 (81,0)

164

Clinicamente evaluable en FDT	8/13 (61,5)	16/17 (94,1)	16/21 (76,2)
Microbiológicamente evaluable en FDT	10/13 (76,9)	10/11 (90,9)	10/14 (71,4)
Microbiológicamente evaluable en VS	6/11 (54,5)	10/11 (90,9)	9/14 (64,3)

Eficacia microbiológica

Las tasas de éxitos de los diferentes regímenes de tratamiento con respecto a patógenos diferentes se muestra en la Tabla 19. Para la población evaluable microbiológicamente, las tasas de erradicación/presunta erradicación en la valoración VS para todos los organismos fue de 58,3% (7/12) para dosis única de dalbavancina, 92,3% (12/13) para dos dosis de dalbavancina y 70,6% (12/17) para pacientes en el grupo de norma de tratamiento. Para aislados que persistían, no había cambios en la dalbavancina MIC. En la VS, las tasas de erradicación de *S. aureus* fueron mayores para el grupo de dos dosis de dalbavancina (90%) comparado con el grupo de la dosis única de dalbavancina (50%) y el tratamiento de norma de tratamiento (60%). Se observaron resultados similares en la población MDT, el grupo de dos dosis de dalbavancina erradicaron el 80% de los aislados de MRSA (Tabla 19)

Tabla 19. Tasas de éxitos por patógeno para la población DT microbiológicamente en la valoración VS.

	Dosis individual de Dalbavancina (1100 mg)	Dos dosis de Dalbavancina (1000/500 mg)	Regímenes norma de tratamiento
--	--	---	-----------------------------------

165

Organismos totales	7/16 (43,8%)	14/16 (87,5%)	12/17 (70,6%)
Todo <i>S. aureus</i>	5/13 (38%)	9/11 (82%)	6/10 (60%)
Sensibles a meticilina	2/7 (29%)	5/6 (83%)	5/8 (63%)
Resistentes a meticilina	3/6 (50%)	4/5 (80%)	1/2 (50%)
Especies de estreptococos variadas	2/3 (67%)	4/4 (100%)	5/7 (71%)

Para las poblaciones evaluable microbiológicamente y MDT, las tasas de éxito microbiológico en la FDT y VS se resumen en la Tabla 20. Se informó de tasas de éxitos microbiológicos comparables en ambas visitas para pacientes

5 tratados con dos dosis de dalbavancina y los regímenes de norma de tratamiento (aproximadamente 64% a 77%) mientras que aquellos tratados con una dosis individual de dalbavancina presentaron tasas de éxito inferiores. Las

tasas de éxito microbiológico en la FDT/VS en la población evaluable microbiológicamente fueron paralelas a los resultados de respuesta clínica:

10 38,5%/27,3% para dosis única de dalbavancina, 72,7%/72,7% para dos dosis de dalbavancina, y 71,4%/64,3% para la terapia de norma de tratamiento. Se observaron resultados similares para la población MDT (datos no mostrados).

Tabla 20. Tasas de éxitos microbiológicos

1668
92

	Dosis Individual de Dalbavancina (1100 mg)	Dos dosis de Dalbavancina (1000/500 mg)	Regímenes norma de tratamiento
Población MDT			
FDT	5/14 (35,7)	10/13 (76,9)	10/14 (71,4)
VS	3/14 (21,4)	9/13 (69,2)	9/14 (64,3)
Población evaluable microbiológicamente			
FDT	5/13 (38,5)	8/11 (72,7)	10/14 (71,4)
VS	3/11 (27,3)	8/11 (72,7)	9/14 (64,3)

Análisis de farmacocinética

Se obtuvieron 5 ml de sangre en el día 8 de los pacientes aleatorizados en los grupos de tratamiento con dalbavancina para determinar las concentraciones en el plasma de dalbavancina. En los pacientes aleatorizados para recibir una dosis de 500 mg de dalbavancina en el día 8, la sangre se obtuvo justo antes de la administración de la segunda dosis. Se obtuvieron muestras de 5 ml de sangre adicionales en los días 10 y 24 en los pacientes aleatorizados al grupo de dosis única de dalbavancina y en los días 20 y 34 en aquéllos que recibieron dos dosis de dalbavancina.

Las concentraciones de dalbavancina en el plasma se determinaron usando procedimientos de cromatografía líquida validada y espectrometría de masas. El límite inferior de cuantificación fue de 500 ng/ml para el plasma.

Las concentraciones medias de dalbavancina recolectadas en los días de

1678

estudio 8, 10, y 24 en el régimen de dosis únicas fue $31,1 \pm 7,1$, $25,2 \pm 4,8$ y $10,2 \pm 3,5$ mg/l (media $\pm$ dt), respectivamente. Las concentraciones de dalbavancina siguiendo el régimen de dos dosis en los días de estudio 8 (antes de la segunda dosis), 20, y 34 fueron $30,4 \pm 8,2$, $21,2 \pm 10,0$, y $9,0 \pm 4,4$ mg/l, respectivamente. Como se esperaba, todos los pacientes tenían concentraciones de dalbavancina mayores de 20 mg/l en la primera semana siguiente a la primera dosis, y los niveles por encima de 20 mg/l se mantuvieron durante una semana adicional con una dosis adicional de 500 mg IV en el día 8. Generalmente, las concentraciones bactericidas mínimas son aproximadamente 4 a 10 mg/l.

Evaluación de la seguridad

En cada paciente que recibió al menos una dosis del fármaco de estudio (población DT) se evaluó la seguridad del fármaco por el control de acontecimientos adversos (AA), incluyendo resultados anormales de análisis del laboratorio clínico y signos vitales. Los AA se valoraron por el investigador con respecto a su gravedad (leve, moderada, grave, amenazante para la vida), y por la relación con el fármaco de estudio (no relacionado, probablemente no relacionado, posiblemente relacionado o probablemente relacionado).

En la Tabla 21 se presenta un resumen de los datos AA. La mayoría de las reacciones adversas (90%) se consideraron de leves a moderadas en gravedad. Todas las reacciones adversas serias (8 acontecimientos en 5 pacientes) no estaban relacionados con el Tratamiento con el fármaco de estudio. Aproximadamente un 59% de todos los pacientes de los que se informó al menos un AA emergente del tratamiento (19 en grupo dosis única de dalbavancina individual, 16 en el grupo dos dosis de dalbavancina, 21 en el

163/10

grupo norma de tratamiento) experimentaron un acontecimiento que fue categorizado por el investigador como posiblemente o probablemente relacionado con el fármaco de estudio. Específicamente, se informó de AA relacionados con el fármaco en 11 pacientes (55%) del grupo de dosis única de dalbavancina, 10 pacientes (48%) del grupo de dos dosis de dalbavancina, y 12 pacientes (57%) del grupo de norma de tratamiento. Los AA relacionados con el fármaco de los que se informó más frecuentemente en los grupos de tratamiento de dalbavancina y de norma de tratamiento fueron diarrea y náusea. En la Tabla 22 se presenta un resumen de los tipos de AA observados en los diferentes grupos de tratamiento.

Ningún paciente tratado con dalbavancina tuvo que interrumpir el tratamiento prematuramente debido a un AA. Tres pacientes de los 21 (14%) de acuerdo con un régimen norma de tratamiento interrumpieron el tratamiento debido a un AA, incluyendo un paciente que desarrolló urticaria el día 1 que probablemente estaba relacionada con el fármaco y dos pacientes que tenían AA no relacionados con el fármaco de estudio (sobreinfección con *P. aeruginosa* y nivel de vancomicina elevado).

Tabla 21. Resumen de los datos de acontecimientos adversos (AA)

	Dosis Individual de Dalbavancina (N=20)	Dos dosis de Dalbavancina (N=21)	Regímenes norma de tratamiento (N=21)
≥ 1 AA	95%	76,2%	100%
%AA graves	15%	9,5%	4,8%

169 268

≥ 1 AA posible/probablemente relacionado con el tratamiento	55%	48%	57%
AA que lleva a la interrupción de la medicación de estudio	0%	0%	14,3%
≥ 1 AA grave	2 (10%)	2 (9,5%)	1 (4,8%)

170 26

Tabla 22. Acontecimientos adversos más comunes

	Dosis individual de Dalbavancina (N=20)	Dos dosis de Dalbavancina (N=21)	Regímenes norma de tratamiento (N=21)
Diarrea	20%	9,5%	28,6%
Nauseas	10%	28,6%	9,5%
Hiperglucemia	5%	14,3%	19%
Dolor de extremidades	10%	9,5%	9,5%
Vómitos	10%	14,3%	4,8%
Estreñimiento	5%	4,8%	14,3%

Análisis

Este ensayo de Fase II, de etiqueta abierta y aleatorizado, muestra que la
5 dalbavancina es eficaz para el tratamiento de adultos con SSTI. La mayoría de
los pacientes inscritos tenían infecciones profundas o complicadas (>90%) e
infecciones que requerían intervención quirúrgica (~70%), mientras que
aproximadamente el 45% tenían diabetes mellitus subyacente.

Las dosis cada dos semanas de dalbavancina tuvieron una tasa de
10 respuesta clínica numéricamente más alta que las dosis únicas de dalbavancina
o la el régimen de norma de tratamiento. Los datos de las poblaciones DT y
evaluable clínicamente sugieren que un régimen de dos dosis de dalbavancina
inyectables semanales secuenciales (1000 mg, 500 mg semanalmente) es
eficaz en el tratamiento de SSTI. El grupo norma de tratamiento se trató durante

771 \$

una duración media de 13 días. En el seguimiento, el 94% de los pacientes evaluables clínicamente tratados con dos dosis de dalbavancina se consideraron éxitos clínicos frente al 76% de aquellos a los que se les dio un régimen de norma de tratamiento y al 61,5% de los pacientes que recibieron una
5 dosis única de dalbavancina.

S. aureus fue el organismo más frecuentemente aislado en la línea basal. En este ensayo, aproximadamente el 83% de los pacientes se infectaron con *S. aureus* y el 38% de todas las cepas de *S. aureus* fueron MRSA. La mayoría de las infecciones (80%) fueron causados por un único patógeno. La MIC para la
10 dalbavancina frente a los aislados Gram positivos, incluyendo MRSA, varió de 0,016 a 0,25 mg/l.

Las tasas de éxitos microbiológicos eran paralelas a aquellas de la respuesta clínica para la población evaluable clínicamente. Para todos los organismos combinados, el tratamiento con el régimen de dalbavancina de dos
15 dosis semanales proporcionó tasas de erradicación más altas en la valoración a las 2 semanas posteriores a la terapia (92%) comparadas con las terapias de dosis única de dalbavancina (58%) y norma de tratamiento (71%). En general, tasas de erradicación de *S. Aureus* se observaron en el 90%, 50% y 60% de los pacientes, respectivamente. Para la población MDT, las tasas de erradicación
20 para MRSA fueron el 80% para el régimen de dos dosis de dalbavancina frente al 50% tanto de la terapia de dosis única como de la terapia norma de tratamiento.

Las concentraciones de dalbavancina obtenidas al final de los periodos de tratamiento de dosis única y de dos dosis semanales (día 10 o día 20,
25 respectivamente) fueron similares, sugiriendo poca acumulación del fármaco

17264

después de la segunda dosis semanal. La tasa superior de éxito clínico observada con el régimen de dos dosis sugiere muerte dependiente del tiempo en la que los niveles mantenidos del fármaco o la exposición al fármaco se proporcionaron con dos dosis de dalbavancina separadas por una semana. Los niveles de dalbavancina en el plasma medidos al final del intervalo de dosis semanal eran sustancialmente mayores del MIC₉₀ informado para patógenos responsables de la mayoría de las SSTI (<0,03 a 0,5 mg/l), incluyendo aquellos encontrados en este ensayo. Estos niveles estaban también por encima de las concentraciones bactericidas mínimas de 4 a 10 mg/l.

- 10 La tasa general de reacciones adversas fue similar para ambos regimenes de dalbavancina y el grupo norma de tratamiento. Se informó más comúnmente de acontecimientos adversos gastrointestinales relacionados con el fármaco (es decir, diarrea y nauseas) a través de los tres grupos de tratamiento. La mayoría de estos acontecimientos fueron leves y auto-limitados.
- 15 Ningún paciente tratado con dalbavancina se eliminó del estudio prematuramente debido a una reacción adversa, ni se informó de ninguna reacción adversa grave atribuible a los glicopéptidos, sin embargo el 14% del grupo norma de tratamiento se eliminó debido a acontecimientos adversos. El nuevo régimen de dosificación por lo tanto había reducido los efectos
- 20 secundarios adversos en comparación con la norma de tratamiento. Los datos de este ensayo no encontraron pruebas de que la dalbavancina induzca ningún grado de hepatotoxicidad o nefrotoxicidad clínicamente significativa.

- El régimen de dos dosis de dalbavancina parece eficaz para el tratamiento de pacientes con SSTI complicada. La dalbavancina a ambas dosis
- 25 se toleró bien en este ensayo clínico, con un perfil de acontecimientos adversos

similar al del grupo norma de tratamiento.

Ejemplo 2. Eficacia y seguridad de una dosis semanal de Dalbavancina en el tratamiento de infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéteres (CR-BSI)

5 Este estudio evaluó la seguridad y eficacia (clínica y microbiológica) de un régimen de una dosis semanal de dalbavancina en el tratamiento de adultos con infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéteres (CR-BSI) debido a patógenos bacterianos Gram positivos, en relación con el tratamiento norma de tratamiento, vancomicina.

10 **Metodología**

Los pacientes con CR-BSI debidas a patógeno(s) Gram positivos conocidos o sospechosos que cumplan los criterios de inclusión/exclusión se aleatorizaron a uno de los dos brazos de tratamiento en este estudio de etiqueta abierta, comparativo y multicentro. La dalbavancina se administró una vez
15 semanalmente y el comparador (vancomicina) se administró diariamente. Se requirió la retirada del catéter en pacientes con infección de *Staphylococcus aureus*; la gestión del catéter se dejó a la discreción del investigador en pacientes con infección de estafilococos coagulasa negativos (CoNS). La eficacia se basó clínicamente en la mejora o resolución de los signos clínicos y
20 síntomas de la CR-BSI tales que no garantizasen antibacterianos adicionales, y microbiológicamente se basaron en la erradicación o presencia de los patógenos de la línea basal de otros patógenos. Se evaluaron también las concentraciones de dalbavancina en el plasma y la seguridad.

Población de análisis

25 Se planearon aproximadamente 80 pacientes (40 para cada brazo de

tratamiento 1 y 3); se analizaron 67 pacientes (33 en dalbavancina semanal y 34 en vancomicina). Siete (7) pacientes de dalbavancina diario se incluyeron en los análisis de seguridad sólo. Setenta y cinco pacientes (75) se aleatorizaron y 74 se trataron en 13 lugares de los Estados Unidos; 64 pacientes completaron el estudio. Las características demográficas eran generalmente similares a través de los brazos de estudio. La edad media de los pacientes en el tratamiento de la dalbavancina semanal era de 54 años (intervalo de 20-78 años) y en el de la vancomicina era de 57 años (intervalo de 19-85 años). Hombres y mujeres estaban igualmente representados de forma general; había ligeramente más hombres en la dalbavancina semanal y más mujeres en la vancomicina. La mayoría de los pacientes eran caucásicos (>65%), se categorizaron como que tenían CR-BSI probable, y tenían catéteres no-tunelados. Para la población DT microbiológica, los patógenos más comunes para ambos brazos de tratamiento fueron CoNS y *S. aureus*. De los *S. aureus* aislados, 5/11 (45,4%) y 9/12 (75,0%) se identificaron como resistentes a metilicina (MRSA) para los brazos de estudio 1 y 3, respectivamente.

Diagnóstico y criterios principales de inclusión

Se incluyeron pacientes con bacteremia Gram positiva documentada definida como al menos un cultivo de sangre positivo para *S. aureus*, o al menos dos cultivos de sangre positivos para todos los otros organismos (con al menos uno de los cultivos de una muestra sacada de forma percutánea). Además, se inscribieron también pacientes que cumplieran todos los demás criterios de inclusión, y también cumplieran cada una de las dos condiciones enumeradas a continuación.

1. Al menos dos de los siguientes signos de bacteremia:

TSX

temperatura central $>38,0^{\circ}\text{C}$ o $<36,0^{\circ}\text{C}$, medida en el recto, boca (se añade $0,5^{\circ}\text{C}$ a la temperatura medida), tímpano o por un catéter central, recuento WBC $> 12.000/\text{mm}^3$ ó $< 4.000/\text{mm}^3$ o recuento diferencial mostrando $>10\%$ de formas de banda; taquicardia (velocidad de pulso >100 lpm); taquipnea (velocidad respiratoria >20 respiraciones/minuto); hipotensión transitoria (presión sistólica de la sangre <90 mm Hg).

2. No existe fuente aparente para la manifestación clínica de la bacteremia que no sea otra que el catéter (puede haber signos locales y síntomas en el sitio del catéter).

10 Tratamiento

El tratamiento duró 14 días para pacientes con infección de *S. aureus*, y 7 a 14 días para todos los otros patógenos. Debido a la larga semi-vida de la dalbavancina, la duración de la terapia del fármaco de estudio se asumió que era de 7 días para cada dosis de dalbavancina dada en dalbavancina semanal.

15 La dalbavancina se administró de forma intravenosa con una carga de dosis de 1000 mg en el día 1 y 500 mg en el día 8. La vancomicina se administró de forma intravenosa con una dosis de 1000 mg cada 12 horas (o se ajustó la dosis en base a los niveles del fármaco).

Criterios para la evaluación

20 La eficacia se evaluó en base a las respuestas clínicas y microbiológicas. El parámetro de resultado primario fue la respuesta general en la visita de análisis de cura (TOC) en la población destinada a tratar (DT) microbiológica. La seguridad se evaluó por la recolección y análisis de datos de acontecimientos adversos (AA), análisis de laboratorio clínico, exámenes físicos, signos vitales y

25 ECG. Las concentraciones de dalbavancina en el plasma se determinaron hasta

7768

en siete ocasiones (antes y después de la primera dosis en el día 1, en el día 4
± 2 días, antes y después de la segunda dosis en el día 8, al final del tratamiento
(FDT) y en el TOC. Debido a la eliminación del brazo 2 durante el estudio, sólo
se describen los datos demográficos y de seguridad de esos pacientes; la
5 eficacia no se evaluó.

Procedimientos estadísticos

Los datos de eficacia, seguridad y concentración de dalbavancina se
presentan usando estadística descriptiva. Para el análisis de la eficacia primaria,
se determinaron también intervalos de confianza del 95%, y para análisis del
10 factor de pronóstico usando la variable de eficacia primaria, se usó la regresión
logística.

Resultados de eficacia

En el análisis de eficacia primaria, la respuesta general en la población
DT microbiológica en TOC, los pacientes que recibieron dalbavancina
15 semanalmente (87,0%, IC del 95%: 73,2, 100,0) tuvieron una tasa de éxito más
alta que los pacientes que recibieron vancomicina (50,0%, 95% CI: 31,5, 68,5).

En el análisis de eficacia secundaria, el éxito total, el éxito clínico y el
éxito clínico y general por patógeno, por categoría de infección, por estado del
catéter en la línea basal y por tipo de catéter en las poblaciones DT
20 microbiológica y evaluable en el FDT y TOC fueron más altos en el brazo de
estudio de la dalbavancina comparado con el brazo de estudio de la
vancomicina. El éxito microbiológico por paciente fue similar para los brazos de
tratamiento en el FDT, pero fue más alto para el brazo de estudio de la
dalbavancina en el TOC. Para CoNS, el éxito microbiológico por patógeno fue
25 más alto en el brazo de estudio de la dalbavancina en ambos FDT y TOC. En el

177 262

FDT, la mayoría de los signos y síntomas en el sitio del catéter se resolvieron para ambos brazos de estudio.

Resultados de Seguridad

Se informó de acontecimientos adversos (AA) en 71 pacientes (95,9%). El
5 número de pacientes de los que se informó de AA fue similar en todos los
brazos de estudio, aunque se informó de más AA en los grupos de la
dalbavancina que en el grupo de la vancomicina. Los AA más comunes fueron
diarrea, estreñimiento, anemia e hipotensión. La mayoría de los AA se
consideraron por el investigador como leves o moderados en intensidad. Los
10 acontecimientos adversos considerados como relacionados (posiblemente o
probablemente) con el fármaco de estudio se distribuyeron uniformemente a
través de los brazos de estudio. Un (1) paciente (3%) en el brazo de estudio de
la dalbavancina tuvo un AA no relacionado y no grave que llevó a la interrupción
de la dalbavancina; ningún AA llevó a la interrupción del estudio. Tres (3)
15 pacientes (8,8%) en el brazo de estudio de la vancomicina tuvieron AA que
llevaron a la interrupción del comparador; 2 AA llevaron a la interrupción del
estudio. La distribución de SAE (evento adverso grave) fue similar entre los
grupos de tratamiento; ningún SAE en el brazo de estudio de la dalbavancina se
consideró como relacionado con el fármaco de estudio y un SAE en el brazo de
20 estudio de la vancomicina se consideró como relacionado. Hubo 5 muertes en
este estudio. Todos los AA que resultaron en muerte no estaban relacionados
con la medicación de estudio. No hubo anomalías de laboratorio
clínicamente significativas en ningún brazo de estudio. Pocos valores de
laboratorio se informaron como AA. Ninguno fueron SAE o llevaron a la
25 interrupción del fármaco de estudio.

El aumento de la presión diastólica de la sangre fue el cambio clínicamente anormal significativo más común a través de todos los grupos de tratamiento. Se informó de hipertensión como un AA en 3/74 pacientes (4,1%, 2 pacientes en la dalbavancina, 1 paciente en la vancomicina); sólo un paciente
5 (que recibió dalbavancina) tuvo aumento de presión sanguínea como un AA considerado como relacionado con la medicación de estudio. La dalbavancina no mostró ningún impacto en la velocidad del corazón, conducción atrioventricular o conducción intraventricular. La diferencia promedio del efecto en los valores QTc fue 7 ms mayor para el grupo de la dalbavancina en
10 comparación con el grupo de la vancomicina. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para la frecuencia de valores lejanos durante la terapia del fármaco.

Por lo tanto, la dalbavancina dada como una dosis inicial IV de 1000 mg seguida una semana después por una segunda dosis IV de 500 mg parece que
15 se tolera bien y es altamente eficaz para el tratamiento de CR-BSI causadas por patógenos Gram positivos, con tasas de respuesta superiores a la vancomicina.

Ejemplo 3. Farmacocinética y excreción renal de dalbavancina en sujetos sanos

Los objetivos principales de este estudio eran caracterizar la
20 farmacocinética de la dalbavancina y calcular el grado de excreción renal en sujetos sanos que recibieron una dosis terapéutica del fármaco. Éste fue un estudio de etiqueta abierta, no comparativo.

Tratamiento con el fármaco del estudio

Se administró a sujetos hombres y mujeres sanos entre 18 y 65 años una
25 dosis IV única de 1000 mg de dalbavancina administrada por infusión en más de

179 X

30 minutos.

Se inscribieron seis sujetos, una mujer y cinco hombres, recibieron la medicación de estudio y completaron todos los aspectos del estudio. Tres sujetos eran caucásicos y tres sujetos eran afroamericanos. La edad media era de 29,8 años (intervalo de 22 a 63). La media de altura era de 1,74 metros (intervalo de 1,60 a 1,90 m) y el peso medio era de 179,6 libras (81,47 kg) (140 a 244 libras (63,50 a 110,68 kg)).

Farmacocinética

Se recolectó la sangre y orina (recolecciones de 24 horas) a los días de estudio 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, y 42. Las muestras de sangre se sacaron en tubos heparinizados y se centrifugaron. Se separó el plasma y se almacenó congelado a -20°C hasta el momento del ensayo. En las muestras de orina y plasma se analizó la dalbavancina usando procedimientos validados de CL/EM/EM. El límite inferior de cuantificación del ensayo fue de 500 ng/ml para orina y plasma.

Los parámetros farmacocinéticos de la dalbavancina se estimaron por procedimientos no compartimentados usando el software WinNonlin™ (Pharsight Corporation). Los valores del pico de concentración (C_{max}) se obtuvieron directamente a partir de los datos observados. El área bajo la curva de concentración en el plasma-tiempo (AUC) se calculó usando la regla lineal trapezoidal. La eliminación (CL) se computó como dosis/AUC. La semi-vida de eliminación ($t_{1/2}$) se estimó por regresión lineal de la porción logarítmica-lineal de la curva del logaritmo de la concentración frente al tiempo. Las estimaciones del volumen de distribución (V_z) se calcularon usando parámetros de regresión, mientras que el volumen de distribución en el estado estacionario (V_{ss}) se

180

calculó a partir del área bajo el primer momento de la curva (AUMC) multiplicado por la dosis y dividido por AUC. La cantidad acumulativa de dalbavancina excretada en la orina se determinó como el integrando de la tasa de excreción de orina (AURC). La eliminación renal, CL_R , se calculó como la proporción: CL_R = AURC/AUC.

Las concentraciones de dalbavancina en el plasma frente al tiempo para todos los sujetos se muestran en la Figura 5. Los parámetros farmacocinéticos se presentan en la Tabla 23. Las concentraciones eran similares en todos los sujetos. El pico de las concentraciones en el plasma era aproximadamente 300 mg/l y se obtuvieron inmediatamente después del final de la infusión. La dalbavancina muestra un volumen aparente de distribución de más de 10 l y se asume que está bien distribuido en el fluido extracelular.

La dalbavancina se eliminó lentamente con un $t_{1/2}$ de 9-12 días. La eliminación total del fármaco fue de $0,0431 \pm 0,0074$ l/h. La fracción estimada de fármaco excretado no cambiado en la orina fue del 42% de la dosis administrada, y la eliminación renal se estimó como 0,018 l/hr. La variabilidad observada en los sujetos fue baja con un coeficiente de variación de menos del 22% en todos los parámetros farmacocinéticos.

Tabla 23. Parámetros farmacocinéticos

	C_{max}	$t_{1/2}$	AUC	V_z	CL	V_m	AURC	% Excreción	CL_R
	mg/l	h	mg.h/l	l	l/h	l	mg	Renal	l/h
Media	301	257	23843	16,0	0,0431	11,5	419	41,9	0,0181
dt	65	21	4528	3,1	0,0074	2,13	27	2,7	0,0038
%CV	21,6	8,1	19,0	19,5	17,1	18,6	6,4	6,4	20,1

137

Min	243	227	19844	11,7	0,0332	8,58	379	37,9	0,0130
Max	394	282	30100	19,6	0,0504	13,9	448	44,8	0,0226

Valoraciones de seguridad

Los acontecimientos adversos se registraron y valoraron en su gravedad y relación con el fármaco de estudio. Los datos de laboratorio (grupo de
5 química, CBC con diferencial, análisis de orina) se recolectaron y valoraron en sus cambios respecto a la línea basal y los valores fuera del intervalo. Se obtuvieron ECG, examen físico y signos vitales, y se valoraron los cambios respecto a la línea basal.

La dalbavancina se toleró bien en este estudio. No se informó de muertes
10 de sujetos o de acontecimientos adversos graves durante este estudio y ningún sujeto se eliminó prematuramente del estudio debido a un AA.

Todos los voluntarios informaron de al menos un AA, todos de intensidad leve. Tres voluntarios informaron de AA que estaban posiblemente relacionados con la medicación de estudio: elevada ALT (valor de 48 UI/l, límite superior
15 normal de 40 UI/l) en un sujeto, eosinofilia (valor de $0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$, límite superior normal de $0,4 \times 10^3/\mu\text{l}$), elevada LDH (valor 303 UI/l, límite superior normal de 90 UI/l), elevada ALT (valor de 54 UI/l, límite superior de normalidad 40UI/l), elevada AST (valor de 42 UI/l, límite superior normal de 40 UI/l) todo en un sujeto; y tinnitus en un sujeto.

20 No se observaron tendencias en los resultados de la hematología, química, signos vitales y ECG post-línea basal.

Análisis

Una dosis única de 1000 mg IV de dalbavancina se toleró bien. Después

182

de una inyección intravenosa única de 1000 mg, las concentraciones de dalbavancina en el plasma se mantuvieron por encima de 45 mg/l durante al menos siete días. Esto está por encima de las concentraciones bactericidas conocidas (4-32 mg/l). Esto apoya el uso de la dalbavancina en un régimen de una vez a la semana. El perfil de eliminación urinaria indica que la excreción renal es una importante ruta de eliminación, con aproximadamente un 40% excretado en la orina. Este resultado es consistente con las observaciones en animales. Ya que los riñones no son la ruta exclusiva de eliminación, puede no ser necesario un ajuste de la dosis de dalbavancina en pacientes con deficiencia renal.

Ejemplo 4. Farmacocinética de Dalbavancina en sujetos con deficiencia renal.

Estos estudios de etiqueta abierta se realizaron para examinar la seguridad y farmacocinética de la dalbavancina intravenosa cuando se administra a sujetos con deficiencia renal leve, moderada y grave.

Tratamiento con el fármaco de estudio

Se eligieron para inscribir en el estudio hombres y mujeres entre 18 y 80 años de edad. Los sujetos tenían que estar dentro de -10% a +50% del peso corporal ideal para su sexo, altura y constitución corporal.

20 Farmacocinética

Se recogieron series de muestras de sangre antes de la dosis y a lo largo de al menos 2 semanas después del final de la infusión y se analizó la dalbavancina usando un procedimiento validado CL-EM/EM.

Los parámetros farmacocinéticos de la dalbavancina se estimaron por procedimientos no compartimentados. El pico de las concentraciones (C_{max}) se

183

obtuvo directamente a partir de los datos observados. El área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo (AUC) se calculó usando la regla lineal trapezoidal.

Los parámetros farmacocinéticos de sujetos con función renal sana y sujetos con la deficiencia renal más grave (DR grave) se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24. Parámetros farmacocinéticos.

Parámetro farmacocinético	Régimen de dosificación				
	1000 mg	1120 mg	1000 mg + 500 mg	500 mg DR grave ^	1000 mg DR grave *
AUC (mg.h/l)	24453+/- 3711	25790+/- 2447	33000*	24378+/- 6615	~48000*
AUC7 (mg.h/l)	13412+/- 2120	13644+/- 1305	12000*	6880+/-1613	~14000*
AUC14 (mg.h/l)	17737+/- 2325	20207+/- 2122	23000*	10986+/- 2817	~22000*
AUC42 (mg.h/l)	23137+/- 3326		33000*		~38000*
Cmax (mg/l)	340+/-68	325+/-41	300*	137+/-22	~300*
Cdia 7 (mg/l)	40,9+/- 5,2 [®]	55,4+/-8,1	40*	~30-40	~57*
Cdia 14 (mg/l)	21,3+/- 2,5 [®]	22,8+/-1,9	40*		~40*

^ Datos clínicos preliminares

* Estimado usando parámetros directamente citados, o extrapolados de representaciones gráficas.

Basado en datos simulados o extrapolado en base a otro estudio, no citado directamente en un resumen.

AUC = exposición al fármaco como se estima por el área bajo la curva concentración en plasma-tiempo.

5 AUC7 = exposición al fármaco en los 7 días después de la dosis o en el periodo del tratamiento.

AUC14 = exposición al fármaco en los 14 días después de la dosis o en el periodo del tratamiento; AUC42 = exposición al fármaco en los 42 días después de la dosis o en el periodo del tratamiento;

10 C_{max} = concentración máxima observada del fármaco en el plasma;

C7 = concentración del fármaco a los 7 días después de la dosis, antes de la administración de otra posible dosis;

C14 = concentración del fármaco a los 14 días después de la dosis, antes de la administración de otra posible dosis.

15 Análisis

Para pacientes con deficiencia renal grave, se administró al sujeto una dosis única de 500 o 1000 mg de dalbavancina. Como es aparente en la Tabla 24, después de 14 días, un paciente con deficiencia renal grave al que se le dio una dosis única de 1000 mg tiene una AUC14 (mg h/l) de aproximadamente 22000, que es inesperadamente muy similar a pacientes normales en el régimen de dos dosis de 1000 mg + 500 mg (AUC14 de 23000 mg.h/l).

Para pacientes con insuficiencia renal leve, no se requirió un ajuste de la dosificación de dalbavancina. Las concentraciones de dalbavancina y los parámetros farmacocinéticos fueron similares en sujetos con deficiencia renal leve y sujetos con función renal normal. Además, la dalbavancina se toleró bien

en sujetos con función renal normal o levemente deficiente. Véase Dowell, J. y col., "Dalbavancin Dosage Adjustments Not Required for Patients with Mild Renal Impairment" presentada en el congreso ECCMID del 2003 en Glasgow (Clinical Microbiology and Infection, Volumen 9 (suplemento 1), página 291; 5 2003) y Stogniew, M y col., "Pharmacokinetic Attributes of Dalbavancin: Well distributed and Completely Eliminated with Dual Routes of Elimination" presentado en el congreso ECCMID de 2003 en Glasgow (Clinical Microbiology and Infection, Volumen 9 (suplemento 1) página 291-292; 2003) los cuales están incorporados explícitamente en este documento por referencia en su totalidad.

10 **Ejemplo 5. Deficiencia renal y enfermedad renal en la etapa final**

La ruta principal de eliminación de la dalbavancina es la excreción de dalbavancina intacta y dalbavancina-OH en la orina, y es probable que el fármaco se use en pacientes con diversos grados de deficiencia renal. Debido a esto, se examinó la seguridad y farmacocinética de la dalbavancina en sujetos 15 con diversos grados de deficiencia renal en los estudios clínicos VER001-3, VER001-11 y VER001-13.

El estudio clínico VER001-3 se terminó prematuramente (5 sujetos inscritos; 3 sujetos recibieron dalbavancina) cuando se determinó que la dosificación que estaba siendo examinada (70 mg) era demasiado baja 20 comparada con la dosificación semanal más grande que se proponía para el estudio clínico. El estudio clínico VER001-13 examinó sujetos con deficiencia renal leve y moderada y el estudio clínico VER001-11 examinó sujetos con deficiencia renal grave y sujetos en la etapa final de la enfermedad renal (ESRD). Se inscribieron sujetos de control emparejados en todos los estudios. 25 La deficiencia renal se definió por la eliminación de creatinina estimada: leve =

18 27

51-79 ml/min, moderada = 31-50 ml/min y grave ≤ 30 ml/min. Los sujetos con ESRD eran dependientes de diálisis durante el curso del estudio (3 veces a la semana). Se examinaron dosis únicas de 1000 mg de dalbavancina IV en sujetos con deficiencia renal leve y moderada, dosis de 500 mg de dalbavancina se examinaron en sujetos con ESRD, y dosis únicas de 500 y 1000 mg se estudiaron en sujetos con deficiencia renal grave.

La dalbavancina se toleró bien en cada uno de estos estudios de deficiencia renal. Se observaron porcentajes similares de sujetos en los que se informó de acontecimientos adversos en cada grupo de estudio. La mayoría de los acontecimientos adversos de los que se informó fueron leves o moderados en gravedad y no relacionados con la medicación de estudio. No hubo trastornos de laboratorio clínicamente significativos en ninguno de los sujetos de estudio mientras recibían la dalbavancina.

En el estudio clínico VER001-13, la administración de la dalbavancina a sujetos con función renal normal y sujetos con deficiencia renal leve resultó en perfiles de concentración-tiempo comparables en el intervalo de muestra de 60 días. En el periodo de tratamiento relativo, 7 días después de la dosis, los perfiles de concentración-tiempo fueron comparables entre sujetos con función renal normal y sujetos con deficiencia renal leve o moderada. Se observó un pequeño aumento en la concentración en sujetos con deficiencia renal moderada más allá del día 14, cuando las concentraciones eran relativamente bajas y por debajo de 40 mg/l. Los perfiles de concentración en plasma-tiempo de dalbavancina en estos sujetos después de 1000 mg de dalbavancina se muestran en la Fig. 18. Los parámetros farmacocinéticos de la dalbavancina se muestran en la Tabla 25. No se requiere ajuste de la dosificación para pacientes

con deficiencia renal leve o moderada ($CL_{CR} > 30$ ml/min). Los resultados de este estudio se consideran consistentes con los pacientes estudiados en el análisis de farmacocinética en la población ($CL_{CR} > 50$ ml/min).

En el estudio clínico VER001-11 se administró dalbavancina a sujetos con función renal normal, sujetos con deficiencia renal grave y sujetos con ESRD. Los perfiles de concentración-tiempo de dalbavancina observados en este estudio se muestran en la Fig. 19. Las concentraciones eran similares entre sujetos con función renal normal y sujetos con deficiencia renal grave o ESRD en las 12 primeras horas, pero se observó una diferencia pequeña y gradualmente creciente en sujetos con deficiencia renal grave. Las concentraciones aumentaron un $\leq 40\%$ en la primera semana después de la dosis, y las diferencias continuaron aumentando en el resto del perfil. Los sujetos con ESRD se dividieron en sujetos que recibieron dalbavancina antes o después de su primera sesión de diálisis. No se observaron diferencias en los perfiles de concentración entre estos dos subgrupos. Las concentraciones en sujetos con ESRD fueron, sin embargo, similares a sujetos con función renal normal, indicando una compensación en la insuficiencia renal debido a la diálisis programada regularmente (3 veces a la semana). Los niveles en el dializado correspondientes a este nivel de la diálisis del fármaco eran demasiado pequeños para medirlos.

Los parámetros farmacocinéticos de la dalbavancina en sujetos con deficiencia renal grave y sujetos con ESRD (VER001-11) se compararon con sujetos con deficiencia renal leve o moderada (VER001-13) en la Tabla 25. Se estudiaron dosis únicas de 500 y 1000 mg en sujetos con deficiencia renal grave; las concentraciones y exposiciones se consideraron consistentes con la

proporcionalidad de dosis (Fig. 20, Tabla 25). Las exposiciones a fármaco individual dentro del periodo relativo de tratamiento (AUC_{0-7}) fueron generalmente consistentes con la CL_{CR} individual, con sólo un pequeño aumento en la exposición observada para sujetos con deficiencia renal grave (Fig. 21).

- 5 Las diferencias en las exposiciones fueron mucho mayores cuando se examinaron en el perfil entero de concentración-tiempo. El área bajo la curva concentración en plasma-tiempo extrapolada hasta el infinito ($AUC_{0-\infty}$) aumentó un 97% en sujetos con deficiencia renal grave. Los sujetos con ESRD tuvieron sólo un aumento del 45% en $AUC_{0-\infty}$, reflejando alguna compensación en la
- 10 insuficiencia renal con la diálisis programada regularmente.

En base a los parámetros farmacocinéticos y simulaciones basadas en los datos, se recomienda un ajuste de la dosis para pacientes con deficiencia renal grave. El propósito del ajuste de la dosificación es equiparar las concentraciones y las exposiciones durante el periodo relativo de tratamiento de

15 dos dosis (14 días), mientras que se minimiza la exposición total del fármaco. Se examinaron un total de 9 regímenes simulados de dosificación en sujetos con deficiencia renal grave. Los resultados de estas simulaciones se resumen en la Fig. 22, mostrando la exposición durante el periodo relativo de tratamiento frente a la exposición general. El ajuste de dosis recomendado es una dosis de 750

20 mg de dalbavancina seguido una semana después por 250 mg de dalbavancina, en pacientes con una $CL_{CR} < 30$ ml/min. Este régimen de dosificación mantiene concentraciones por encima de 20 mg/l, equipara las exposiciones del tratamiento observadas para sujetos con función renal normal, y minimiza la exposición total. La Fig. 23 muestra los perfiles de concentración de

25 dalbavancina-tiempo simulados para i) sujetos con función renal normal que

reciben 1000 mg (día 1) + 500 mg (día 8), ii) sujetos con deficiencia renal grave que reciben 1000 mg (día 1) + 500 mg (día 8), y iii) sujetos con deficiencia renal grave que reciben el ajuste recomendado de la dosificación de 750 mg (día 1) + 250 mg (día 8). Los pacientes que reciben terapia de diálisis regular (2 a 3 veces a la semana) tienen alguna compensación en la eliminación del fármaco por la diálisis y no requieren un ajuste de la dosificación.

Tabla 25. Parámetros farmacocinéticos de la dalbavancina para sujetos sanos y con deficiencia renal siguiendo una dosis única de dalbavancina.

Media (±dt)	Deficiencia Renal Leve (N = 8)	Deficiencia Renal Moderada (N = 8)	Función Renal Normal (N = 8)	Deficiencia Renal Grave (N = 8)	Deficiencia Renal Grave (N = 4)	ESRD Prediálisis (N = 3)	ESRD Postdiálisis (N = 3)	Función Renal Normal (N = 8)	Función Renal Normal (N = 3)
Estud.	VER001-13	VER001-13	VER001-13	VER001-11	VER001-11	VER001-11	VER001-11	VER001-11	VER001-2
Dosis (mg)	1000	1000	1000	500	1000	500	500	500	1120
C _{max} (mg/l)	288,8 (42,3)	330,7 (55,7)	248,8 (33,0)	138,5 (21,8)	315,3 (89,7)	140,7 (28,4)	145,8 (71,8)	137,3 (38,5)	326 (41)
AUC _{0-∞} día 7 (mg·h/l)	8714 (1408)	11050 (2005)	8892 (1382)	8077 (1382)	10853 (1474)	6089 (1788)	4989 (1153)	5245 (1881)	13844 (1308)
AUC _{0-∞} día 14 (mg·h/l)	18333 (1884)	18080 (3085)	13785 (1988)	10412 (2858)	18898 (1780)	10820 (2881)	8500 (2287)	7871 (2422)	20207 (2122)
AUC _{0-∞} día (mg·h/l)	27047 (4084)	37885 (7123)	24581 (5252)	24074 (8813)	44487 (11483)	18772 (5086)	15587 (8050)	12219 (3298)	25780 (2447)
CL (l/h)	0,0376 (0,0048)	0,0273 (0,0045)	0,0422 (0,0078)	0,0222 (0,0084)	0,0238 (0,0088)	0,0284 (0,0083)	0,0350 (0,0113)	0,0428 (0,0082)	0,0437 (0,004)
V _{ss}	18,5	14,7	18,5	13,2	14,2	12,8	14,6	15,0	8,48

190 2/2

(f)	(3,3)	(2,1)	(3,8)	(2,8)	(0,8)	(3,4)	(3,2)	(4,2)	(1,08)
$t_{1/2}$	389	432	417	454	489	378	347	333	149
(h)	(59)	(43)	(108)	(102)	(103)	(83)	(78)	(81)	(3,8)

Ejemplo 6. Deficiencia hepática

La dalbavancina se elimina por ambas rutas renal y no renal y se usará la dalbavancina probablemente en pacientes con diversos grados de deficiencia hepática. La seguridad y farmacocinética de la dalbavancina en sujetos con diversos grados de deficiencia hepática se examinó en el estudio clínico VER001-12. El estudio inscribió sujetos por lo demás sanos con sujetos con deficiencia hepática leve, moderada o grave (valoración Child-Pugh 5 a 6, 7 a 9 y 10 a 15, respectivamente) y sujetos de control emparejados con función hepática normal. A los sujetos se les dió una dosis única de 1000 mg de dalbavancina IV el día 1 seguido de una dosis de 500 mg de dalbavancina IV en el día 8.

Las concentraciones y las exposiciones de la dalbavancina no aumentaron con los grados en crecimiento de deficiencia hepática (Fig. 24). La administración de dalbavancina a sujetos con función hepática normal y sujetos con deficiencia hepática leve resultó en perfiles de concentración-tiempo comparables en el intervalo de muestreo de 60 días. La administración de dalbavancina a sujetos con deficiencia hepática moderada y sujetos con deficiencia hepática grave resultó en concentraciones observadas ligeramente disminuidas cuando se comparan con sujetos con función hepática normal. El fármaco fue bien tolerado en todos los grupos.

La exposición a la dalbavancina en sujetos con función hepática normal y sujetos con deficiencia hepática leve era comparable (Tabla 26). Era evidente

una tendencia hacia una disminución en la exposición a la dalbavancina y un aumento en el CL para sujetos con deficiencia hepática moderada y sujetos con deficiencia hepática grave. En general, la variabilidad entre los sujetos de los parámetros farmacocinéticos fue menor y generalmente por debajo del 30% y aunque los parámetros farmacocinéticos de la dalbavancina fueron estadísticamente diferentes entre los grupos de deficiencia hepática superior e inferior, los intervalos de los parámetros de exposición se superponían significativamente (Fig. 25).

Los cambios en los parámetros farmacocinéticos de la dalbavancina parecían estar influenciados por el volumen de distribución del fármaco. Los volúmenes de distribución aumentaron en la misma manera proporcional o inversamente proporcional que el CL y AUC. La semi-vida de eliminación terminal del fármaco no cambió prácticamente en los grupos. Los sujetos con deficiencia hepática moderada y grave, que tenían significativamente más fluido ascítico y edemas, tenían volúmenes de distribución del fármaco mayores y consecuentemente exposiciones al fármaco ligeramente más bajas.

Había solapamiento en las concentraciones a través de los perfiles en los grupos, con concentraciones medias que se mantenían por encima de 20 mg/l en todos los grupos en la duración del tratamiento previsto de 14 días. Había también solapamiento en la exposición al fármaco en los grupos (Fig. 25). Incluso con una disminución en la exposición media, los sujetos con deficiencia hepática grave todavía tenían una exposición al fármaco a través del periodo de tratamiento relativo (14 días) que excedía los parámetros requeridos para la terapia. No se requiere ajuste de la dosificación de dalbavancina para pacientes con cualquier grado de deficiencia hepática.

192

Tabla 26. Parámetros farmacocinéticos de dalbavancina para sujetos sanos y con deficiencia hepática después de 1000 mg de dalbavancina el día 1 y 500 mg de dalbavancina el día 8

	Deficiencia Hepática Leve (N = 6)	Deficiencia Hepática Moderada (N = 6)	Deficiencia Hepática Grave (N = 5)	Función Hepática Normal (N = 9)
Media (± dt)				
C _{max1} (mg/l)	331,7 (80,6)	227,2 (37,5)	199,0 (30,4)	278,3 (52,8)
C _{max2} (mg/l)	177,0 (62,4)	122,7 (27,2)	118,9 (23,9)	168,3 (42,9)
AUC _{0-24h} (mg.h/l)	11146 (3478)	7710 (1099)	7561 (1540)	10577 (2493)
AUC _{0-48h} (mg.h/l)	21158 (5808)	14826 (1925)	14112 (2911)	20473 (4883)
AUC _{0-72h} (mg.h/l)	33117 (8479)	23628 (3527)	21639 (5940)	33851 (8184)
CL (l/h)	0,0466 (0,0084)	0,0647 (0,0098)	0,0736 (0,0202)	0,0466 (0,0110)
V _{ss}	18,1 (5,2)	24,4 (3,0)	25,2 (4,0)	18,3 (3,7)
t _{1/2} (h)	323 (27)	320 (24)	322 (68)	321 (24)

Ejemplo 7. Unión a proteína de dalbavancina usando Microcalorimetría isotérmica de titulación.

La unión de dalbavancina a proteínas se midió por microcalorimetría isotérmica de titulación (MTI) en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 a 25 y 37°C usando un instrumento Microcal VP-ITC. En un experimento típico, se inyectó 25 x 10 µl de proteína (~150 µM) dentro de una célula calorimétrica que contiene solución de dalbavancina (~ 5 µM). Las concentraciones reales de proteína y dalbavancina se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm. Los

193 2 N

experimentos de control incluyeron inyecciones de proteína en tampón (en ausencia de dalbavancina) para explicar los calores de dilución de la proteína en condiciones idénticas. Para comparar, se realizaron experimentos similares con algunas modificaciones necesarias usando teicoplanina.

5 Los experimentos con dalbavancina se realizaron con cada una de las siguientes proteínas: albúmina humana, albúmina de perro, albúmina de rata, albúmina bovina y glicoproteína α humana. La teicoplanina se estudió con albúmina humana y glicoproteína α . En la Tabla 27 se muestra una comparación de las afinidades de unión a dos temperaturas diferentes.

10 **Tabla 27. Comparación de afinidades de unión aparentes (K_a , $\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)**

	25°C	37°C
<u>Dalbavancina</u>		
Albúmina humana	1,35 ($\pm 0,2$)	1,33 ($\pm 0,15$)
Albúmina de rata	3,1 ($\pm 0,5$)	2,8 ($\pm 1,8$)
Albúmina de perro	0,62 ($\pm 0,09$)	0,50 ($\pm 0,13$)
Albúmina bovina	1,38 ($\pm 0,14$)	
Glicoproteína α	1,84 ($\pm 0,36$)	4,8 ($\pm 2,3$)
<u>Teicoplanina</u>		
Albúmina humana	0,96 ($\pm 0,08$)	
Glicoproteína α	0,07 ($\pm 0,01$)	

Los errores $\pm$ anotados son las desviaciones típicas obtenidas a partir de la rutina de ajuste.

Los efectos de calor integrado, después de la corrección para los calores de dilución, se analizaron por regresión no lineal usando un modelo de unión de
15 sitio único simple con el paquete de software Microcal ORIGIN convencional.

Los datos sin procesar ($\mu\text{cal/s}$) para cada inyección se integraron para dar el efecto de calor total por adición, después se dividió por la cantidad de inyectante para dar las kcal/mol de inyectante. La misma integración se aplicó para los efectos de la dilución de control, y esto fue restado de los datos de valoración reales. Esto proporcionó un diferencial de la curva de unión en el que el grado de unión es proporcional al calor total liberado (o absorbido). Esto se analizó después por procedimientos de regresión no lineal en los términos de diversos modelos convencionales de unión. El modelo más simple asume un equilibrio de unión no competitivo simple, y da tres parámetros:

10 $K_a (=1/k_{\text{diss}})$ es la asociación de unión (constante de disociación).

ΔH = entalpía de la unión (tamaño de la señal relacionado con la unión)

N = número de sitios de unión (asumiendo que el modelo de unión es correcto).

Asumiendo una unión no competitiva, N es el número (relativo) de moles de inyectante requeridos para saturar todos los sitios de unión disponibles en la muestra. Para los experimentos con dalbavancina, la dalbavancina en la "muestra" y la proteína (HSA, etc.) es el "inyectante". Estos resultados preliminares indican que la unión es relativamente débil y, debido a la pobre solubilidad de la dalbavancina, es difícil determinar la estequiometría de la unión (N) de forma no ambigua. Sin embargo, como se ve en la Figura 6, en todos los casos, los datos se ajustan bien con $N < 1$ (es decir, menos de uno a uno de proteína: dalbavancina). Consecuentemente, un valor de $N = 0,5$ significa que sólo se necesita la mitad de moles de proteína unir toda la dalbavancina como se esperaría. En otras palabras, cada proteína se une aparentemente con dos moléculas de dalbavancina. Es posible que la dalbavancina forme un dímero que se una 1:1 con una proteína. Los resultados del modelado de la

15
20
25

1957

estequiometría de unión sugieren que dos moléculas de dalbavancina se unen a una molécula de proteína, a diferencia de la teicoplanina, que muestra una unión 1:1.

La Tabla 28 presenta los tantos por ciento de unión calculados para 5 concentraciones de antibiótico en el intervalo de 1-500 μM , asumiendo las concentraciones fisiológicas de la albúmina en el suero humano ($6 \times 10^{-4} \text{ M}$) y del glicopéptido α ($1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$). Para relacionar esto con la situación clínica, el pico de concentración de dalbavancina en el hombre es aproximadamente 300 mg/l, o 165 μM .

10 Tabla 28. Tanto por ciento calculado de unión de Teicoplanina y Dalbavancina a proteínas del plasma.

Concentración de antibiótico (μM)	Dalbavancina	Teicoplanina
Albúmina humana		
1	98,8	98,3
10	98,8	98,3
100	98,7	98,0
165	98,6	ND
250	98,5	ND
500	98,0	ND
Glicoproteína α humana		
1	73,0	9,6
10	68,2	9,1
100	26,2	6,0
165	16,9	ND

196 8

250	11,4	ND
500	5,9	ND

ND = no realizado.

En estos experimentos, la unión de dalbavancina a seroalbúmina humana excede el 98%. La fracción unida es bastante constante en el intervalo
5 seleccionado de concentraciones de dalbavancina, es decir, 1-500 μ M. Este intervalo abarca las concentraciones terapéuticas en el hombre. La unión de dalbavancina a la glicoproteína α es mucho mayor que la de la teicoplanina. La dalbavancina demostró una alta capacidad y baja afinidad por proteínas del plasma de diferente origen, con valores K_d similares en proteínas de todas las
10 especies analizadas. Estos resultados ayudan a explicar algunas de las características farmacocinéticas únicas de la dalbavancina. La unión y formación de un complejo 2:1 dalbavancina:proteína también explica la prolongada semi-vida, y el volumen de distribución aparente, que se aproxima al volumen de agua extracelular. La baja afinidad ayuda a explicar la actividad observada *in*
15 *vitro*, que excede en gran medida lo que se esperaría para un compuesto con una fracción libre cercana al 1%. La alta capacidad por las proteínas del plasma ayuda a explicar las relativamente altas concentraciones en plasma logradas a pesar de la baja solubilidad del compuesto a pH fisiológico.

20 **Ejemplo 8. Atributos de farmacocinética y distribución en el tejido de la dalbavancina en Ratas.**

Se realizaron dos estudios en ratas administradas con una única infusión IV de 20 mg/kg de [^{3} H]-dalbavancina. Se recogieron excrementos y más de 40 tejidos diferentes durante 70 días después de la administración, y se

determinaron la distribución en el tejido y la farmacocinética de la radiactividad derivada del fármaco.

Se usó [^3H]-dalbavancina purificada por HPLC para estos estudios. El fármaco radioetiquetado se produjo mediante intercambio con tritio y se purificó
5 mediante HPLC.

Estudio del equilibrio de masas de ratas

Se realizaron estudios de equilibrio de masas para determinar el patrón de excreción de dalbavancina después de una única infusión intravenosa (IV) de dalbavancina en ratas macho.

10 Quince ratas macho Sprague-Dawley recibieron una única dosis IV de ^3H -dalbavancina (20 mg/kg, 100 $\mu\text{Ci/rata}$). Después de la administración de la dosis, se recogieron la orina y las heces a intervalos de 24 horas hasta 14, 36, y 70 días después de la dosis (3 ratas/tiempo de recolección final). Se recogieron también los lavados de jaula con agua y metanol. Los cuerpos se analizaron al
15 final del periodo de recolección. Todas las muestras se analizaron para el contenido total de radiactividad mediante recuento por escintilación líquida (LSC).

Después de la administración IV de ^3H -dalbavancina en ratas, se eliminó la radiactividad derivada del fármaco tanto en la orina (~2/3 de radiactividad
20 excretada) como en las heces (~1/3 de radiactividad excretada). Aproximadamente la mitad de la radiactividad administrada se eliminó en la orina y las heces en la primera semana, lo que es coherente con un $t_{1/2}$ en plasma de aproximadamente 1 semana. A los 70 días después de la dosis, solamente el 4,5% de la dosis permanecía en el cuerpo. Se recuperó
25 radiactividad insignificante en los lavados de las jaulas. Se justificó

practicamente toda la radiactividad administrada (orina, heces, cuerpo, lavados de jaulas, e intercambio por tritio) durante el estudio.

Estudio de la distribución cuantitativa en el tejido (DTC) en ratas

Se realizaron estudios de la distribución cuantitativa en el tejido para evaluar la distribución en el tejido de dalbavancina después de una única infusión IV de dalbavancina a ratas macho.

Cuarenta y una ratas macho Sprague-Dawley recibieron una única infusión IV de ^3H -dalbavancina (20 mg/kg, 50 $\mu\text{Ci/rata}$). Las Ratas (3 por punto temporal) se sacrificaron a las 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 336, 840, 1176 y 1680 horas después de la dosis para la recolección de sangre, plasma, y tejidos (incluyendo el cuerpo). Todas las muestras se analizaron mediante LSC.

Se determinaron los perfiles de concentración-tiempo para más de 40 tejidos, incluyendo riñón, hígado, bazo, sangre, plasma, pulmón, y piel. Las concentraciones y los valores $t_{1/2}$ de radiactividad derivada de fármaco en tejidos, incluyendo piel, fueron comparables a los observados en plasma. Se descubrió que la dalbavancina se distribula rápida y ampliamente con todos los tejidos que tenían concentraciones cuantificables de radiactividad derivada de fármaco dentro de las 12 horas después de la infusión. La mayoría de los tejidos alcanzó la concentración máxima (C_{max}) dentro de las 24 horas después de la dosis. La radiactividad recuperada después de 5 días fue <5% de la dosis en cualquier tejido individual. A los 70 días después de la dosis, solamente el cuerpo retenía >1% (2,34%) de la radiactividad administrada. Por tanto, la dalbavancina no se acumulaba en ningún tejido, órgano, o componente celular de la sangre individual. Las concentraciones de radiactividad en el SNC fueron bajas pero detectables en este modelo de animal sano. Se descubrió que la

dalbavancina penetraba en la piel con concentraciones de radiactividad derivada de fármaco que eran tan o más altas que las del plasma. La proporción de radiactividad derivada de fármaco en sangre frente a plasma permaneció relativamente constante en el tiempo y era <1 .

- 5 Como parte de los estudios de DTC, se recogieron muestras de bilis de ratas con el conducto biliar canulado (4 animales) a lo largo de 384 h (16 días) después de la dosis. Se recuperó casi el 11% de la dosis en la bilis durante 384 h después de la dosis. Esto representa la mayoría de la radiactividad derivada de fármaco encontrada en las heces.

10 **Ejemplo 9. Actividad Farmacodinámica de Dalbavancina**

- El objetivo de la terapia anti-microbiana es proporcionar concentraciones activas en el sitio de infección durante un periodo de tiempo adecuado para erradicar patógenos invasores. El principal procedimiento para evaluar la actividad anti-microbiana in vitro es la determinación de las concentraciones
- 15 mínimas inhibitorias y bactericidas (MIC y MBC). Sin embargo, estos parámetros miden solamente efectos netos durante un periodo de incubación prescrito y no caracterizan la evolución temporal de la actividad anti-microbiana. La MBC no determina si la tasa y el alcance de la actividad bactericida puede potenciarse aumentando las concentraciones de fármaco. Además, las determinaciones de
- 20 MIC no miden si existen efectos inhibidores sobre bacterias que persisten después de la retirada del fármaco.

- Cada vez más estudios sugieren que la tasa de actividad bactericida, su dependencia sobre la concentración o del tiempo de exposición, y la presencia o ausencia de un efecto post-antibiótico describen más claramente la evolución
- 25 temporal de la actividad anti-microbiana y son parámetros farmacodinámicos

importantes para determinar regímenes de dosificación óptimos. Por ejemplo, la destrucción de bacterias mediante antibióticos betalactámicos muestra poca dependencia de concentración, y el alcance de la destrucción se debe principalmente a la duración de la exposición. Además, los antibióticos β -lactama producen pocos o ningún efecto post-antibiótico (PAE) con bacilos gram-negativos. Por tanto, se podría predecir que los regímenes de dosificación que mantienen los niveles de fármaco por encima de la MIC durante un periodo de tiempo suficiente demostrarían la mejor eficacia. Esto se ha confirmado en varios modelos animales. Por otro lado, las fluoroquinolonas muestran destrucción dependiente de la concentración y producen prolongados efectos post-antibióticos in vivo. Se podría predecir que la cantidad de fármaco, en lugar de la frecuencia de dosificación sería el determinante importante de la eficacia de estos fármacos. Esto se ha confirmado también en varios modelos animales. Lo que es más importante, la magnitud del parámetro farmacocinético/farmacodinámico requerido para la eficacia de beta-lactama y fluoroquinolonas ha sido similar en modelos de infección en animales y en infecciones en seres humanos.

Los siguientes estudios se diseñaron para caracterizar las características farmacodinámicas in vivo de dalbavancina. Se determinó el impacto del régimen de dosificación sobre la eficacia in vivo de dalbavancina en el modelo experimental de infección de muslo en ratones neutropénicos. Se realizaron también estudios para investigar [1] que parámetro farmacocinético (pico del nivel en suero, área bajo la curva concentración-frente a-tiempo (AUC), la duración de los niveles en suero en el tiempo que superan la MIC) predice mejor la eficacia de dalbavancina y [2] si la magnitud del parámetro PK/PD requerido

201 22

para eficacia es similar entre bacterias gram-positivas comunes incluyendo neumococos resistentes a penicilina y *S. aureus* resistente a meticilina. Finalmente, se determinó el efecto del sitio de infección sobre la actividad de dalbavancina contra *S. pneumoniae* y *S. aureus* en los modelos infección de muslo y de neumonía.

Organismos de Estudio y MIC para Dalbavancina

Los organismos de estudio y sus MIC para dalbavancina se enumeran en la Tabla 29. Las MIC se determinaron en MHB mediante técnicas de microdilución NCCLS convencionales. El MHB se suplementó con sangre de caballo lisada al 3% para las determinaciones de MIC con *S. pneumoniae*. Todas las MIC se realizaron al menos por duplicado.

2020

Tabla 29. Actividad In Vitro de Dalbavancina Contra cepas de *S. pneumoniae* y *S.aureus*.

Organismo	MIC/MBC de Dalbavancina (mg/l)	MIC de Penicilina (mg/l)	MIC de Meticilina (mg/l)
cepa de <i>S. pneumoniae</i>			
1199	0,004	1,0	-
1293	0,004	2,0	-
1325	0,008	2,0	-
1329	0,008	2,0	-
10813	0,03	0,008	-
cepa de <i>S. aureus</i>			
25923	0,12/0,50	-	0,12
33591	0,12/0,25	-	>8,0
31005	0,06/0,25	-	0,12
MRSA	0,12/0,25	-	>8,0
Smith	0,06/0,50	-	0,12
307109	0,06/0,12	-	>8,0

Se utilizaron cinco organismos de neumococos y seis organismos de
5 estafilococos. Las MIC de dalbavancina para los neumococos variaban de 0,004 a 0,03 mg/l. El intervalo de MIC para los *S. aureus* aislados era más estrecho y más alto que aquellos contra neumococos, variando entre 0,06-0,12 mg/l.

Farmacocinética

Las farmacocinéticas de dalbavancina en plasma de ratones Suizos ICR neutropénicos infectados en el muslo se muestran en la Figura 44. La neutropenia en este y todos los otros estudios se produjo mediante inyecciones de ciclofosfamida, 150 mg/kg 4 días antes del estudio, 100 mg/kg 1 día antes del estudio y 100 mg/kg cada 48 h después del inicio de la infección hasta el final del estudio. Los conteos de neutrófilos permanecieron por debajo de $100/\text{mm}^3$ durante todo el estudio. Se estudiaron dosis de 2,5, 5, 10, 20, 40, y 80 mg/kg. El fármaco se administró mediante inyección intraperitoneal de 0,2 ml de volumen. Se retiró la sangre de grupos de tres ratones mediante aspiración retro-orbital en tubos capilares heparinizados a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72, y 96 horas después de la dosificación. Se separó el plasma, y se midieron las concentraciones de dalbavancina en plasma usando un ensayo microbiológico con *Bacillus subtilis* como el organismo de ensayo. Los niveles pico se observaron durante 4-6 h. Las semi-vidas de dalbavancina se determinaron mediante regresión lineal por mínimos cuadrados. El AUC se calculó mediante la regla trapezoidal para concentraciones medias. El AUC se estimó a las 24, 36, 48, 72, 96 horas y se extrapoló hasta el infinito. El AUC a las 24 h se calculó como el AUC a los 6 días dividido entre 6. La dalbavancina mostró farmacocinética lineal. La semivida se prolongó y se modificó de 7,6 a 13,1 horas.

Unión a Proteínas

Se investigó el impacto de la unión del fármaco a suero y a proteínas del suero comparando la MIC de dalbavancina para dos cepas de *S. aureus* en caldo, suero humano suero de ratón infectados, y albúmina (Tabla 30). Las MIC para las dos cepas en caldo fueron 0,12 mg/l. Las MIC (aritméticas) en suero de

201 91

ratón al 95% aumentaron hasta 32 mg/l. Las MIC en suero de ratón ultrafiltrado ascendieron solamente hasta 0,5 mg/l sugiriendo que la gran mayoría de las diferencias en las MIC se debía a la unión a proteínas. Un estudio similar con suero humano y albúmina provocó un aumento hasta solamente 8 mg/l. En base a la diferencia de MIC entre caldo y suero de ratón, se estimó que el grado de unión a proteína era del 99,6%. Se consideró este grado de unión en posteriores análisis farmacodinámicos. Se estimó que el grado de unión en suero humano sería del 96%.

Tabla 30. Impacto de Suero, Ultrafiltrado de Suero, y Albúmina Humana sobre la Actividad In Vitro de Dalbavancina Contra Cepas de *S. aureus* Seleccionadas.

Organismo	MIC en Caldo	MIC en Suero de Ratón al 95%	MIC en Suero Humano al 95%	MIC en Albúmina Humana al 95%	MIC en Ultrafiltrado de Suero de Ratón al 96%
cepa de <i>S. aureus</i>					
25923	0,12	32	8,0	8,0	0,5
MRSA	0,12	32	8,0	8,0	0,5

Modelos de Infección

Se usó el modelo de infección en muslo de ratones para todos los organismos en todos los diversos estudios. En este modelo bien establecido, se inyectan aproximadamente 10^8 ufc de los organismos de estudio en uno o ambos muslos (en 0,1 ml) dos horas antes de iniciar la terapia. La cantidad de organismos en el muslo al inicio de la terapia en los siguientes estudios variaba de $10^{7,15-7,50}$ ufc/muslo. El modelo de infección pulmonar en ratones se usó solamente con un único o bien aislado de *S. pneumoniae* o de *S. aureus*. En

105 106

este modelo, se infecta a los ratones mediante una inoculación intranasal de (aproximadamente $10^{8.5}$ ufc/ml) 50 μ l mediante los orificios nasales de ratones anestesiados. El tratamiento comienza 2 h después de la inoculación, momento en el que el ratón tenía $10^{7.4-7.8}$ ufc/pulmón.

5 Tiempo de Destrucción In Vivo

El efecto de unas dosis únicas de dalbavancina sobre la destrucción in vivo de una cepa de *S.pneumoniae* y *S. aureus* a lo largo del tiempo se muestra en las Figuras 45 y 46. Cada punto representa la media de 4 muslos. Se usaron cinco niveles de dosis, que variaban en 16 veces. Los niveles de dosis usados en el estudio contra *S. aureus* variaban de 5 a 80 mg/kg. Los niveles de dosis usados en el estudio contra *S. pneumoniae* variaban de 0,625 a 10 mg/kg. El alcance de la destrucción de las dos especies era amplio (>2 log con las dosis más altas estudiadas). Sin embargo, el alcance y la tasa de destrucción del aislado de neumococos fueron mayores que en la cepa de estafilococos. El estudio con las dos dosis más altas de dalbavancina provocó la destrucción de *S. aureus*. Tres de los cinco niveles de dosis usados en el estudio contra *S. pneumoniae* redujeron la carga de organismos casi cuatro log en los muslos de ratones infectados.

Estudios de Régimen de Dosificación

En estos estudios, se administraron por vía intraperitoneal múltiples regímenes de dosificación que variaban la dosis y el intervalo de dosificación, en volúmenes de 0,2 ml a grupos de ratones durante 144 h (6 días). Los intervalos de dosificación elegidos fueron 12, 24, 36, y 72 horas. Se usaron cinco dosis diferentes (aumentos de dos veces). El estudio contra *S. aureus* utilizó niveles de dosis totales (mg/kg/6d) que variaban de 30 a 480 mg/kg/6d.

El estudio contra *S. pneumoniae* utilizó niveles de dosis totales (mg/kg/6d) que variaban de 0,6125 a 10 mg/kg/6d. Las Figuras 47 y 48 ilustran las curvas de dosis-respuesta para dalbavancina en los diferentes intervalos de dosificación para la cepa de *S. pneumoniae* y *S. aureus* en los muslos de ratones neutropénicos. Cada punto representa la media de 4 muslos. En general, aumentar el intervalo de dosificación provocó un ligero desplazamiento de las curvas de dosis respuesta a la izquierda, que indica más eficacia con los regímenes para los que se administraron grandes dosis de forma infrecuente.

Cada una de las curvas de dosis-respuesta se caracterizó matemáticamente usando un modelo de máximo efecto. Esta metodología usa la ecuación de Hill para estimar mediante regresión no lineal el efecto máximo (Emax), la dosis (P50) requerida para obtener el 50% del Emax, y la pendiente de la relación dosis-respuesta. A partir de estos parámetros se puede calcular después la dosis requerida para producir un efecto bacteriostático neto durante el periodo de tratamiento de 144 horas así como las dosis necesarias para producir una reducción de 1 y 2 log en la carga de organismos. La dosis estática y la dosis asociada con una destrucción de 1 y 2 log para cada una de las combinaciones organismo-fármaco y los diversos regímenes de dosificación se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31. Dosificaciones de Dalbavancina Requeridas para Alcanzar un Efecto Estático Neto, Destrucción de 1 y 2 Log para Cuatro Intervalos de Dosificación Diferentes en un Modelo de Infección de *S. pneumoniae* y *S. aureus*.

organismo	q 12 h			q 14 h			q 36 h			q 72 h		
	Dosis Estática mg/kg (IC al 95%)	Destrucción de 1 Log mg/kg (IC al 95%)	Destrucción de 2 Log mg/kg (IC al 95%)	Dosis Estática mg/kg (IC al 95%)	Destrucción de 1 Log mg/kg (IC al 95%)	Destrucción de 2 Log mg/kg (IC al 95%)	Dosis Estática mg/kg (IC al 95%)	Destrucción de 1 Log mg/kg (IC al 95%)	Destrucción de 2 Log mg/kg (IC al 95%)	Dosis Estática mg/kg (IC al 95%)	Destrucción de 1 Log mg/kg (IC al 95%)	Destrucción de 2 Log mg/kg (IC al 95%)
SP10813	2,3 (1,9-2,7)	2,8 (2,3-3,3)	3,5 (2,8-4,2)	1,34 (1,14- 1,57)	1,84 (1,34-1,74)	1,75 (1,47-2,03)	1,28 (1,18- 1,38)	1,63 (1,41-1,85)	1,81 (1,67-1,95)	0,71 (0,64- 0,88)	0,77 (0,68-0,95)	0,82 (0,62-1,02)
SA28213	80 (6-162)	-	-	26 (-38-91)	287 (-400-834)	-	18 (-14-44)	38 (-34-108)	122 (-117-381)	10 (-18-38)	31 (-55-117)	128 (-230-488)
dosis presentada como dosis total durante 8 días (mg/kg)												

298

208
222

Aumentar el régimen de dosificación de 12 a 36 horas en el estudio contra *S. pneumoniae* no provocó un cambio apreciable en las dosis asociadas con los tres puntos finales microbiológicos. Sin embargo, la eficacia con el intervalo de dosificación de 72 h requirió menos fármaco. Se observó una
5 relación similar en el estudio contra *S. aureus*. Los únicos regímenes de dosificación que produjeron destrucción de 1 y 2 log contra *S. aureus* fueron los intervalos de 36 y 72 h.

Parámetros Farmacodinámicos en Correlación con la Eficacia

Se determinó qué parámetro PK/PD correlacionaba mejor con la eficacia
10 relacionando la cantidad de bacterias en el muslo al final de 144 horas de terapia con [1] la proporción pico/MIC, [2] la proporción AUC/MIC, y [3] el porcentaje del intervalo de dosificación en que los niveles en suero superan la MIC para cada uno de los regímenes de dosificación estudiados. Los valores del parámetro PK/PD para las dosis no estudiadas específicamente se
15 extrapolaron a partir de los valores de las dosis estudiadas más próximas. La relación entre el log de ufc por muslo y la proporción pico/MIC, la proporción AUC/MIC a las 24 h y el porcentaje de tiempo en que los niveles en suero superan la MIC se ilustran en la Figura 49 para *S. pneumoniae* y Figura 50 para *S. aureus*. Cada punto representa la media de cuatro muslos. Para ambos
20 organismos se observó una fuerte correlación entre las proporciones de AUC/MIC a las 24 h y pico/MIC. Sin embargo, la regresión de los datos con la proporción AUC/MIC a las 24 h provocó la correlación más fuerte. Los datos ilustrados en estas figuras se analizaron también mediante el mismo modelo de dosis máxima/respuesta mencionado anteriormente, excepto que se usaron los
25 diferentes parámetros PK/PD en lugar de la dosis. La R^2 representa el

209

coeficiente de determinación observado para la relación entre eficacia y cada parámetro PK/PD. El coeficiente de determinación (o R^2) representa el porcentaje de la varianza en las cantidades bacterianas que puede atribuirse a cada parámetro PK/PD y era alto para AUC/MIC y C_{max} /MIC.

5 Magnitud o Diana del Parámetro PK/PD

Para determinar si la AUC/MIC requerida para un efecto estático fue similar para múltiples patógenos, se estudió la actividad in vivo de regímenes de dosificación cada 24 ó 72 horas de dalbavancina contra 5 cepas de *S. pneumoniae* y 6 cepas de *S. aureus* después de 6 días de terapia. Las curvas de dosis-respuesta para dalbavancina contra estas diversas cepas se muestran en las Figuras 51 y 52. En las Figuras 51 y 52 la dosis se representa mediante la proporción media AUC/MIC de fármaco libre a las 24 h durante el periodo de estudio de 6 días. En general, la forma de las curvas dosis-respuesta fue similar para todas las cepas. La situación de la curva dosis-respuesta se relacionó con la MIC del organismo. Sin embargo, las curvas de dosis respuesta para los organismos de neumococos están ligeramente desplazadas a la izquierda. Este desplazamiento de la curva sugiere que fue necesario menos fármaco para un efecto contra neumococos que contra estafilococos. La dosis estática, la destrucción de 1 log y 2 log y la AUC/MIC de fármaco libre a las 24 h asociada y la C_{max} /MIC asociada se muestran en la Tabla 32. El alcance de la destrucción bacteriana fue relativamente similar para la mayoría de las cepas. Todas las cepas mostraron más de una caída de 4 log en base 10 en ufc durante el estudio de 6 días.

Tabla 32. Eficacia de Dalbavancina Contra *S. pneumoniae* y *S. aureus*.

[illegible]

271 B

SA25823	0,12/0,50	180	274	86	185	317	76,1	214	367	88,1
SA33691	0,12/0,25	74	123	59	83	180	78,8	114	185	84
MRSA	0,08/0,25	43	147	35,3	62	202	48,8	85	282	70
SA Smith	0,12/0,25	59	96	48,1	85	183	78,0	148	254	22
SA307109	0,08/0,50	31	94	11,3	34	108	12,9	37	121	14,8
SA31005	0,08/0,12	87,7	223	112	84,8	325	183	127	384	217
Media										
±		72±41	180±87	86±31	84±48	213±8,14	76,8±48,2	120±54	282±88	101±81
Desv.										
Típica										

Para los regímenes de dalbavancina que utilizan dosificación cada 24 h, el valor AUC/MIC de fármaco libre a las 24 h asociado con un efecto estático contra *S. pneumoniae* y *S. aureus* fue 17,6±6,9 y 265 ±143, respectivamente.

- 5 Las curvas de dosis respuesta fueron pronunciadas y los valores AUC/MIC a las 24 h asociados con una destrucción de 1 y 2 log no fueron apreciablemente más altos. La terapia contra neumococos, basada en el AUC/MIC a las 24 h, requirió de 12 a 23 veces menos fármaco, como sugerían las curvas de dosis respuesta. Para *S. aureus* la MBC fue de 2 a 4 veces mayor que la MIC. Si se
- 10 considera al AUC/MBC para *S. aureus*, los valores serían solamente de 4 a 8 veces mayores que para *S. pneumoniae*.

- Para los regímenes que utilizaron dosificación menos frecuente (cada 72 h), los valores AUC/MIC de fármaco libre a las 24 h asociados con un efecto estático contra *S. pneumoniae* y *S. aureus* fueron 7,2±4,5 y 160±67,
- 15 respectivamente. Las magnitudes PK/PD necesarias para alcanzar los tres puntos finales microbiológicos in vivo (dosis estática, destrucción de 1 y 2 log) fueron más bajas para los regímenes de dosificación más ampliamente espaciados. Cuando se dosificó dalbavancina cada 72 h, los valores AUC/MIC

22 307

a las 24 h asociados con los diversos puntos finales fueron de 1,3 a 2,4 veces más bajos que cuando el fármaco se dosificó cada 24 h.

La resistencia a penicilina en *S. pneumoniae* y la resistencia a meticilina en *S. aureus* no afectaron al AUC/MIC a las 24 h requerido para la eficacia de dalbavancina.

Impacto de los Neutrófilos sobre la Actividad de Dalbavancina

Para determinar el efecto de los neutrófilos sobre la actividad de dalbavancina, se compararon las curvas de dosis-respuesta con dosificación del fármaco cada 24 h en ratones normales y neutropénicos infectados con *S. pneumoniae*. Las curvas de dosis respuesta posteriores se muestran en la Figura 53. Cada punto representa el valor medio para 4 muslos. La dosis estática, y las dosis asociadas con la destrucción de 1 y 2 log se calcularon a partir de los parámetros estimados mediante regresión no lineal usando la ecuación de Hill. Las dosis (mg/kg/6 d) requeridas para alcanzar estos puntos finales en ratones normales y neutropénicos se muestran en la Tabla 33. La presencia de neutrófilos provocó una reducción de 1,7 a 2,1 veces en la dosis necesaria para eficacia. Sin embargo, esas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 33. Impacto de los Neutrófilos sobre la Eficacia In Vivo de Dalbavancina

Contra *S. pneumoniae*.

	Dosis Estática mg/kg (IC al 95%)	Destrucción de 1 log mg/kg (IC al 95%)	Destrucción de 2 log mg/kg (IC al 95%)
Normal	2,03 (1,99-2,07)	2,35 (2,28-2,44)	2,66 (2,56-2,76)
Neutropénico	4,13 (0,23-8,0)	4,38 (0,28-8,50)	4,62 (0,32-8,90)

Impacto del Sitio de Infección sobre la Actividad de Dalbavancina

Para determinar el impacto del sitio de infección sobre la actividad de dalbavancina, se compararon las curvas de dosis-respuesta con la dosificación del fármaco cada 24 h en modelos de infección en muslo y en pulmón (Figura 54). En estos modelos se utilizaron *S. pneumoniae* y *S. aureus*. Las curvas de dosis-respuesta en los dos modelos que utilizaban *S. pneumoniae* fueron casi idénticas. En un estudio similar contra *S. aureus*, la curva dosis respuesta en el modelo de pulmón se desplaza a la izquierda sugiriendo que era necesario menos fármaco para eficacia en este sitio de infección. Sin embargo, los intervalos de confianza en el estudio de estafilococos eran grandes y estas diferencias no fueron significativas.

Conclusiones

Los estudios anteriores han caracterizado la actividad farmacodinámica in vivo de dalbavancina contra una diversidad de patógenos. Estos pueden resumirse de la siguiente manera.

- La dalbavancina produjo actividad bactericida in vivo contra *S. pneumoniae* y *S. aureus* en modelos de infección en muslo y en pulmón.
- La eficacia de la dalbavancina era dependiente de la dosis
- Los parámetros PK/PD dependientes de la dosis, AUC/MIC a las 24 h y C_{max}/MIC, estaban fuertemente correlacionados con la actividad in vivo de dalbavancina. La regresión de los datos dosis-respuesta con el parámetro AUC/MIC a las 24 h, produjo los coeficientes de determinación más altos. La terapia con los intervalos de dosificación más ampliamente espaciados fue más eficaz en estos modelos.

- Los valores AUC/MIC a las 24 h asociados con el efecto microbiológico fueron similares entre las cepas dentro de las especies estudiadas. La resistencia a antibióticos Beta-lactama en *S. pneumoniae* y *S. aureus* no afectó a la actividad de dalbavancina in vivo.

5 • La eficacia contra *S. pneumoniae* requirió valores AUC/MIC a las 24 h más bajos que contra *S. aureus*. Esto puede explicarse en parte por las diferencias entre especies en MIC y MBC.

10 • La eficacia contra *S. pneumoniae*, ya sea en base a un efecto estático neto, o la destrucción de 1 ó 2 log, requirió un AUC/MIC de fármaco libre durante los 6 días de terapia de casi 100 en estos modelos de infección. La eficacia contra *S. aureus*, en una base similar, requirió un AUC/MIC de fármaco libre durante los 6 días de casi 1000.

- La neutropenia tuvo un impacto mínimo sobre la actividad in vivo de dalbavancina.

15 **Ejemplo 10. Determinación cuantitativa de dalbavancina en plasma por HPLC-EM/EM**

Se desarrolló un procedimiento de HPLC-EM/EM para la medida cuantitativa de dalbavancina en plasma, como se describe a continuación.

Preparación de la calibración de dalbavancina y patrones de control de calidad

20 Se prepararon soluciones madre de dalbavancina disolviendo dalbavancina en agua desionizada para preparar una solución de 1000 µg/ml, seguida de diluciones seriadas en agua desionizada para preparar soluciones de 500, 50 y 10 µg/ml.

25 Se prepararon patrones de calibración de concentración de dalbavancina de 100, 60, y 40 µg/ml, fijando plasma humano con volúmenes apropiados de

una solución madre de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de dalbavancina preparada como se ha descrito anteriormente. Los patrones de calibración de concentración 20 y 10 $\mu\text{g/ml}$ se prepararon fijando plasma humano con volúmenes apropiados de una solución madre de 500 $\mu\text{g/ml}$ de dalbavancina, y se preparó un patrón de calibración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ fijando plasma humano con un volumen apropiado de una solución madre de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Los patrones de control de calidad de dalbavancina de 90 y 30 $\mu\text{g/ml}$ se prepararon fijando plasma humano con un volumen apropiado de una solución madre de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de dalbavancina preparada como se ha descrito anteriormente. Se preparó un patrón de control de calidad de 1,5 $\mu\text{g/ml}$ fijando plasma humano con un volumen apropiado de una solución de 50 $\mu\text{g/ml}$.

Preparación de solución de trabajo de patrón interno

Se preparó una solución de trabajo de 30 $\mu\text{g/ml}$ de patrón interno BI-K0098, que es el dietil-amino-propil-amino derivado de A-40926, de la siguiente manera. Se disolvieron aproximadamente 10 mg de BI-K0098 en aproximadamente 10 ml de fase móvil A (80% de Formiato de Amonio 10 mM/Ácido Fórmico, pH 3 (v/v), 10% de acetonitrilo (v/v) y 10% de 2-propanol (v/v)) para fabricar una solución madre de patrón interno de 1000 $\mu\text{g/ml}$. La solución madre (300 μl) se diluyó después hasta un volumen de 10 ml con fase móvil A para fabricar una solución de patrón interno de 30 $\mu\text{g/ml}$.

Preparación de muestras para análisis

Se prepararon las muestras de la siguiente manera para determinación cuantitativa de la concentración de dalbavancina en plasma. A 50 μl de patrones de calibración o de control de calidad preparados como se ha descrito anteriormente, se añadieron 100 μl de solución patrón de trabajo de patrón

interno y se mezclaron. Se permitió equilibrar a la mezcla durante cinco minutos a temperatura ambiente, seguido de la adición de 250 μ l de acetonitrilo. La mezcla se agitó después en vórtice durante 10 segundos, seguido de centrifugado durante 1 minuto a aproximadamente 10.000 rpm en una micro-centrifugette 4214 de ALC. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios y se evaporaron hasta secar en un Sistema Savant Speed-Vac a aproximadamente 40°C. Las muestras se resuspendieron después en 150 μ l de fase móvil A.

Procedimiento analítico

10 Se inyectaron muestras de 50 μ l preparadas para análisis como se ha descrito anteriormente en una columna Phenomenex Jupiter C₁₈ (50 x 2 mm, C₁₈ 5 μ m 300 Å), y se analizaron en condiciones de gradiente de HPLC a un caudal de 0,3 ml/min. Las condiciones de gradiente fueron: iniciales, 80% de fase móvil A/ 20% de fase móvil B (20% de Formiato de Amonio 10 mM/Ácido Fórmico, pH 3 (v/v), 40% de Acetonitrilo (v/v), 40% de 2-propanol (v/v)); 15 1 minuto, 20% de fase móvil A/80% de fase móvil B; 2 minutos, 20% de fase móvil A/80% de fase móvil B; 2,5 minutos, vuelta a las condiciones iniciales.

El sistema de HPLC se acopló a un espectrómetro de masas de triple cuadripolo PE SCIEX API-2000, con el turbo pulverizador de iones funcionando en un modo de ionización positiva. Se usó aire para generar un pulverizado en la fuente de iones. La temperatura de la sonda se ajustó a 500°C con nitrógeno como gas de cortina. Se empleó el control múltiple de reacciones (MRM) usando nitrógeno como gas de colisión. Los analitos se detectaron controlando las siguientes transiciones iónicas: 909,3 Da→1429,3 Da para dalbavancina, y 20 923,3 Da→1457,3 Da para el patrón interno (BI-K0098). Para evitar la 25

contaminación del espectrómetro de masas, se realizó un desvío de flujo post-columna en el primer minuto y 2,5 minutos después del comienzo de la carrera cromatográfica.

Se usó el Software Sample Control 1.4 para la adquisición de análisis de
5 datos y se usó el software MacQuan 1.6 para la integración de los picos cromatográficos y la evaluación de los datos estadísticos.

Curvas de calibración

Se evaluó la linealidad del procedimiento de ensayo ensayando patrones de calibración para generar una curva de calibración. La concentración de
10 dalbavancina en una muestra de plasma se determinó calculando la proporción de área del pico entre dalbavancina y el patrón interno.

Las curvas de calibración para concentraciones de dalbavancina a lo largo de un intervalo analítico de 0,5-100µg de dalbavancina/ml de plasma humano se construyeron usando la ecuación $y = A + Bx$ (pesada como $1/x$),
15 donde A representa el punto de corte de la curva, B representa la pendiente de la curva, x representa la concentración de dalbavancina del patrón de calibración (µg/ml), e y representa la proporción del área del pico de dalbavancina con respecto al patrón interno. Se construyeron tres curvas de calibración diferentes. Los resultados mostraron que la proporción del área de
20 dalbavancina/patrón interno y las concentraciones de dalbavancina variaban de forma lineal a lo largo del intervalo analítico. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue de 0,5 µg de dalbavancina por ml de plasma humano. Las pendientes para las curvas de calibración fueron reproducibles y sus coeficientes de correlación fueron mayores de 0,9995.

25 Estabilidad de dalbavancina en plasma

278 3

La estabilidad de dalbavancina en muestras de plasma se ensayó analizando tres patrones de control de calidad de muestras de plasma humano reproducidos exactamente, preparados como se ha descrito anteriormente, a dos concentraciones diferentes, 1,5 y 90 $\mu\text{g/ml}$. La concentración detectable de dalbavancina era estable después de tres ciclos de tratamiento de congelación-descongelación. La concentración de dalbavancina en muestras procesadas era estable después de 24 horas a temperatura ambiente. No se observó reducción en la concentración de dalbavancina con respecto a muestras de tiempo cero.

10 **Ejemplo 11. Análisis de Dalbavancina por Espectroscopía de Masas.**

Se investigó la naturaleza de los multímeros de dalbavancina en solución y se determinaron las condiciones que influyen en la proporción de la población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros de dalbavancina mediante espectroscopía de masas con ionización por electronebulización (IEN-EM).

Se realizaron experimentos usando un espectrómetro de masas API III+ de Applied Biosystem equipado con una fuente TurbolonSpray, un analizador Triple Quadrupole, funcionando en modo ión positivo. Las condiciones optimizadas se muestran en la Tabla 34 a continuación.

2190

Tabla 34. Condiciones Instrumentales para Análisis de Dalbavancina en el Espectrómetro de Masas API III+ de Applied Biosystem.

Fuente de Pulverizado de Iones		Analizador de Espectrometría de Masas	
voltaje	del 5000 V	Voltaje de la placa del	650 V
Pulverizado de iones		Interfaz	
Voltaje de la placa de	80 V	Voltaje	de 40 V
orificio		compensador	de
		pista Q0	
Flujo del gas de	0,6 l/min	Masa estacionaria de	1000
cortina		Q1	
Flujo del gas del	1,2 l/min	Resolución de Q1	120,8
nebulizador			
Flujo de líquido	5 µl/min	delta de masa de Q1	0,2
calentador	del 80°C	Voltaje	de 27 V
interfaz		compensación	de
		pista Q1	
		Voltaje de la lente 7	-50 V
		Voltaje	de -50 V
		compensación	de
		pista Q2	
Condiciones de		Masa estacionaria de	1000
Exploración		Q3	
(Exploración de Q1)		resolución de Q3	110
		delta de masa de Q3	0
Incremento	0,1 uma	Voltaje	de -70 V
		compensación	de
		pista Q3	

220 #

Tiempo de 1 ms alojamiento	Voltaje de la lente 9 -250 V
	Voltaje de la placa Faraday -250 V
	Voltaje del -3800 V multiplicador de electrones de canal

Dalbavancina en solución

Los parámetros instrumentales se afinaron en una solución de dalbavancina que contenía 0,1 mg/ml de dalbavancina disuelta en una solución 8:2 de agua:isopropanol. Se adquirió un espectro de dalbavancina en solución en el intervalo de 500-2000 uma después de la inyección directa de la solución. El espectro resultante, como se ve en la Figura 7, indica la presencia de multímeros de dalbavancina. Como ejemplo no limitante, una pequeña cantidad del espectro es atribuible a un homomultímero de B₀, que está presente como una especie iónica (2nM+y⁺³), donde n es un número entero positivo que indica la multiplicidad del homomultímero, por ejemplo, n=1 cuando el multímero es un homodímero y n=2 cuando el multímero es un homotetrámero, M indica la masa del monómero, y = n y ⁺³ indica una carga iónica de más tres. Por ejemplo, se proporciona el homodímero de B₀ cuando n = 1, y = 1, y M = masa de B₀. Esta especie de homodímero se asigna a un resto iónico (2 M⁺³) en el espectro de masas.

Influencia de la concentración de dalbavancina sobre la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina

227 N

Se evaluó la influencia de la concentración de dalbavancina sobre la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros mediante espectroscopía de masas usando las condiciones descritas anteriormente. Los espectros se adquirieron mediante infusión directa de soluciones de dalbavancina a concentraciones de 20, 40, 60, y 80 $\mu\text{g/ml}$. Las intensidades de los picos principales se presentaron como una función de concentración de dalbavancina y se determinaron las proporciones de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina, como se muestra en la Figura 8.

Los datos indican que la proporción de población de multímeros de dalbavancina con respecto a monómeros de dalbavancina aumenta al aumentar la concentración. Esto puede ayudar a explicar las altas capacidades de carga de fármaco que pueden administrarse a un individuo. El papel del multímero como depósito de monómeros puede disminuir la tendencia de las muestras de concentración más alta a formar precipitados y potenciar las concentraciones que pueden administrarse a un individuo. La presencia de multímeros también puede permitir la administración rápida de una dosis de dalbavancina a un individuo.

Se proporciona un ejemplo no limitante de un procedimiento para determinar la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina, por ejemplo, determinando la proporción entre las intensidades pico de iones A y B como se muestra en la Figura 7. Dividir la intensidad del pico A por la intensidad del pico B proporciona una medida de la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina.

Influencia del pH sobre la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina

Se evaluó la influencia del pH de la solución sobre la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina en las condiciones instrumentales descritas anteriormente y a los siguientes valores de pH de la solución: 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, y 5,5. Se determinó la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina a cada uno de los valores de pH y se representó gráficamente frente al pH, como se ve en la Figura 9. Se determinó que la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina aumenta al aumentar el pH.

Aunque sin limitarse por la teoría, se cree que grupos iónicos, tales como un grupo carboxilato en un primer monómero de dalbavancina, ayudan en la estabilización de multímeros de dalbavancina formando interacciones iónicas con iones de carga opuesta, tales como grupos terciarios de nitrógeno, en un segundo monómero de dalbavancina. Dichas interacciones iónicas pueden estar influidas por el pH. Se cree que la tendencia creciente de la dalbavancina a estar presente como un multímero a pH más altos es un indicio de que las interacciones iónicas son importantes en la estabilización de multímeros. En particular, se cree que los multímeros de dalbavancina se desestabilizan a un pH más bajo, presumiblemente debido a la interrupción de las interacciones iónicas que contribuyen a la estabilidad de los multímeros puesto que ciertos grupos funcionales, tales como grupos carboxilatos, pueden estar protonados a valores de pH inferiores.

22/11

Influencia de la fuerza iónica de la solución sobre la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina

Se determinó la influencia de la fuerza iónica de la solución sobre la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina mediante espectrometría de masas. Los espectros de masas se obtuvieron en modo de electronebulización positiva en un instrumento de trampa de iones Finnigan LCQ^{Deca} afinado y calibrado previamente en modo de electronebulización usando Ultramark 1621, cafeína y MRFA (L-metionil-arginil-fenilalanil-arginina). Todos los espectros de masas se registraron usando las condiciones enumeradas en la Tabla 35. Los parámetros de la muestra que se investigaron se enumeran en la Tabla 36.

Tabla 35. Condiciones de los Espectros de Masas

Condiciones de Entrada de la Muestra	
Temperatura del Capilar (°C)	200
Gas de impulsión (N ₂ unidades arbitrarias)	40
Ajustes de Voltaje de Entrada de la Muestra	
Polaridad:	positiva
Voltaje de la Fuente (kV):	4,70
Voltaje del Capilar (V):	34
Compensación de la Lente Tubular (V):	-60
Condiciones de Exploración Completa	
Intervalo de exploración (uma):	500-2000
Número de microexploraciones	3
Tiempo de ionización máxima (ms):	200

Condiciones de Exploración al Detalle	
Intervalo de exploración (uma):	1218-1228
Número de microexploraciones:	5
Tiempo de ionización máxima (ms):	50

Tabla 38. Parámetros de la Muestra

Muestra	µg/ml	Disolvente	pH
Dalbavancina	100	COO ⁻ NH ₄ ⁺ 5 mM	5
	100	COO ⁻ NH ₄ ⁺ 50 mM	5
	100	COO ⁻ NH ₄ ⁺ 100 mM	5

Las soluciones acuosas de la muestra se infundieron a 10 µl/min mediante una bomba de jeringa Harward y los espectros de masas se obtuvieron como se muestra en las Figuras 10-12.

Los espectros obtenidos indican que la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina está influida por la fuerza iónica. Se descubrió que un aumento en la concentración de tampón se correspondía con un descenso en los restos de masa de multímeros y por lo tanto una disminución en la proporción de población de multímeros con respecto a monómeros de dalbavancina.

Como se ha mencionado, se cree que las interacciones iónicas son importantes para la estabilidad de los multímeros de dalbavancina. El hecho de que el aumento de la fuerza iónica se correlacionara con la disminución de la intensidad de los restos de masa de multímeros, confirmó el papel de las interacciones iónicas en la estabilidad de los multímeros. Sin embargo, como

los restos de masa de multímeros estaban presentes incluso a fuerzas iónicas mayores, puede estar implicada otra, segunda interacción en la estabilización de los multímeros.

Aunque sin limitarse por ninguna teoría, se cree que las interacciones hidrófobas son importantes para estabilizar las especies de multímeros de dalbavancina. Si la estabilización de estos multímeros de dalbavancina no covalentes se debiera únicamente a interacciones iónicas, se esperaría que un aumento en la fuerza iónica diera como resultado una pérdida total de las especies de masa de multímeros. Es decir, se esperaría que a medida que aumenta la fuerza iónica de la solución, las interacciones iónicas que estabilizan al multímero estarían alteradas por la población aumentada de iones en solución, con los que se asociarían más fácilmente los monómeros. Por lo tanto, la fuerza iónica de la solución llevaría a los multímeros a disociarse en componentes monómeros y los espectros de masas resultantes estarían sin ningún resto de masa de multímeros. Sin embargo, incluso en solución de alta fuerza iónica (tal como formiato de amonio 100 mM), se detecta la presencia de multímeros de dalbavancina en el espectro de masas. Por consiguiente, se considera que los multímeros de dalbavancina están estabilizados, al menos en parte, por interacciones hidrófobas.

20 Compuesto Estructuralmente Similar

Se cree que la eficacia mejorada de la Dalbavancina se debe al menos en parte a su capacidad para formar multímeros. Se piensa que esta característica única no se comparte ni siquiera entre compuestos estructuralmente muy similares. Se investigó un compuesto con una estructura química similar a la Dalbavancina mediante análisis de espectroscopía de

226

masas respecto a su capacidad de formar multímeros. Los espectros de masas se obtuvieron en modo de electronebulización positiva en un instrumento de trampa de iones Finnigan LCQ^{Deca} afinado y calibrado previamente en modo de electronebulización usando Ultramark 1621, cafeína y MRFA (L-metionil-arginil-fenilalanil-arginina). Todos los espectros de masas se registraron usando las condiciones enumeradas en la Tabla 37. Los parámetros de la muestra que se investigaron se enumeran en la Tabla 38. Las soluciones acuosas de la muestra se infundieron a 10 µl/min mediante una bomba de jeringa Harward y los espectros de masas se obtuvieron como se muestra en las Figuras 13 y 14.

Tabla 37. Condiciones de los Espectros de Masas

Condiciones de Entrada de la Muestra	
Temperatura del Capilar (°C)	200
Gas de impulsión (N ₂ unidades arbitrarias)	40
Ajustes de Voltaje de Entrada de la Muestra	
Polaridad:	positiva
Voltaje de la Fuente (kV):	4,70
Voltaje del Capilar (V):	34
Compensación de la Lente Tubular (V):	-60
Condiciones de Exploración Completa	
Intervalo de exploración (uma):	500-2000
Número de microexploraciones:	3
Tiempo de ionización máxima (ms):	200

227

Condiciones de Exploración al Detalle	
Intervalo de exploración (uma):	1218-1228
Número de microexploraciones:	5
Tiempo de ionización máxima (ms):	50

2008

Tabla 38. Parámetros de la Muestra

Muestra	µg/ml	Disolvente	pH
Telcoplanina	50	H ₂ O	n.a.
	100	H ₂ O	n.a.

n.a. = no ajustado

Un antibiótico glicopeptídico similar (teicoplanina) no muestra complejos multiméricos en solución a diversas concentraciones. Esto apoya al indicio de que compuestos estructuralmente similares no forman especies multiméricas en solución y que este fenómeno puede jugar un papel importante en la actividad de la dalbavancina.

Ejemplo 12 Espectrometría de masas de complejos proteína-dalbavancina mediante ionización por desorción mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo

Se mezclaron 10 µl de HSA 0,150 mM con 10 µl de solución de dalbavancina (de 0,075 mM, 0,15 mM, 0,3 mM y 1,5 mM) y se incubaron durante 60 min a 37°C. Las muestras se prepararon para análisis usando la técnica de gota seca. Los espectros se obtuvieron en un espectrómetro tof BRUKER FLEX III, afinado y calibrado previamente usando albúmina de suero bovino convencional, obteniendo y promediando espectros generados por 200 disparos de láser. Matriz: 9 partes de DHB-9 (ácido 2,5-dihidroxi-benzoico) saturado en acetonitrilo/ H₂O (50:50), 1 parte de ácido sinapínico saturado en acetonitrilo/H₂O (50:50). Se mezclaron 0,5 µl de solución de muestra y 0,5 µl de solución matriz y se colocaron sobre el objetivo del láser.

La dalbavancina se une a la proteína como el monómero (1 HSA + 1 dalbavancina). A proporciones de dalbavancina con respecto a proteína muy altas (1:2, 1:10), puede observarse la presencia de complejos que contienen 2 moléculas de dalbavancina por molécula de proteína.

5 Ejemplo 13. Calorimetría Isotérmica de Titulación de la Unión de Dalbavancina a *N,N'*-diacetil-Lys-D-Ala-D-Ala en presencia de Albúmina de Suero Humano

La unión de dalbavancina a *N,N'*-diacetil-Lys-D-Ala-D-Ala, un análogo peptídico de las dianas de la pared celular de dalbavancina, se investigó por calorimetría isotérmica de titulación (CIT) en presencia de HSA en un intervalo de concentraciones (hasta 600 μM) a 25°C, realizando mediciones adicionales a 37°C. HSA aumentó la solubilidad de dalbavancina y redujo su afinidad de unión por el ligando tripeptídico. Los resultados se compararon con los obtenidos para vancomicina. Los efectos observados adquirieron valores estacionarios a concentraciones de HSA relativamente bajas, lo cual es coherente con un modelo de unión no competitiva que permite la unión del ligando a dalbavancina tanto libre en solución como (más débilmente) al complejo de dalbavancina-HSA.

Los experimentos preliminares demostraron que, en ausencia de proteínas del suero, la dalbavancina y la vancomicina muestran perfiles de unión similares: las dos proporcionan una unión exotérmica a *N,N'*-diacetil-Lys-D-Ala-D-Ala, pero ninguna prueba de unión al dipéptido (D-Ala-D-Ala) o a Lys-D-Ala-D-Lactato. Para la interacción de dalbavancina/tripeptido, los datos fueron coherentes con la unión con una $K_{\text{dis}} = 1\text{-}10 \mu\text{M}$, dependiendo de la temperatura, similar a la vancomicina en las mismas condiciones. En presencia

de HSA, la solubilidad de dalbavancina aumenta significativamente y la afinidad de unión por el tripéptido se reduce de una manera coherente con la unión competitiva o no competitiva por HSA al antibiótico. Los experimentos descritos en este Ejemplo se diseñaron para: (a) comparar las mediciones de
5 dalbavancina/tri-péptido a diferentes temperaturas (25 y 37°C) y diferentes concentraciones de HSA; (b) usar estos datos para construir un modelo de unión para comparar con los números observados.

La dalbavancina se suministró por Biosearch Italia. Otros reactivos procedían de Sigma: clorhidrato de vancomicina (Sigma V-2002, pf 1485,7),
10 *N,N'*-diacetil-Lys-D-Ala-D-Ala (Sigma D-9904, pf 372,4), albúmina humana (HSA; Sigma A-3782; pm 69.366).

Los antibióticos y péptidos se disolvieron en tampón acuoso (fosfato Na 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) que contenía HSA, con agitación suave inmediatamente antes de cada experimento. Las concentraciones de péptido
15 se determinaron en peso. Las concentraciones de dalbavancina se determinaron en peso o por absorbancia UV usando los coeficientes de extinción molar $\epsilon = 12430$ (dalbavancina, $A_{280}^{1\%} = 68,42$), $\epsilon_{280} = 6690$ (vancomicina). Las concentraciones de HSA se determinaron por absorbancia UV (HSA, $\epsilon_{280} = 37.700$; $A_{280}^{1\%} = 5,44$). Los espectros se registraron a
20 temperatura ambiente en cubetas de cuarzo con una longitud de trayectoria de 1 cm usando espectrofotómetros Shimadzu UV-160A o UV-1601, diluyéndose las muestras cuantitativamente con tampón si fuera necesario para proporcionar absorbancia en el intervalo de 0,1-1A.

La calorimetría isotérmica de titulación se realizó usando un instrumento
25 Microcal VP-ITC a 25°C y 37°C usando procedimientos de operación

231

convencionales. Véase, por ejemplo, Wiseman y col., *Anal. Biochem.* (1989) 179, 131-137; Cooper, y col., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A-Math. Phys. Eng. Sci.* (1993) 345, 23-35; Cooper, A, Isothermal Titration Microcalorimetry in C. Jones, B. Mulloy and A. H. Thomas (Eds.), *Microscopy, Optical Spectroscopy, and Macroscopic Techniques*. Humana Press, Totowa, NJ, (1994) p 137-150; Cooper, A., *Microcalorimetry of Protein-protein Interactions* in J. E. Ladbury and B. Z. Chowdhry (Eds.); *Biocalorimetry: The Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. Wiley, (1998) p 103-111; and Cooper, A., *Curr. Opin. Chem. Biol.* (1999) 3, 557-563. Las muestras se desgasificaron suavemente antes de la carga para impedir la formación de burbujas en la celda del calorímetro. Cada experimento típicamente comprendía 25 inyecciones de 10 μ l de solución de péptido ($\approx$ 1 mM) en la celda del calorímetro (volumen $\approx$ 1,4 ml) que contenía solución de antibiótico ($\approx$ 20-100 μ M). Los experimentos de control implicaron la inyección de ligando en tampón en condiciones idénticas para determinar los calores de dilución del péptido, y estos valores se usaron para la corrección de los datos de unión de partida antes del análisis. Los experimentos de unión dalbavancina/tripéptido se repitieron varias veces a cada temperatura. Los datos de unión de CIT se analizaron usando el software Microcal ORIGIN™ convencional para determinar el número aparente de sitios de unión (N), la afinidad de unión ($K_{\text{app}} = 1/K_{\text{diss}}$) y la entalpía de unión (ΔH).

TABLA 39

Datos termodinámicos para la unión de tripéptido a dalbavancina y vancomicina determinados por CIT suponiendo un modelo de unión sencillo no cooperativo: efectos de la temperatura y HSA.

23

	T °C	N	K _{ass} M ⁻¹	K _{diss} μM	ΔH Kcal/mol	ΔS eu	[HSA] μM
<u>Dalba-</u> <u>vancina</u>	10	0,59	6,70E+0 5	1,49	-10,26	-9,60	0
	10	0,59	9,20E+0 5	1,09	-8,95	-4,30	0
	10	0,59	6,85E+0 5	1,46	-10,30	-9,60	0
	10	0,56	6,24E+0 5	1,60	-10,30	-9,90	0
	25	0,6	3,13E+0 5	3,19	-10,10	-8,90	0
	25	x	3,30E+0 5	3,03	-11,30	-12,60	0
	25	x	3,20E+0 5	3,13	-11,70	-14,00	0
	25	x	2,80E+0 5	3,57	-14,30	-23,00	0
	25	0,57	3,03E+0 5	3,30	-12,60	-17,00	0
	25	0,74	3,19E+0 5	3,13	-11,20	-12,50	0
	25	0,54	3,93E+0 5	2,54	-12,90	-17,60	0
con HSA	25	0,37	1,18E+0 5	8,47	-26,40	-65,50	13,6
con HSA	25	0,35	1,18E+0 5	8,47	-27,80	-70,10	13,6
con HSA	25	0,68	3,50E+0 4	28,57	-20,00	-46,20	34,2

23/1

con HSA	25	0,83	2,76E+0 4	36,23	-16,90	-36,50	80,7
con HSA	25	1,38	3,49E+0 4	28,65	-18,60	-41,70	104
con HSA	25	0,9	3,10E+0 4	32,26	-21,05	-50,00	288
con HSA	25	1,242	2,84E+0 4	35,21	-19,50	-44,90	430
con HSA	25	0,86	2,18E+0 4	45,87	-15,00	-30,40	601
	37	0,82	1,30E+0 5	7,69	-12,50	-16,80	0
	37	0,6	1,10E+0 5	9,09	-17,40	-33,20	0
con HSA	37	0,179	1,25E+0 4	80,00	-98,60	-299,00	482
con HSA	37	0,5	9568	104,52	-26,60	-67,60	516
<u>Vancomi-</u> <u>cina</u>	10	1,1	6,90E+0 5	1,45	-9,49	-6,80	0
	25	0,91	3,40E+0 5	2,94	-10,70	-10,60	0
	25	0,97	3,60E+0 5	2,78	-12,90	-17,80	0
con HSA	25	1,05	2,90E+0 5	3,45	-10,09	-8,80	513

Los experimentos de CIT sobre la unión del tripéptido a dalbavancina en ausencia de HSA proporcionaron datos coherentes para las afinidades de unión, estando el valor medio de K_{dis} en la región de 1,4, 3,1 y 8,4 μ M a 10, 25 y 37°C respectivamente (Tabla 39). La unión es exotérmica. Los cálculos de

234 g
R

concentración en este caso indican que N está próximo a 0,5 en estas condiciones. Esto es coherente con la unión de una molécula de tripéptido por dímero de dalbavancina en estas condiciones. Estas afinidades de unión y entalpías de unión son comparables a las observadas con vancomicina en las mismas condiciones (Tabla 39, y D. McPhail, A. Cooper, *J. Chem. Soc.-Faraday Trans.* (1997) 93, 2283-2289.). Obsérvese también que la vancomicina experimenta una dimerización inducida por ligando a concentraciones superiores.

La adición de HSA a las mezclas de dalbavancina reduce la afinidad de unión aparente entre el tripéptido y la dalbavancina, aunque la unión es aparentemente más exotérmica (Tabla 39). La dependencia de la concentración de HSA para esto a 25°C se muestra en la Figura 15. Después de una elevación inicial (debilitamiento) en la K_{dbs} aparente hasta una concentración de HSA de 35 μ M, permanece relativamente constante para mayores concentraciones de HSA que se aproximan a los niveles fisiológicos (600 μ M). El nivel constante a altas concentraciones de HSA ($K_{dbs} \approx 35 \mu$ M) corresponde a una afinidad de unión aproximadamente 10-12 veces más débil que en ausencia de HSA. Se observó una reducción similar a 37°C.

El efecto de la HSA no se debía a la interacción con el tripéptido. Los experimentos de CIT de control para la unión de vancomicina al tripéptido en presencia de HSA dieron resultados comparables a los observados en ausencia de HSA (véase la Tabla 39). Esto indica que ni el péptido ni el antibiótico estrechamente relacionado, vancomicina, interaccionan con HSA en solución. Se deduce que cualquier efecto de HSA sobre la interacción dalbavancina/tripéptido debe deberse a la interacción entre HSA y

235

dalbavancina.

Aunque sin deseo de limitarse por ninguna teoría, los datos anteriores son coherentes con un modelo de unión no competitivo. Este modelo supone que el ligando tripeptídico (L) puede unirse a dalbavancina (D) tanto en estado
5 libre como (posiblemente con una afinidad diferente) en el complejo dalbavancina-HSA.



Constante de disociación de unión de ligando aparente (observada) (no competitiva):

$$\begin{aligned} 10 \quad K_{app,L} &= [D \text{ total}][L]/[\text{complejo DL total}] \\ &= ([D] + [D.HSA])[L]/([DL] + [LD.HSA]) \\ &= K_L \{1 + [HSA]/K_{HSA}\} / \{1 + [HSA].K_L/K_{HSA}.K_{LDHSA}\} \end{aligned}$$

Esto demuestra una dependencia hiperbólica de $K_{app,L}$ sobre la concentración de HSA libre que está de acuerdo con los datos observados
15 (Figura 15). A una elevada [HSA] esto alcanza un valor asintótico (estacionario)

$$K_{app,L} = K_{LDHSA} \text{ (para [HSA] elevada)}$$

Esto sugiere que la afinidad de unión por el tripeptido es de
20 aproximadamente 35 μM cuando la dalbavancina se une a HSA, en comparación con 3 μM para la dalbavancina libre (figuras a 25°C).

Pueden sugerirse otros mecanismos en términos de si la dalbavancina está actuando como monómero o como dímero en sus interacciones con péptidos o proteínas. La comparación directa de dalbavancina con vancomicina (que muestra una unión inequívoca 1:1 a estas bajas concentraciones) demuestra que la unión es completa a menores proporciones molares (menor N) para dalbavancina (Figura 16). Esto es coherente con un complejo dalbavancina:péptido 2:1.

Sin embargo, en presencia de HSA, los valores de N aparentes aumentan (Tabla 39), y pueden ser más coherentes con una formación de complejos 1:1. Aunque no se desea limitación por ninguna teoría, el modelo mostrado en la Figura 17, que muestra la posible interacción de monómeros y dímeros de dalbavancina con ligandos tripeptídicos y HSA, es coherente con estas observaciones. La Figura 17A representa la dalbavancina como en equilibrio monómero-dímero en solución (predominantemente como un dímero), pero se une como un monómero a dos sitios diferentes en HSA. Esto es coherente con los valores $N=0,5$ observados por CIT para la unión de proteínas del suero a dalbavancina (Ejemplo 3). La Figura 17B representa la unión del ligando al dímero de dalbavancina en solución y (más débilmente) a los monómeros de dalbavancina unidos a HSA. Esto es coherente con la unión no competitiva de dalbavancina tanto al tripeptido como a HSA, con estequiometrías aparentes variables.

En resumen, este Ejemplo demuestra que la HSA reduce la afinidad de unión de dalbavancina por el ligando tripeptídico de una manera coherente con un mecanismo no competitivo y que la dalbavancina unida a HSA retiene su capacidad de unirse a ligandos tripeptídicos, aunque con una afinidad reducida.

Estos resultados también son coherentes con un modelo en el que la dalbavancina está en equilibrio monómero-multímero, siendo predominantemente multimérica en solución, con una fuerte afinidad de los multímeros por el ligando peptídico. Los monómeros de dalbavancina, tanto
5 libres como unidos a la albúmina del suero, también pueden unirse a péptidos con una afinidad reducida.

Ejemplo 13. Preparaciones de A-40926 y Dalbavancina

Preparación de A-40926

A-40926, el glicopéptido natural producido por fermentación, fue el
10 material de partida para producir Dalbavancina. Se produjo por una *Nonomuria* sp ATCC 39727 como una mezcla de A-40926 y su derivado de acetilo (véase la Patente de Estados Unidos Nº 4.935.238 y B. Golstain y col. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, diciembre. 1987, p. 1961-1966). El derivado de acetilo primero se desacetiló para dar A-40926. Después de la desacetilación,
15 A-40926 se purificó por cromatografía en columna en poliamida como se describe a continuación. La siguiente descripción es representativa del procedimiento de reproducción actual. Las cantidades indicadas en este documento son aproximadamente 1/4 de las cantidades usadas habitualmente en una preparación industrial.

Desacetilación de A-40926

Se ajustaron 10 m³ de caldo de fermentación (23°C) que contenía un total de aproximadamente 1 g/l de A-40926 y su derivado acetilo, con agitación, a pH 11,4 con NaOH al 30%. La agitación se continuó durante 6 horas, después la temperatura se redujo a 15°C y el caldo se sometió a microfiltración
25 (Koch Protosep IV Microfilter con una membrana cerámica 0,1 µ de 0,12 m²).

Durante la microfiltración, se añadió continuamente agua al material retenido para obtener, al final del proceso, un material permeado de 20-25 m³ y un material retenido de 4,5-5 m³ (la mitad del valor de partida).

El material permeado, que contenía A-40926, se analizó por HPLC.

- 5 Cuando se completó la desacetilación, el pH de la solución permeada se ajustó a pH 7 con ácido sulfúrico al 30% (almacenado a 20°C). En este ejemplo, se obtuvieron 25 m³ de caldo filtrado que contenía 6,62 kg de A-40926 (268 mg/l). El rendimiento de desacetilación fue del 66,2%. Si el procedimiento de microfiltración se realizara durante un período de tiempo mayor y con un
- 10 volumen de extracción mayor que los empleados en este proceso, el rendimiento podría aumentarse hasta un 90%.

Purificación de A-40926 en columna de poliamida

- Después de la extracción, el A-40926 contenido en el caldo filtrado se purificó en una columna de poliamida como se describe a continuación. La
- 15 cantidad indicada en esta descripción es aproximadamente 1/10 de la cantidad usada habitualmente en una preparación industrial y es representativa del procedimiento de producción actual.

- Se suspendieron 500 l de resina de poliamida SC6 (de Macherey Nagel) en agua desmineralizada y se introdujeron en una columna. La resina después
- 20 se acondicionó a pH 6-6,5 eluyendo la columna con al menos 2 BV (volumen de lecho) de una solución tampón preparada disolviendo 4 kg de carbonato sódico en 800 l de agua y ajustando el pH de la solución resultante con ácido acético.

- El caldo filtrado con A-40926 (9000 l; ensayo 0,275 mg/l; A-40926 2475
- 25 g; pH±0,2; temperatura 10±3°C) se introdujo en la columna a aproximadamente

5 g de actividad por litro de resina (normalmente se usó una proporción de actividad/resina de 5-8 g/l). La columna se lavó con las siguientes soluciones: 3 BV (1500 l) de una solución de pH 6 preparada disolviendo 7,5 kg de carbonato sódico en 1500 l de agua desmineralizada y ajustado el pH con ácido acético; 4 BV (2000 l) de una solución a pH 8 preparada disolviendo 10 kg de carbonato sódico en 2000 l de agua desmineralizada y ajustando el pH con ácido acético; 1,5 BV (750 l) de una solución a pH 9 preparada disolviendo 4 kg de carbonato sódico en 750 l de agua desmineralizada y ajustando el pH con ácido acético.

Se recuperó A-40926 de la columna eluyendo con 4 BV (2000 l) de una solución tampón a pH 10 preparada disolviendo 10 kg de carbonato sódico en 2000 l de agua desmineralizada y ajustado el pH con ácido acético. Se recogieron las fracciones que contenían A-40926 purificado (concentración de A-40926 mayor de 0,5 g/l y porcentaje de área de HPLC del componente principal (Bo+B₁) mayor del 80%), se neutralizaron con HCl 1 N y se analizaron por HPLC. Se obtuvieron aproximadamente 2000 l de una solución final transparente.

La resina usada para la purificación se regeneró con 1,5 BV de una mezcla 1:1 de isopropanol/NaOH al 5% seguido de un lavado con 5 BV de agua desmineralizada.

20 Concentración de A-40926

La solución procedente de la columna se sometió a varios pases de etapas de dilución/concentración para eliminar la mayor parte de las sales inorgánicas presentes en la solución. La solución se concentró hasta 80 l por nanofiltración usando una membrana con un límite de 250 D, se diluyó con 80 l de agua desmineralizada y se volvió a concentrar al volumen de partida (80 l)

240 A

por nanofiltración. Esta operación se repitió al menos 5 veces. El pH de la solución final (80 l, pH 7,5) se ajustó a pH 6,3 con HCl al 23%. La solución después se diluyó con 80 l de acetona y su pH se ajustó de nuevo a pH 2,6 con HCl al 23%.

5 **Decoloración**

A la solución obtenida en la etapa anterior (160 l) se le añadieron en agitación 680 g de carbón PA 200 C (~0,3 g/g de A-40926). La agitación se continuó durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente, y después se añadieron aproximadamente 0,5-0,6 kg de co-adyuvante de filtración (DIF-BO).

- 10 La mezcla se filtró a través de un cartucho de filtración. La solución transparente obtenida se concentró al vacío (45°C) para reducir la acetona por debajo del 10%. El volumen final fue de aproximadamente 100 l. El pH después se ajustó a 6,7 con NaOH ac., y la etapa de concentración se continuó usando el nanofiltro habitual hasta que la concentración de A-40926 fue de
- 15 aproximadamente 100 g/l. Se obtuvieron 20 l de solución concentrada (A-40926 1884 g, 94,2 g/l).

Precipitación y secado

- La solución previa se diluyó con agitación con 20 l de acetona, y su pH se ajustó a 5,1 con HCl al 10%. A esta solución se le añadieron 5 volúmenes
- 20 más de acetona (100 l) para completar la precipitación de A-40926. Si el contenido de agua no era <15% en este punto, se añadía más acetona. Después de 2 horas, la suspensión se centrifugó y el sólido se lavó 3 veces con 10 l de acetona recién preparada. Las aguas madre se analizaron y desecharon después de haber determinado la ausencia de producto.

- 25 El sólido A-40926 se secó a presión reducida a 30-35°C en un secador

24 2

estático hasta que la acetona residual estuvo por debajo del 2% y el contenido de agua era menor del 10%. El producto después se tamizó a través de un tamiz de malla 50 obteniéndose 2,08 kg de A-40926 purificado (análisis por HPLC 81,4%; agua 6,2%; cenizas sulfatadas 4,8%). El rendimiento, a partir de la actividad cargada en la columna, fue del 68,4%.

Síntesis de Dalbavancina

Se preparó Dalbavancina (BI-397) a partir del glicopéptido natural A-40926 a través de una síntesis de tres etapas como se describe en Malabarba and Donadio (1999), *Drugs of the Future*, 24(8):839-846. Específicamente, A-40926 primero se sometió a una etapa de esterificación para obtener MA, que después se sometió a una etapa de amidación para obtener MA-A-1. Una etapa final de hidrólisis después convirtió MA-A-1 en dalbavancina.

Etapas de esterificación (Etapas 1)

La siguiente descripción es representativa del procedimiento actual en uso.

Preparación de H₂SO₄ al 96%/MeOH (Solución A)

En un matraz de fondo redondo de 15 l equipado con un agitador mecánico y un termómetro, se añadieron gota a gota 2,28 l de H₂SO₄ al 96% (~300 ml de H₂SO₄ al 96% por kg de A-40926 en polvo) a 7,9 l de MeOH. Se usó un baño de hielo externo para mantener la temperatura entre 0 y 5°C.

Procedimiento de reacción

El material de partida A-40926 (7,6 kg; lote 019, análisis 85,09%; actividad 6,46 kg; 3,73 mol) se suspendió en un reactor revestido de vidrio de 140 l en MeOH (46 l) y la suspensión resultante se enfrió a 0°C ± 2°C. A esta temperatura la suspensión se trató con la Solución A preparada previamente

242 7/8

(H₂SO₄/MeOH). La solución resultante se agitó a 0°C durante 22-26 horas mientras que la reacción (una alícuota de reacción diluida 100 veces con una mezcla 1:1 de acetonitrilo/agua) se controló por análisis de HPLC cada dos horas. La esterificación se consideró completa cuando el A-40926 residual fue menor del 5% y el diéster no era mayor del 10% como porcentaje de área de HPLC.

Aislamiento de éster (MA)

Cuando se completó la reacción, la mezcla se enfrió a -5°C (± 2°C) y se diluyó con el mismo volumen de agua fría (54 l) manteniendo la temperatura por debajo de 5°C. El producto (MA) se precipitó ajustando el pH de la solución a 5,5 (±0,2) añadiendo lentamente 10,2 l de trietilamina (TEA). La agitación se continuó durante una hora más a 0-2°C, después se centrifugó el sólido obtenido, se lavó con agua (10 l por kg de A-40926) y finalmente con MeOH (3 l de MeOH por kg de A-40926 de partida) previamente enfriado a 10-15°C. El lavado con agua se realizó principalmente para retirar los sulfatos de MA.

Las aguas madre y los lavados se analizaron por separado y se desecharon si contenían menos de un 1-2% de actividad. El producto se secó al vacío (50 mmHg) (6,67 kPa) a 35-40°C (temperatura externa) hasta que el agua residual fue menor del 10%. Se obtuvieron 7,6 kg de MA (actividad 5,63 kg, 3,23 mol) en forma de un polvo pardusco.

El análisis demostró los siguientes valores de % de área de HPLC: MA 89,8.

A-40926 3,2, derivado diéster 5,9. El análisis de HPLC fue 74,2%, actividad 5,637 kg; 3,23 mol; rendimiento = 86,5%. Este material se usó en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

Etapas de amidación (Etapas 2)

La siguiente descripción es representativa del procedimiento de producción actual.

Preparación de la mezcla de DMSO / HCl (Solución B)

- 5 Se puso DMSO (1,6 l) en un matraz de fondo redondo de 10 l, equipado con un agitador mecánico y un termómetro, y se enfrió con un baño de hielo por debajo de 10°C. Después se añadió lentamente HCl al 37% (1 l) con agitación, manteniendo la temperatura de la mezcla por debajo de 25°C.

Procedimiento de amidación (producción de MA-A-1)

- 10 Se disolvieron lentamente 5,95 kg de material de partida MA (ensayo 76,3%, KF 8,9%; 2,68 mol) con agitación en 19,2 l de una mezcla 1:1 de DMSO/MeOH (~1,6 l de DMSO y 1,6 l de MeOH por kg de MA en polvo) a temperatura ambiente. Después de 1 hora de agitación, se añadieron 709 ml de 3-(dimetilamino)-propilamina (DMEPA, PM 102,1 densidad = 0,812 g/ml;
- 15 5,63 mol; 1,96 moles por mol de MA de partida) y 325 g de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT-H₂O; PM 153,1; 2,04 mol; 0,71 moles por mol de MA de partida) a la mezcla de reacción. La agitación se continuó hasta que se obtuvo una disolución completa y después la mezcla se ajustó a pH 3-3,1 (medido después de diluir una alícuota de la reacción 10 veces con agua)
- 20 añadiendo lentamente aproximadamente 2,0 l de solución B (DMSO/HCl).

- A la mezcla de reacción agitada se le añadió en 10 minutos una solución de diciclohexilcarbodiámid (DCC), preparada disolviendo 1,03 kg de DCC (4,99 mol; PM 206,3; 1,74 mol por mol de MA) en 4,1 l de una mezcla 1:1 de DMSO/MeOH. La agitación se continuó durante 5 horas y después se
- 25 añadieron 51,5 g adicionales de DCC sólida (0,25 mol) a la mezcla de reacción

2447

para reducir el MA residual por debajo del 5%, manteniendo el nivel de isoureas por debajo del 4-5%. Las isoureas son un grupo de subproductos producidos por reacción adicional de dalbavancina con el exceso de DCC.

5 Típicamente después de dos horas adicionales (7 horas en total) la reacción se completó. Al final la mezcla se diluyó con agua (60 l) para reducir la concentración de DMSO al 15% (v/v) y se ajustó a pH 2,3 con HCl 1 N (0,85 l) para destruir toda la DCC residual.

Hidrólisis de MA-A-1 para dar Dalbavancina (Etapa 3)

10 Después de 30 minutos, la mezcla se ajustó a pH 12,0-12,1 con NaOH al 15% (8 l). La agitación se continuó durante 4 horas manteniendo la mezcla a este pH con pequeñas adiciones de NaOH al 15%. Después de este período de tiempo, el contenido residual de MA-A-1 era menor del 0,2% como % de área de HPLC.

15 La mezcla después se acidificó a pH 3,0 con HCl 1 N (19 l) y la suspensión se filtró para retirar la dicitclohexil urea formada. La torta sólida se lavó sobre el filtro con agua desmineralizada (2x20 l). Los lavados y el filtrado se reunieron, obteniendo una solución transparente que se analizó por HPLC. Se obtuvieron 152,8 l de solución que contenía 21,74 g/l de dalbavancina (actividad total 3322 g; 1,828 mol, rendimiento = 68,2%).

20 **Purificación de dalbavancina**

La siguiente descripción es representativa del procedimiento de producción actual.

25 Los 152,8 l de solución obtenidos a partir de la etapa de hidrólisis y que contenían 3322 g de actividad de Dalbavancina se dividieron en dos partes y cada una se purificó por separado en la misma columna cromatográfica que

contenía 400 l de poliamida. En estos dos procesos de purificación, las proporciones de actividad/resina fueron de 4,3 y 4,0 g/l respectivamente.

Preparación de columna de poliamida

La columna revestida de vidrio (diámetro interno = 40 cm, altura = 320
5 cm) que contenía 400 l de resina de poliamida se limpió de acuerdo con los procedimientos de regeneración de resina (véase a continuación) y se acondicionó con 2 BV (800 l) de agua desmineralizada acidificada con 4 l de AcOH (pH 3,2).

Purificación de la primera porción

10 La primera porción de 76,4 l de solución de partida se diluyó con H₂O (56 l) para reducir el contenido de DMSO por debajo del 5% v/v y se acidificó hasta pH 2,78 con HCl 1 N (3,4 l). Esta solución después se introdujo en la columna a un caudal de 150 l/h. Después de la carga, la resina se lavó con las siguientes soluciones: 4 BV (1600 l) de H₂O acidificada con AcOH (8 l), pH = 3,2; 5 BV
15 (2000 l) de AcONa 0,1 M, pH = 8,2; 1 BV (400 l) de H₂O acidificada con AcOH (1 l), pH = 3,2. La dalbavancina se eluyó con 4 BV (2400 l) de H₂O/MeOH (8:2) acidificado con AcOH (6 l), pH = 3,4.

Durante la etapa de elución, se recogieron 22 fracciones de 50-60 l cada una y se analizaron por HPLC. Las fracciones de 9 a 25 (concentración de
20 Dalbavancina mayor de 0,5 g/l y porcentaje de área de HPLC de (B₀+B₁) ≥ 80%) se reunieron, obteniéndose 969 l de solución con 1,56 kg de Dalbavancina (rendimiento = 93,9%). Esta solución después se concentró por nanofiltración, obteniéndose 125,7 l de solución con 1,38 kg de Dalbavancina. Se neutralizaron y desecharon 850 l de material permeado, que contenía 145 g
25 de Dalbavancina impura (8,7%).

Regeneración de la resina

Antes de reutilizar la resina se lavó con las siguientes soluciones: 2,5 BV (1000 l) de una mezcla 1:1 de MeOH/agua acidificada con ácido acético (2,5 ml/l); 2,5 BV (1000 l) de una mezcla 1:1 de NaOH al 0,5%/isopropanol; 10 BV (4000 l) de agua desmineralizada. La resina después se reequilibró con BV (800 l) de agua acidificada con ácido acético (2,5 ml/l).

Purificación de la segunda porción

La segunda porción de la solución de partida procedente de la etapa de hidrólisis (76,5 l) se diluyó con H₂O (56 l) para reducir el contenido de DMSO por debajo del 5% (v/v) y se acidificó hasta pH 2,87 con 3,0 l de HCl 1 N. La porción después se purificó como se ha descrito previamente en la purificación de la primera porción. Las fracciones reunidas (vol. = 972 l, Dalbavancina 1,54 kg, rendimiento = 92,7%) se concentraron por nanofiltración, obteniéndose 133 l de solución con 1,46 kg de actividad. Se desecharon 850 l de material permeado, que contenía 73 g de Dalbavancina (4,3%).

Las soluciones concentradas procedentes de las dos etapas de purificación se reanalizaron y se reunieron dando 258 l de solución que contenía 2840 g de Dalbavancina purificada. El rendimiento de la purificación fue del 86%. El rendimiento total, a partir de MA, fue del 58,3%.

Regeneración final de poliamida

Después del segundo proceso de purificación, la poliamida se regeneró con: 2,5 BV de una mezcla 1:1 de MeOH-agua, acidificada con AcOH (2,5 l) a pH = 3,4; 2,5 BV de una mezcla 1:1 de NaOH al 0,5%-isopropanol; 10 BV de agua desmineralizada.

Decoloración y precipitación de Dalbavancina

247

Se añadieron 1,5 moles de HCl 1 N por mol de Dalbavancina y 0,3 g de carbón CG1 (0,85 kg de NORIT) por gramo de Dalbavancina, a la solución de 258 l obtenida anteriormente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante al menos 45 min. El pH era 3,1. La suspensión se filtró después en un
5 cartucho SUPRA DISC mod. SDP-EK1 de SEITZ-SCHENK, y la torta se lavó con 50 l de H₂O/MeOH 8:2. El filtrado se analizó y se concentró de nuevo por nanofiltración, usando una membrana MPS 44 con un límite de 250 D. Se obtuvieron 21,3 l de solución concentrada que contiene 119 g/l de Dalbavancina (pH 4,1; MeOH al 1,9%, GC). Se añadieron finalmente 909 ml de
10 HCL 1N para ajustar el pH hasta 2,63, lo que corresponde a la proporción de salificación de 1,65 mol_{HCl}/mol_{Dalbavancina}.

La solución (22,2 l) se vertió, en agitación, en 200 l de acetona. El sólido obtenido después de decantar, se centrifugó y se lavó con 14 l de acetona recién preparada. El producto se secó después a presión reducida (50 mm Hg)
15 (6,67 kPa) a 35°C, manteniendo la temperatura interna por debajo de 30°C durante 17 horas. Durante el procedimiento de secado, se pulverizó 1 l de agua baja en endotoxinas (<250 UE/ml), dividido en dos porciones de 0,5 l cada una, sobre el sólido después de tres y cinco horas para retirar la acetona residual que de otro modo es difícil de eliminar. El producto se tamizó después (malla
20 50), obteniéndose 2592 g de Dalbavancina (Ensayo HPLC 82,4%; agua (KF) 14%; Cl⁻ 3,0%).

Ejemplo 14. Procedimientos Alternativos para la Preparación de A-40926 y de Dalbavancina

Los procedimientos descritos a continuación son procedimientos alternativos que pueden usarse en el procedimiento de preparación de A-40926 y Dalbavancina.

Preparación de A-40926 en XAD-7 HP

5 Desacetilación y microfiltración del micelio

Se agitaron 150 l de caldo de fermentación que contenía A-40926 (pH 7) en un reactor adecuado a temperatura ambiente (24°C), y se ajustaron a pH 11,5 con una solución de NaOH 2,5 N (2,5 l). Después de 4 horas de agitación, el caldo se ajustó a pH 10,6 con HCl al 15%, y se microfiltró a través de una
10 membrana de 0,2 micrómetros. Se recogieron 439 l de permeado transparente y se concentraron después mediante nanofiltración usando una membrana MPS 44 con un límite de 250 D. La solución concentrada de A-40926 obtenida (58,6 l; 3,89 g/l) se ajustó a pH 6,4 y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Preparación de la Columna y Purificación

15 Se suspendió resina XAD-7 HP (8 l) en una solución 1:1 de agua/metanol, se filtró y se cargó en una columna de vidrio apropiada (diámetro interno 12 cm) con una bomba peristáltica.

La resina se lavó después con agua y se equilibró con 6 BV de una solución acuosa de carbonato sódico tamponada a pH 6 preparada disolviendo
20 5 g de carbonato sódico por litro de agua y ajustando el pH con ácido acético.

Se introdujo una porción de caldo concentrado que contenía 194 g de A-40926 en la columna de XAD-7 HP. La resina se lavó después con las siguientes dos soluciones tamponadas, a un caudal de ½ BV/hora, para eliminar parte de las sustancias hidrófilas y coloreadas presentes: 3 BV (24 l)
25 de solución ac. De Ácido Acético al 0,5% ajustada a pH 5 con hidróxido de

sodio al 30%; 5 BV (40 l) de una mezcla 8:2 de agua/acetona con 5 ml de ácido acético/l de agua.

El A-40926 se eluyó finalmente con 8 BV (64 l) de una mezcla 1:1 de agua/acetona acidificada con 5 ml de ácido acético/l de agua. Se recogieron 16 fracciones de 4 l cada una. Se reunieron las fracciones ricas (de la 5 a la 15) en las que la concentración de A-40926 era mayor de 0,5 g/l, obteniéndose una solución que contenía 163,4 g de A-40926 (43 l, 3,8 g/l). El rendimiento de la columna fue del 81,3%. Se descartaron las otras fracciones (200 l) que contenían 0,23 g/l (45,3 g; 22,2%) de A-40926 menos puro.

Después de la elución, se regeneró la resina con 6 BV (55 l) de mezcla (1:1) de NaOH al 0,5%/isopropanol, y finalmente se lavó hasta neutralizar con 10 BV de agua.

Tratamiento con carbón

La fracciones recogidas se ajustaron a pH 2,5 con HCl al 37% (70 ml) y después se decoloraron con 50 g de carbón tipo PA 200 (0,3 g/g de A-40926). La suspensión obtenida se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y después se filtró a través de un filtro KS 50 (d = 25 cm, tiempo = 2,5 horas), obteniéndose 45,6 l de una solución de A-40926 ligeramente amarilla (3,5 g/l; rendimiento = 96,4%)

Concentración

La solución decolorada se ajustó a pH 7 con NaOH al 30% (230 ml) y se concentró mediante nanofiltración y ultrafiltración. El uso de estas técnicas fue importante para la eliminación de las sustancias hidrófilas que se detectaron en los cromatogramas de HPLC a $R_t = 2-4$ minutos. Cuando el material retenido se concentró hasta 1/10 del volumen de partida (4 l), se añadió el mismo

volumen de agua y la solución obtenida se concentró de nuevo. Esta etapa de concentración/dilución se repitió tres veces para reducir la acetona residual al 0,25%. La solución final (2,2 l, 146,3 g de A-40926, 66,5 g/l, rendimiento = 91,5%) se analizó mediante HPLC. El rendimiento de purificación fue del 5 75,4%.

Cristalización de A-40926

Se concentró adicionalmente una porción de 300 ml de la solución de A-40926 (19,9 g de A-40926) hasta 100 ml usando un ultrafiltrador a escala de laboratorio y después se calentó a 60-65°C. El pH de esta solución se ajustó 10 hasta 7 (NaOH al 30%), y se añadieron gota a gota 1,2 ml de mezcla 5:1 de acetona/isopropanol por ml de solución concentrada a esta temperatura. La mezcla resultante se dejó enfriar a 20°C. Después de 1,5 horas, el sólido obtenido se filtró, se lavó sobre el filtro con acetona, y se secó a 40°C durante 15 horas. Se obtuvieron 20,6 g de producto (ensayo HPLC 82,0%; A-40926 15 16,9 g). El rendimiento de precipitación fue del 84,9%. El rendimiento global, partiendo del caldo filtrado, fue de aproximadamente el 64%.

Preparación de A-40926 en CG-71

Preparación de la columna

Se vertió resina CG-71 (350 ml) en una columna de vidrio (diámetro 20 interno = 4 cm) y se lavó con agua. La resina se equilibró con 3 BV de una solución de carbonato sódico, preparada disolviendo 5 g de carbonato sódico en agua a pH 6 con ácido acético. Se introdujeron 250 ml de caldo de fermentación (pH 7) que contenía 14,7 g de A-40926 en la columna (42 g/l de resina). La resina se lavó con las siguientes tres soluciones: 1050 ml (3 BV) de 25 solución acuosa de carbonato sódico (5 g/l) ajustada a pH 6 con ácido acético;

1750 ml (5 BV) de solución acuosa de carbonato sódico (5 g/l) ajustada a pH 8 con ácido acético; 3150 ml (9 BV) de solución acuosa de carbonato sódico (5 g/l) ajustada a pH 9 con ácido acético.

La actividad se eluyó después con 10 BV de agua desmineralizada. Se
5 recogieron 20 fracciones de 500 ml cada una. Las fracciones 12 a 15 se juntaron, obteniéndose 2,2 l de solución purificada que contenía 11,7 g de A-40926 (rendimiento = 79,6%). Esta solución se concentró después por ultrafiltración y la solución concentrada se diluyó adicionalmente con agua desmineralizada y se ultrafiltró de nuevo. La solución obtenida se concentró
10 adicionalmente a presión reducida hasta 50 ml.

Cristalización del A-40926

La solución concentrada se calentó a 60°C y se trató en agitación con una mezcla 5:1 de acetona/IPA (60 ml). La mezcla se enfrió después lentamente hasta temperatura ambiente. El sólido obtenido se filtró, se lavó con
15 acetona sobre el filtro, y se secó al vacío a 35°C durante 80 horas. Se obtuvieron 8,9 g de A-40926 purificado (ensayo HPLC 84,2%). El rendimiento global fue del 51%.

Etapas de amidación alternativa en la síntesis de dalbavancina usando N-metil-2-pirrolidina (NMP) como disolvente

20 La mezcla MA se añadió porción a porción en agitación a una mezcla 1:1 de NMP/MeOH (64 ml). La agitación a 20-25°C se continuó hasta la disolución completa, después se añadieron DMEPA (2,42 ml; 1,96 mol/eq_{MA}) y HOBT (1,06 g; 0,71 mol/eq_{MA}). El pH de la mezcla de reacción (comprobado en una muestra diluida 1:10 con agua) se ajustó a 3,0 con 9,37 ml de HCl al 15% en
25 NMP (preparado previamente a partir de 34,0 ml de HCl al 37% disuelto en

252

57,7 ml de NMP). Después se añadió en agitación una solución 1:1 de DCC (3,17 g; 1,57 mol/eq_{MA}) en NMP/MeOH (12,7 ml). La reacción se controló mediante HPLC. La reacción estaba completa después de aproximadamente 6 horas (MA-A-1 88,9%, MA 7,3%, ISO 3,7%). Este experimento sugiere que NMP puede ser una alternativa conveniente a DMSO para la reacción de amidación. Este cambio de disolvente no influyó en el procedimiento general y la Dalbavancina final obtenida fue químicamente equivalente a otros lotes.

***Procedimiento alternativo de preparación de Dalbavancina:
Procedimiento de un recipiente***

10 Se suspendieron 10 g de complejo A-40926 (título de HPLC 80,66%, 4,6 mmoles) en 24 ml de MeOH en agitación a temperatura ambiente en un reactor de vidrio de 100 ml. La mezcla se enfrió a 0°C, y se añadió una solución de 4 g de HCl (g) en 16,4 ml de MeOH para completar la solubilización del producto. Después se dejó subir la temperatura a 20°C mientras se continuaba la
15 agitación durante 24 horas adicionales.

Después de este tiempo, se añadieron 40 ml de DMSO y 0,4 g de HOBT a la mezcla de reacción.

Después se añadió 1,1-dimetilamina propilamina, ajustando el pH de la mezcla de reacción resultante entre 3-3,1 (medido después de diluir una
20 muestra 9:1 con agua). Se añadieron después 1,8 g de DCC sólida y se continuó la agitación durante 15 horas adicionales. Después de este periodo de tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un reactor de vidrio de 1 l y se diluyó con 80 ml de agua. El pH se llevó después a 12 añadiendo 240 ml de NaOH al 15%. La agitación se continuó durante 60 min adicionales, y la mezcla
25 se acidificó a pH 2,8 con 260 ml de HCl ac. al 15%. Se obtuvieron

253

aproximadamente 800 ml de solución final transparente que contenía 6,4 g de dalbavancina (rendimiento = 76%)

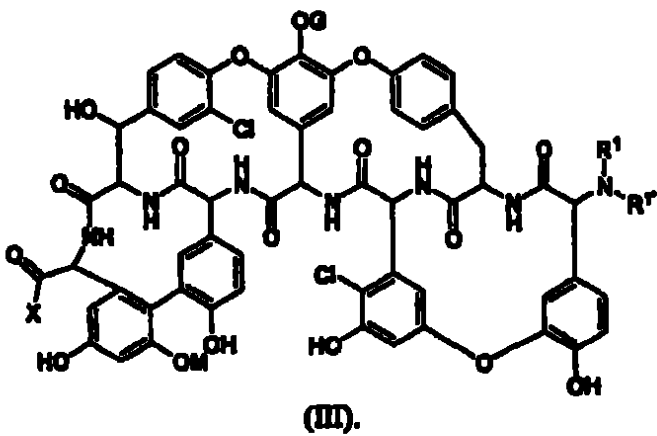
Los análisis de HPLC mostraron que el perfil del producto obtenido es comparable con el obtenido con otros procedimientos de fabricación.

5 **Compuestos Antibióticos de N^{15},N^{15} -Dialquilo**

La presente invención proporciona compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo útiles, por ejemplo, para prevenir y/o tratar infecciones microbianas en mamíferos. Por conveniencia, en la descripción en este documento, los compuestos de dalbavancina se numeran de acuerdo con la Patente de

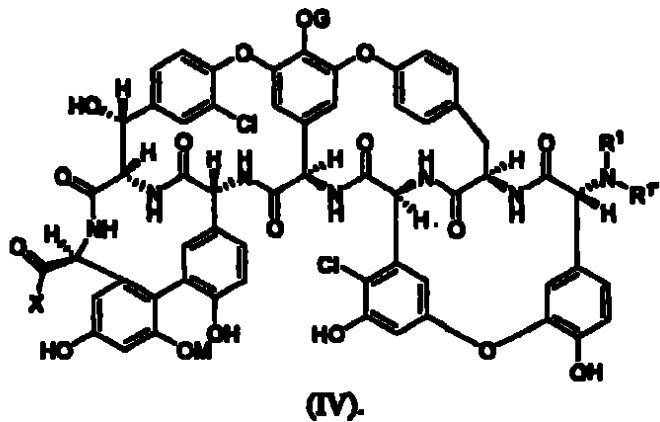
10 Estados Unidos Nº 5.750.509 y como se representa en la Fig. 26.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo de acuerdo con la fórmula (III), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos:



15 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo de acuerdo con la fórmula (IV), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos:

254



Las fórmulas (III) y (IV) proporcionan el núcleo peptídico de los compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo de la invención. El péptido comprende siete aminoácidos con el extremo amino en el lado derecho, como se representa en las fórmulas (III) y (IV), y el extremo carboxilo a la izquierda.

De acuerdo con este aspecto de la invención, los compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo comprenden dos sustituyentes alquilo en el nitrógeno amino terminal, o N^{15} . En otras palabras, en las fórmulas (III) y (IV) R^1 y $R^{1'}$ son alquilo.

En realizaciones preferidas, R^1 y $R^{1'}$ son alquilo C_{1-4} . En ciertas realizaciones, R^1 y $R^{1'}$ se seleccionan cada uno independientemente entre propilo, etilo y metilo. En realizaciones adicionales, R^1 y $R^{1'}$ se seleccionan cada uno independientemente entre etilo y metilo. En realizaciones más preferidas, al menos uno de R^1 y $R^{1'}$ es metilo. En las realizaciones más preferidas, R^1 y $R^{1'}$ son metilo.

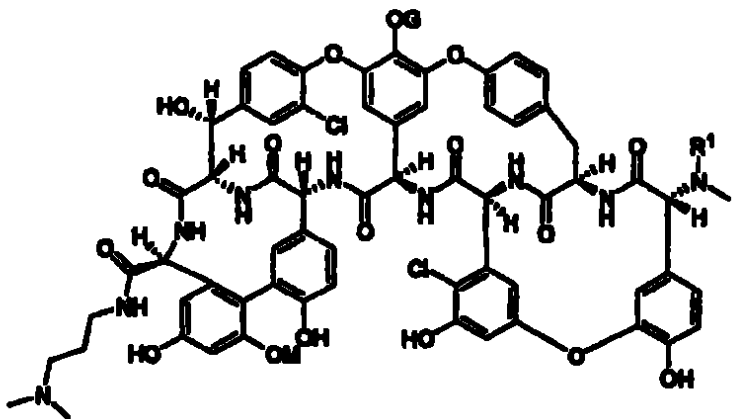
El resto de la molécula puede modificarse de la misma manera que compuestos de dalbavancina conocidos por los especialistas en la técnica. Por consiguiente, X es un grupo aminoalquilamino, como se define en las secciones anteriores. Los grupos aminoalquilamino ejemplares se describen en

25 h

la Patente de Estados Unidos N° 5.750.509. En ciertas realizaciones, X es *N,N*-dimetilaminopropilamino.

Por tanto, en realizaciones particulares, la invención proporciona compuestos de acuerdo con la fórmula (V), o una sal o solvato

5 farmacéuticamente aceptable de los mismos:



(V).

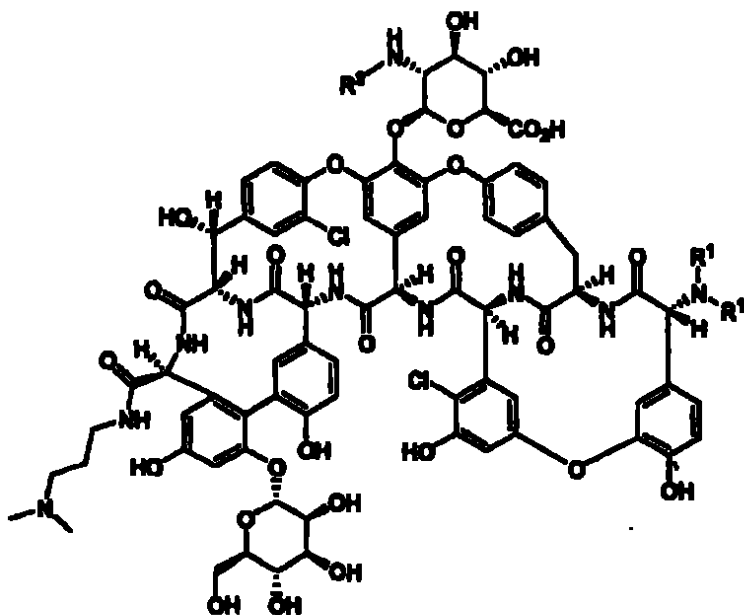
Los compuestos antibióticos de *N*¹⁵,*N*¹⁵-dialquilo de la invención pueden estar glicosilados en una o más posiciones, como saben los especialistas en la técnica. En realizaciones preferidas, los compuestos antibióticos de *N*¹⁵,*N*¹⁵-dialquilo están glicosilados en las posiciones G y M de la fórmula (III) o (IV). En realizaciones particulares, M es hidrógeno o un resto de azúcar. Por ejemplo, M puede ser hidrógeno, α -D-manopiranosil o 6-O-acetil- α -D-manopiranosil. En realizaciones particulares, G es hidrógeno o un resto de azúcar. Por ejemplo, G puede ser hidrógeno o glucuronamina.

En ciertas realizaciones, uno o los dos restos de azúcar pueden estar acilados o acetilados, o las dos cosas. Por ejemplo, cuando G es glucuronamina, el resto de glucuronamina puede estar acilado con un ácido graso. El ácido graso puede ser cualquier ácido graso conocido por los

256

especialistas en la técnica. En realizaciones particulares, el ácido graso se selecciona entre el grupo constituido por ácido 8-metil nonanoico, ácido *n*-decanoico, ácido 9-metil-decanoico, ácido *n*-undecanoico, ácido 10-metil-undecanoico, ácido *n*-dodecanoico, ácido 11-metil-dodecanoico, ácido *n*-tridecanoico, ácido 12-metil-tridecanoico y ácido *n*-tetradecanoico. En realizaciones preferidas, el ácido graso es un ácido graso C₁₂. En realizaciones particulares, el ácido graso es ácido 10-metil-undecanoico.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula (VI), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



(VI).

En la fórmula (VI), R² es acilo C₁₀₋₁₄. En realizaciones particulares R² se selecciona entre el grupo constituido por ácido 8-metil nonanoico, ácido *n*-decanoico, ácido 9-metil-decanoico, ácido *n*-undecanoico, ácido 10-metil-undecanoico, ácido *n*-dodecanoico, ácido 11-metil-dodecanoico, ácido *n*-

257

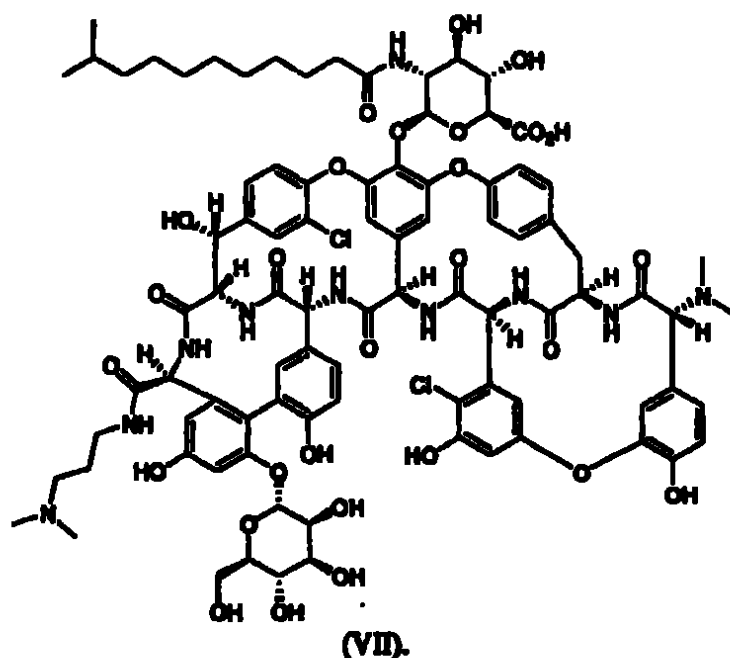
tridecanoico, ácido 12-metil-tridecanoico y ácido *n*-tetradecanoico. En realizaciones preferidas, R² es un ácido graso C₁₂. En realizaciones particulares, R² es ácido 10-metil-undecanoico.

Como se describe en las secciones sintéticas a continuación, los
5 compuestos antibióticos de N¹⁵,N¹⁵-dimetilo pueden sintetizarse a partir de compuestos de dalbavancina. Por consiguiente, ciertos compuestos antibióticos de N¹⁵,N¹⁵-dimetilo de la invención poseen los restos de azúcar y ácidos grasos de dalbavancina A₀, A₁, B₀, B₁, C₀ y C₁.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona
10 compuestos antibióticos de N¹⁵,N¹⁵-dimetilo. Un compuesto antibiótico de N¹⁵,N¹⁵-dimetilo comprende la fórmula (I) o (II) con dos grupos metilo en N¹⁵. El compuesto antibiótico de N¹⁵,N¹⁵-dimetilo puede estar glicosilado con uno o más restos de azúcar como se ha descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, un compuesto antibiótico de N¹⁵,N¹⁵-dimetilo está acilado en uno
15 o más de estos restos de azúcar. En realizaciones preferidas, el grupo acilo es ácido 10-metil-undecanoico.

En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona el compuesto antibiótico de N¹⁵,N¹⁵-dimetilo de acuerdo con la siguiente estructura (VII), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:

258



En ciertas realizaciones, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo de la invención está purificado. Como se usa en este documento, el término purificado indica que el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido en relación a otros compuestos de dalbavancina en una composición. Por ejemplo, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo puede estar enriquecido en relación a una mezcla en la que se produce el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo, por ejemplo una mezcla obtenida de un caldo de fermentación como se describe en los ejemplos a continuación. En ciertas realizaciones, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido dos, tres, cinco, diez, cien, mil o diez mil veces.

En realizaciones adicionales, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está aislado. Como se usa en este documento, el término aislado indica que el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido en relación a compuestos no de dalbavancina en una composición. Por ejemplo, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo puede estar enriquecido en relación

259

a una mezcla en la que se produce el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo, por ejemplo una mezcla obtenida de un caldo de fermentación como se describe en los ejemplos a continuación. En ciertas realizaciones, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido dos, tres, cinco, diez, cien, mil o diez mil veces.

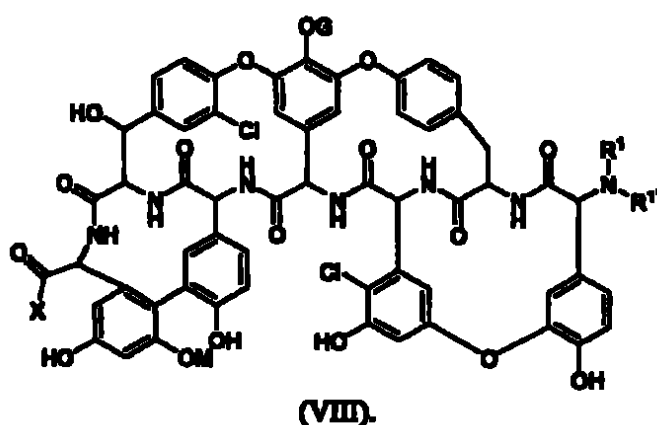
En otras realizaciones adicionales, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está purificado y aislado. Como se usa en este documento, la expresión purificado y aislado indica que el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido en relación a compuestos no de dalbavancina y en relación a otros compuestos de dalbavancina en una composición. Por ejemplo, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo puede estar enriquecido en relación a una mezcla en la que se produce el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo, por ejemplo una mezcla obtenida de un caldo de fermentación como se describe en los ejemplos a continuación. En ciertas realizaciones, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido dos, tres, cinco, diez, cien, mil o diez mil veces.

Compuestos Antibióticos de N^{15},N^{15} -Dialquilo

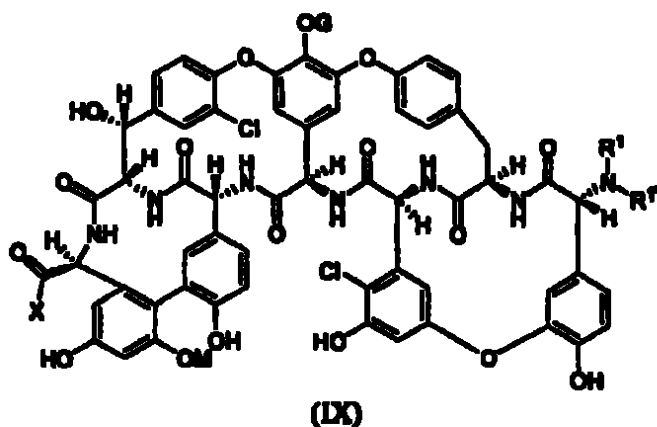
La presente invención proporciona también compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo que tienen un grupo ácido carboxílico en el carbonilo 63. Estos compuestos son útiles, por ejemplo, para preparar compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo de la invención. En ciertas realizaciones, estos compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo son también útiles para prevenir y/o tratar infecciones microbianas en mamíferos.

260

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo de acuerdo con la fórmula (VIII), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos:



5 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo de acuerdo con la fórmula (IX), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos:



Las fórmulas (VIII) y (IX) proporcionan el núcleo peptídico de los
 10 compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo de este aspecto de la invención. El péptido comprende siete aminoácidos con el extremo amino en el lado derecho, como se representa en las fórmulas (III) y (IV), y el extremo carboxilo a la izquierda. De acuerdo con este aspecto de la invención, los compuestos

261 4
CP

antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo comprenden dos sustituyentes alquilo en el nitrógeno amino terminal, o N^{15} . En otras palabras, en las fórmulas (I) y (II) R^1 y $R^{1'}$ son alquilo. Además, en las Fórmulas (VIII) y (IX), X es OH como en compuestos antibióticos de A40926 conocidos por los especialistas en la

5 técnica.

En realizaciones preferidas, R^1 y $R^{1'}$ son alquilo C_{1-4} . En ciertas realizaciones, R^1 y $R^{1'}$ se seleccionan cada uno independientemente entre propilo, etilo y metilo. En realizaciones adicionales, R^1 y $R^{1'}$ se seleccionan cada uno independientemente entre etilo y metilo. En realizaciones más

10 preferidas, al menos uno de R^1 y $R^{1'}$ es metilo. En las realizaciones más preferidas, R^1 y $R^{1'}$ son metilo.

Los compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo de la invención pueden estar glicosilados en una o más posiciones, como saben los especialistas en la técnica. En realizaciones preferidas, los compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -

15 dialquilo están glicosilados en las posiciones G y M de las fórmulas (VIII) y (IX). En realizaciones particulares, M es hidrógeno o un resto de azúcar. Por ejemplo, M puede ser hidrógeno, α -D-manopiranosil o 6-O-acetil- α -D-manopiranosil. En realizaciones particulares, G es hidrógeno o un resto de azúcar. Por ejemplo, G puede ser hidrógeno o glucuronamina.

En ciertas realizaciones, uno o los dos restos de azúcar pueden estar acilados o acetilados, o las dos cosas. Por ejemplo, cuando G es glucuronamina, el resto de glucuronamina puede estar acilado con un ácido graso. El ácido graso puede ser cualquier ácido graso conocido por los especialistas en la técnica. En realizaciones particulares, el ácido graso se

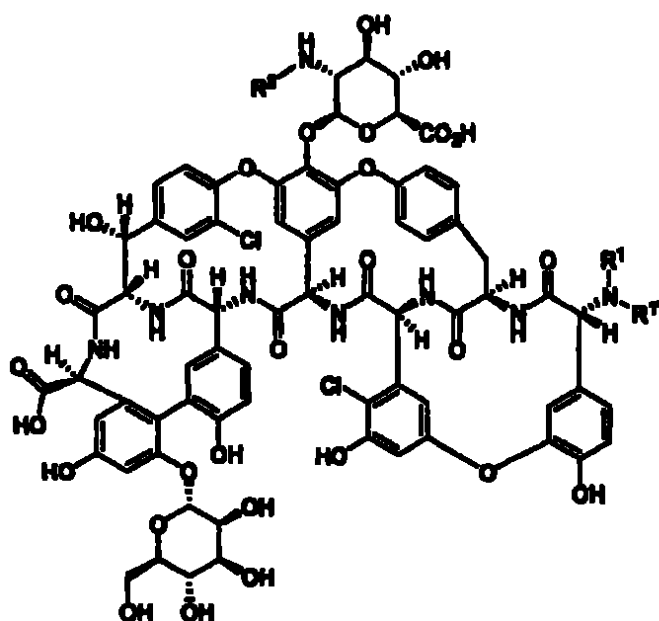
20 selecciona entre el grupo constituido por ácido 8-metil nonanoico, ácido *n*-

25

262

decanoico, ácido 9-metil-decanoico, ácido *n*-undecanoico, ácido 10-metil-undecanoico, ácido *n*-dodecanoico, ácido 11-metil-dodecanoico, ácido *n*-tridecanoico, ácido 12-metil-tridecanoico y ácido *n*-tetradecanoico. En realizaciones preferidas, el ácido graso es un ácido graso C₁₂. En realizaciones
5 particulares, el ácido graso es ácido 10-metil-undecanoico.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula (X), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



(X).

10 En la fórmula (X), R² es acilo C₁₀₋₁₄. En realizaciones particulares R² se selecciona entre el grupo constituido por ácido 8-metil nonanoico, ácido *n*-decanoico, ácido 9-metil-decanoico, ácido *n*-undecanoico, ácido 10-metil-undecanoico, ácido *n*-dodecanoico, ácido 11-metil-dodecanoico, ácido *n*-tridecanoico, ácido 12-metil-tridecanoico y ácido *n*-tetradecanoico. En

2637

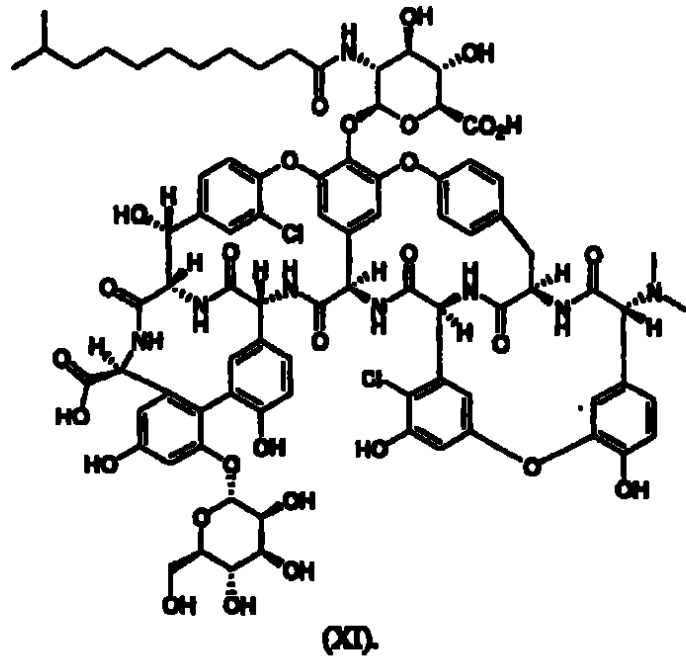
realizaciones preferidas, R^2 es un ácido graso C_{12} . En realizaciones particulares, R^2 es ácido 10-metil-undecanoico.

Como se describe en las secciones sintéticas a continuación, los compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dimetilo pueden sintetizarse a partir de
5 compuestos antibióticos de A 40926. Por consiguiente, ciertos compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dimetilo de la invención poseen los restos de azúcar y ácidos grasos del factor antibiótico de A 40926 A_0 , A_1 , B_0 , B_1 , C_0 y C_1 .

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dimetilo. Un compuesto antibiótico de
10 N^{15},N^{15} -dimetilo comprende la fórmula (VIII) o (IX) con dos grupos metilo en N^{15} . El compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo puede estar glicosilado con uno o más restos de azúcar como se ha descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, un compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo está acilado en uno o más de estos restos de azúcar. En realizaciones preferidas, el grupo acilo es
15 ácido 10-metil-undecanoico.

En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo de acuerdo con la siguiente estructura (XI), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:

264



En ciertas realizaciones, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo de la invención está purificado. Como se usa en este documento, el término purificado indica que el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido en relación a otros compuestos antibióticos en una composición.

5 Por ejemplo, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo puede estar enriquecido en relación a una mezcla en la que se produce el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo, por ejemplo una mezcla obtenida de un caldo de fermentación como se describe en los ejemplos a continuación. En ciertas

10 realizaciones, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido dos, tres, cinco, diez, cien, mil o diez mil veces.

En realizaciones adicionales, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está aislado. Como se usa en este documento, el término aislado indica que el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido en

15 relación a compuestos no antibióticos en una composición. Por ejemplo, el

265

compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo puede estar enriquecido en relación a una mezcla en la que se produce el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo, por ejemplo una mezcla obtenida de un caldo de fermentación como se describe en los ejemplos a continuación. En ciertas realizaciones, el
5 compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido dos, tres, cinco, diez, cien, mil o diez mil veces.

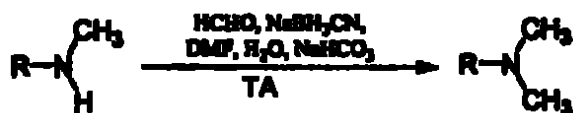
En otras realizaciones, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está purificado y aislado. Como se usa en este documento, la expresión purificado y aislado indica que el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está
10 enriquecido en relación a compuestos no antibióticos y en relación a otros compuestos de dalbavancina en una composición. Por ejemplo, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo puede estar enriquecido en relación a una mezcla en la que se produce el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo, por ejemplo una mezcla obtenida de un caldo de fermentación como se describe en
15 los ejemplos a continuación. En ciertas realizaciones, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo está enriquecido dos, tres, cinco, diez, cien, mil o diez mil veces.

Procedimientos de Fabricación de los Compuestos de la Invención

Los compuestos de la invención pueden fabricarse de acuerdo con
20 cualquier procedimiento evidente para los especialistas en la técnica para preparar dichos compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo.

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo de la invención puede prepararse alquilando el compuesto o composición de N^{15} -monometilo correspondiente mediante
25 cualquier técnica evidente para un especialista en la técnica. Por ejemplo, un

compuesto o composición de N^{15} -monometilo puede metilarse poniendo en contacto el compuesto o composición con una mezcla de HCHO, NaBH_3CN , DMF, H_2O y NaHCO_3 a temperatura ambiente como se ilustra en el Esquema 1. En una realización particular, un compuesto o composición de N^{15} -monometil dalbavancina se disuelve en agua y DMF, a los que se añade formaldehído y bicarbonato sódico seguidos de NaBH_3CN produciendo el compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dimetilo.

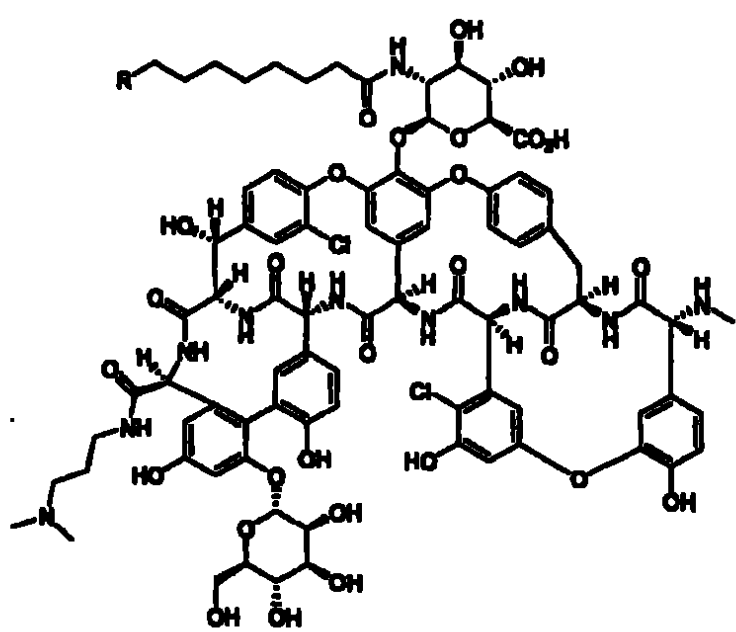


Esquema 1

El compuesto o composición de N^{15} -monometilo correspondiente puede prepararse de acuerdo con técnicas publicadas, tales como las descritas ampliamente en la Patente de Estados Unidos N° 5.750.509 y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2004/0142883, los contenidos de la cuales se incorporan como referencia en su totalidad. En el caso de que los compuestos o composiciones tengan grupos protectores en su nitrógeno N^{15} , pueden retirarse mediante cualquier técnica conocida por el especialista en la técnica.

Los materiales de partida adecuados incluyen dalbavancina A_0 , A_1 , B_0 , B_1 , C_0 y C_1 y factores antibióticos de A 40926 A_0 , A_1 , B_0 , B_1 , C_0 y C_1 . Como se muestra en los ejemplos a continuación, la N^{15}, N^{15} -dimetil dalbavancina B_0 se preparó a partir de dalbavancina B_0 de acuerdo con este procedimiento. La preparación de estos compuestos de dalbavancina se describe ampliamente en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2004/0142883. Estos compuestos de dalbavancina tienen las siguientes estructuras:

267



En las que R es de la siguiente manera:

Compuesto de Dalbavancina	R
A ₀	-CH(CH ₃) ₂
A ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₃
B ₀	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
B ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
C ₀	-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂
C ₁	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃

En realizaciones adicionales, un compuesto antibiótico de *N*¹⁵,*N*¹⁵-
5 dialquilo de la invención puede prepararse a partir de caldo de fermentación de A 40926 antibiótico. El caldo de fermentación que comprende A 40926 antibiótico y compuestos relacionados puede prepararse de acuerdo con técnicas descritas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.750.509

y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2004/0142883. El caldo puede purificarse para producir los compuestos de A 40926 antibiótico deseados, que pueden esterificarse, amidarse e hidrolizarse de acuerdo con la Patente de Estados Unidos N° 5.750.509 y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2004/0142883 para producir una mezcla de compuestos de dalbavancina. Los compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo pueden purificarse y/o aislarse a partir de la mezcla de acuerdo con cualquier técnica evidente para los especialistas en la técnica. En los ejemplos a continuación, se usan técnicas de HPLC para purificar compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención.

Composiciones

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden uno o más compuestos de la invención. Generalmente, las composiciones de la invención comprenden un compuesto de la invención y uno o más compuestos diferentes. Los compuestos diferentes pueden ser compuestos de la invención, compuestos conocidos por los especialistas en la técnica, compuestos aún por descubrir o publicar u otros compuestos.

En ciertas realizaciones, las composiciones son composiciones farmacéuticas, descritas en más detalle en las secciones a continuación.

En realizaciones particulares, las composiciones comprenden un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención y una dalbavancina o compuesto antibiótico de A 40926. La dalbavancina o compuesto antibiótico de A 40926 puede ser cualquier dalbavancina o compuesto antibiótico de A 40926 conocido por los especialistas en la técnica. Los compuestos de dalbavancina ejemplares incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos N°

2699

5.750.509 y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2004/0142883, los contenidos de la cuales se incorporan por la presente como referencia en su totalidad. Los compuestos antibióticos de A 40926 ejemplares se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 4.935.238, 4.868.171 y 5 4.782.042, los contenidos de la cuales se incorporan por la presente como referencia en su totalidad.

Los compuestos de dalbavancina ejemplares incluyen dalbavancina A₀, A₁, B₀, B₁, C₀ y C₁. La preparación de estos compuestos de dalbavancina se describe ampliamente en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados 10 Unidos N° US 2004/0142883. Estos compuestos de dalbavancina se describen adicionalmente en las secciones anteriores. Por supuesto, las composiciones de la invención pueden comprender compuestos de dalbavancina adicionales no enumerados entre los compuestos de dalbavancina ejemplares anteriores.

En ciertas realizaciones las composiciones comprenden multímeros de 15 compuestos de la invención. Los multímeros pueden ser dímeros, trímeros o mayores. Los multímeros pueden ser homomultímeros, heteromultímeros o una mezcla de homomultímeros y heteromultímeros. Por ejemplo, el multímero puede comprender una combinación de cualquiera de los factores presentes en la composición de dalbavancina, incluyendo cualquiera de los factores de 20 dalbavancina A₀, A₁, B₀, B₁, B₂, C₀, C₁, D₀, D₁, MAG, o isoB₀. Por ejemplo, el multímero puede comprender un compuesto de N¹⁵-alquil dalbavancina y un compuesto de N¹⁵,N¹⁵-dialquil dalbavancina. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona también homodímeros de los compuestos de la invención. En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona 25 heterodímeros de los compuestos de la invención con compuestos de

2706
2

dalbavancina. Los compuestos de dalbavancina pueden ser dalbavancinas de la invención o dalbavancinas conocidas por los especialistas en la técnica.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden una cantidad significativa de un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención en relación a dalbavancina o compuestos antibióticos de A 40926. En ciertas realizaciones, en relación a la dalbavancina o compuestos antibióticos de A 40926, el compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención es al menos el 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,6, 1,7, 1,75, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ó 99% de la composición. En realizaciones preferidas, el compuesto es de acuerdo con la fórmula (V).

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden una cantidad significativa de un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención en relación a compuestos de dalbavancina. En ciertas realizaciones, en relación a los compuestos de dalbavancina, el compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención es al menos el 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,6, 1,7, 1,75, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ó 99% de la composición. En realizaciones preferidas, el compuesto es de acuerdo con la fórmula (V).

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden una cantidad significativa de un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención en relación a compuestos antibióticos de A 40926. En ciertas realizaciones, en relación a los compuestos antibióticos de A 40926, el compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención es al menos el 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,6, 1,7, 1,75, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 5,

271 8

10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ó 99% de la composición. En realizaciones preferidas, el compuesto es de acuerdo con la fórmula (V).

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden una cantidad significativa de un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención en relación a otros compuestos. En ciertas realizaciones, el compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención es al menos el 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,6, 1,7, 1,75, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ó 99% de la composición en relación a otros compuestos. En realizaciones preferidas, el compuesto es de acuerdo con la fórmula (V).

En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona composiciones que comprenden dalbavancina A_0 , A_1 , B_0 , B_1 , C_0 , y C_1 junto con un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención donde la cantidad del compuesto de la invención está enriquecida en relación a una o más o todas las dalbavancinas A_0 , A_1 , B_0 , B_1 , C_0 , y C_1 . La composición puede estar enriquecida, por ejemplo, de modo que el compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención es al menos el 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,6, 1,7, 1,75, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ó 99% de la composición en relación a una o mas o todas las dalbavancinas A_0 , A_1 , B_0 , B_1 , C_0 , y C_1 . En realizaciones preferidas, el compuesto es de acuerdo con la fórmula (V).

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden dalbavancina B_0 y un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención. En realizaciones adicionales, la presente

272

invención proporciona composiciones que comprenden dalbavancina B₁ y un compuesto antibiótico de N¹⁵,N¹⁵-dialquilo de la invención. En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona composiciones que comprenden dalbavancina B₀, dalbavancina B₁ y un compuesto antibiótico de N¹⁵,N¹⁵-
5 dialquilo de la invención. En realizaciones preferidas, el compuesto antibiótico de N¹⁵,N¹⁵-dialquilo de la invención es de acuerdo con la fórmula (V). En realizaciones particularmente preferidas, la presente invención proporciona composiciones que comprenden el compuesto de fórmula (V), dalbavancina B₀ y dalbavancina B₁. Estas composiciones pueden estar purificadas, aisladas o
10 purificadas y aisladas. En ciertas realizaciones, las composiciones son un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 98,5, 99 ó 99,5% puras. Por "puras" se entiende que las composiciones comprenden esa cantidad de los compuestos de la composición. Por ejemplo, la composición que comprende el compuesto de fórmula (V), dalbavancina B₀ y dalbavancina B₁ comprendería al menos el 90,
15 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 98,5, 99 ó 99,5% de los tres compuestos en relación a otros compuestos en la composición. Se puede evaluar la pureza por cualquier medio conocido por los especialistas en la técnica tal como HPLC, por ejemplo mediante el % de área bajo la curva.

En las composiciones de la invención, la cantidad de cada componente
20 puede calcularse en peso, por cantidad molar o mediante cualquier otra técnica conocida por los especialistas en la técnica.

Procedimientos de Uso

Se proporcionan procedimientos para la administración de un compuesto o composición antibiótica de N¹⁵,N¹⁵-dialquilo de la invención a un individuo en
25 necesidad de tratamiento para una enfermedad bacteriana. En una realización,

213

el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo es de acuerdo con la fórmula (V). El tratamiento puede incluir profilaxis, terapia, o cura. Los procedimientos incluyen administración de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz.

5 Como se usa en este documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto o composición que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, proporcionará un efecto terapéutico deseado (por ejemplo, reducción o eliminación de una infección bacteriana). Una "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo de, *inter alia*,
10 el compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar, y puede administrarse en una o más dosis. Una "cantidad profilácticamente eficaz", se refiere a una cantidad de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo suficiente para prevenir o reducir la gravedad de una infección bacteriana futura cuando se administra a un
15 individuo que es susceptible a y/o puede contraer una infección bacteriana, por ejemplo, en virtud de un procedimiento médico o estancia en el hospital, o exposición a un individuo con una infección bacteriana. Se puede administrar un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Se puede administrar un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo como una "dosis unitaria" en una formulación antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo que incluye una cantidad del compuesto suficiente para proporcionar un nivel en plasma del compuesto terapéutica o profilácticamente eficaz durante varios días, al menos aproximadamente 5 días, una semana o
25 10 días, cuando se administra a un individuo. En algunas realizaciones, el

274

compuesto es de acuerdo con la fórmula (V). En algunas realizaciones, el compuesto es un componente de una formulación, que incluye una cantidad del compuesto suficiente para proporcionar un nivel terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto durante varios días, a menudo al menos
5 aproximadamente 5 días, una semana, o 10 días. El intervalo de dosificación, o el tiempo entre dosis, puede ser, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más días.

Como se usa en este documento, los términos "individuo" o "sujeto" o
10 "paciente" se usan de forma intercambiable y se refieren a un vertebrado, típicamente un mamífero, a menudo un ser humano.

Además un compuesto o composición de la invención puede formularse con estabilizante que inhibe la degradación del compuesto, la composición, y/o uno o más antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo diferentes u otros componentes
15 antibióticos presentes en la composición. En algunas realizaciones, el estabilizante se selecciona entre el grupo constituido por manitol, lactosa, sacarosa, sorbitol, glicerol, celulosa, trehalosa, maltosa, rafinosa, y mezclas de los mismos. En una realización, una formulación comprende manitol. En otra realización, una formulación comprende además lactosa. En una realización, la
20 composición puede formularse con una proporción de peso de manitol: compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de 1:2. En otra realización, la composición puede formularse con una proporción de peso de manitol:lactosa:compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo de 1:1:4.

En algunas realizaciones, una composición u otra formulación
25 comprende un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dimetilo, un compuesto de

275

dalbavancina, o una combinación de los mismos. Una composición u otra formulación puede administrarse en una dosificación que provoque niveles en plasma terapéuticamente eficaces (es decir bactericidas) del fármaco durante varios días, a menudo de al menos aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días, a menudo al menos aproximadamente una semana. Por ejemplo los compuestos o las composiciones antibióticas de N^{15},N^{15} -dialquilo pueden mantenerse en plasma en o por encima de la concentración bactericida mínima de aproximadamente 4 mg/l durante al menos 5 días. Los compuestos o composiciones antibióticas de N^{15},N^{15} -dialquilo pueden mantenerse a un nivel en plasma de al menos aproximadamente 5 mg/l, al menos aproximadamente 10 mg/l, al menos aproximadamente 20 mg/l, al menos aproximadamente 30 mg/l, al menos aproximadamente 40 mg/l, durante al menos 5 días, al menos aproximadamente una semana o más. Los niveles en plasma de compuestos o composiciones antibióticas de N^{15},N^{15} -dialquilo pueden medirse mediante procedimientos que se conocen bien en la técnica, tales como cromatografía de líquidos, espectrometría de masas, o bioensayo microbiológico.

Los límites superiores para los niveles de concentración en plasma del compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo pueden dictarse mediante dosificaciones que inhiben los efectos adversos inaceptables en la población de pacientes tratada.

Un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse en una única dosis o en múltiples dosis. Cuando se administra como una única dosis, un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede formularse para contener una cantidad suficiente del compuesto(s) antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo para proporcionar las propiedades

276

antibacterianas *in vivo* durante al menos 5 días, como alternativa durante al menos 6 días, como alternativa durante al menos 7 días, como alternativa durante al menos 8 días, como alternativa durante al menos 9 días, como alternativa durante al menos 10 días, como alternativa durante al menos 11 días, como alternativa durante al menos 12 días, como alternativa durante al menos 13 días, como alternativa durante al menos 14 días, como alternativa durante al menos 15 días.

Cuando se emplean múltiples dosis, un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse semanalmente durante dos o más semanas. En una realización, un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse en al menos dos dosis, a menudo en dos dosis separadas por aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días, más a menudo una vez por semana durante dos semanas. En ciertas realizaciones, dicho régimen proporciona ventajas significativas sobre los protocolos de tratamiento con antibióticos convencionales.

Un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede también administrarse en múltiples dosis separadas por dos o más días o al menos una semana, o en una o más dosis bisemanales. En algunas realizaciones, un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse semanalmente, seguida de administración bisemanal, o mensual. En algunas realizaciones, un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse a intervalos semanales durante 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas.

Más ventajosamente, no se requiere la dosificación diaria de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puesto que pueden

277

usarse dosis más altas, y menos frecuentes. Las dosis únicas o múltiples pueden variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 gramos. Una dosis única de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 gramos, por ejemplo, aproximadamente 3 gramos, puede administrarse para
5 diversos tratamientos de infección. Cuando se administran múltiples dosis, por ejemplo, semanalmente, cada dosis puede variar, por ejemplo de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 5 gramos.

Para las realizaciones en las que puede administrarse una única dosis para tratar una infección, la cantidad de la dosis puede ser, por ejemplo,
10 aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 gramos, o aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 gramos, o aproximadamente 1 a aproximadamente 3,5 gramos, o aproximadamente 2 a aproximadamente 3 gramos, por ejemplo, aproximadamente 3 gramos. En algunas realizaciones, una única dosis de aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, ó 3 gramos puede administrarse para el
15 tratamiento de una infección bacteriana. Para realizaciones en las que puede administrarse una única dosis para profilaxis, la cantidad de la dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 gramos, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 gramo, por ejemplo, aproximadamente 0,5 o aproximadamente 0,25 gramos.

20 En programas de dosificación que incluyen múltiples dosificaciones, las dosificaciones individuales pueden ser las mismas o diferentes. En algunas realizaciones, puede administrarse una primera dosis más alta, que puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1,5 a 3 veces más alta, que una o más dosis posteriores. Por ejemplo, la primera dosis puede ser aproximadamente 0,5
25 gramos a aproximadamente 5 gramos y la segunda dosis aproximadamente

273 8p

0,25 gramos a aproximadamente 2,5 gramos, la primera dosis puede ser aproximadamente 0,8 gramos a aproximadamente 2 gramos y la segunda dosis aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1 gramo, o la primera dosis puede ser aproximadamente 0,4 gramos a aproximadamente 3 gramos y la segunda
5 dosis aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1,5 gramos.

En algunas realizaciones, se administran al menos dos dosificaciones donde la primera dosificación incluye aproximadamente dos veces la cantidad de un compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo que las dosificaciones posteriores. En una realización, una primera dosificación incluye
10 aproximadamente 1 gramo del compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo y una dosificación posterior de aproximadamente 0,5 gramos. En otra realización, una primera dosificación incluye aproximadamente 0,5 gramos y una dosificación posterior de aproximadamente 0,25 gramos.

En algunas realizaciones, puede administrarse un compuesto o
15 composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo en dos dosis de cantidades iguales o diferentes separadas por dos o más días o al menos aproximadamente una semana. Por ejemplo, pueden administrarse dos dosis de un compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo separadas por aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días, o separadas por aproximadamente 1 semana. En
20 una realización, pueden administrarse una primera dosificación de aproximadamente 1 gramo y una segunda dosificación de aproximadamente 0,5 gramos de un compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo separadas por aproximadamente 1 semana.

En un régimen de dosificación múltiple, el tiempo entre dosis puede
25 variar, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días, a

279
389

menudo aproximadamente una semana. La frecuencia de dosis puede ser, por ejemplo, dos dosis diarias, o múltiples dosis semanales. El intervalo de dosificación, o tiempo entre dosis, puede ser, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 5 21, 22, 23, 24, 25, o más días. La cantidad de dosis administradas, puede ser, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más dosis, administrándose cada dosis después de la inicial después del intervalo de dosificación seleccionado.

En los programas de dosificación múltiple de ciertas realizaciones, el 10 "nivel pico" o el nivel en plasma de un compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo después de una primera dosis, y justo antes de la administración de una segunda dosis, puede ser de al menos aproximadamente 4 mg/ml. El nivel pico de compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo al final de un intervalo de dosificación tal como 15 aproximadamente una semana puede ser al menos aproximadamente 20 mg/ml, al menos aproximadamente 30 mg/ml, o al menos aproximadamente 40 mg/ml.

Un compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo por vía intramuscular (i.m.), por 20 vía intravenosa (i.v.), por vía subcutánea (s.c.), por vía intraperitoneal (i.p.), o por vía intratecal (i.t.). El programa de dosificación y la dosis exacta administrada pueden variar dependiendo de factores tales como la naturaleza y gravedad de la infección, la edad, peso, y estado general de salud del paciente y la tolerancia de un paciente particular al compuesto o composición antibiótica 25 de N^{15}, N^{15} -dialquilo, pero serán determinables por profesionales sanitarios. En

28070
AN

una realización, una dosis intravenosa de un gramo de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede ser seguida de una dosis intravenosa de 0,5 gramos una semana después.

La administración y liberación del fármaco al paciente, por ejemplo, por
5 vía intravenosa, puede hacerse a una tasa controlada, de modo que la concentración en la sangre no aumente demasiado deprisa o provoque que se produzca la precipitación. En algunas realizaciones, un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse a una tasa apropiada tal que el fármaco forme un complejo con la(s) proteína(s)
10 endógena(s) en el torrente sanguíneo. Sin pretender estar limitada por una teoría particular, puede creerse que la proteína endógena, tal como albúmina de suero humano, puede formar un complejo *in vivo* con una o dos moléculas de un compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo. Cuando está presente una cantidad suficiente de composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo, hasta dos
15 moléculas de compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo pueden unirse a la proteína endógena, y este complejo puede formarse uniendo compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo diferentes en dos sitios de unión diferentes. Como alternativa, es posible que un antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo dimérico se pueda unir a un único sitio de unión en la proteína endógena.

20 La duración de la infusión del compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 horas. Por ejemplo, una duración de la infusión de aproximadamente 30 minutos puede usarse con un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo, y la dosis puede ser aproximadamente 0,5 a
25 aproximadamente 1 gramo. La administración intravenosa en condiciones de

tasa controlada puede generar concentraciones de compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo en el cuerpo que superan enormemente la que puede conseguirse en la fase de solución a pH fisiológico *in vitro*. Aunque no hay ningún deseo de limitarse por la teoría, esto puede deberse a la formación

5 de un complejo de antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo con proteína(s) endógena(s) tales como albúmina de suero, lo que puede aumentar la capacidad del plasma para absorber el compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo.

En ciertas realizaciones, la formación de un complejo antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo *in vitro* o *ex vivo* puede permitir la administración más rápida,

10 tal como al menos aproximadamente 1 minuto, al menos aproximadamente 10 minutos o al menos aproximadamente 20 minutos. Dicho complejo puede conseguirse mezclando albúmina de suero humano y/u otra proteína endógena con un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo, formando de este modo el complejo *in vitro* o *ex vivo*, y administrando después este

15 complejo al paciente tratado. Como alternativa, la albúmina del suero humano u otra proteína endógena puede obtenerse de fuentes autólogas o mediante la expresión de un microorganismo modificado para contener el gen para la proteína.

La cantidad de compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo

20 administrada puede ser cualquiera de las dosificaciones descritas en este documento. La dosis puede elegirse de modo que uno o más compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo permanecerán en un nivel en plasma terapéutica o profilácticamente eficaz (es decir bactericida) durante un período de tiempo prolongado, tal como al menos 5 días, o aproximadamente una

25 semana o más. Se prefiere la administración de una dosis de compuesto o

2024

composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo que produce y mantiene las concentraciones bactericidas durante al menos aproximadamente una semana (o aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días). Una concentración bactericida puede definirse como la concentración de un compuesto o

5 composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo requerida para matar al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente uno cualquiera del 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de las bacterias presentes al inicio de un experimento *in vitro* durante un período de 24 horas. Una concentración

10 bactericida mínima de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo en plasma puede ser de aproximadamente 4 mg/l.

Ejemplos de indicaciones que pueden prevenirse o tratarse usando los compuestos, composiciones, y procedimientos de antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo de la invención incluyen SSTI complicadas y no complicadas,

15 infecciones del torrente sanguíneo (BSI), infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéter (CRBSI), osteomielitis, infecciones de la articulación protésica, profilaxis quirúrgica, endocarditis, neumonía adquirida en el hospital o en la comunidad, neumonía por neumococos, tratamiento empírico de neutropenia febril, infección del espacio articular e infecciones por dispositivos

20 (por ejemplo, marcapasos y desfibriladores cardíacos internos). Puede prevenirse o tratarse infecciones con bacterias gram positivas o resistentes a antibióticos, tales como infección por el género *Bacillus*, *Corynebacteria*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria* o *Clostridium*, en particular *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,

25 *Staphylococcus hemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus*

pneumoniae, *Streptococcus* del grupo A y C, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae* o *Clostridium difficile*. Otras infecciones que pueden prevenirse o tratarse usando los compuestos, composiciones, y procedimientos de antibióticos de N^{15}, N^{15} -dialquilo de la invención incluyen

5 bacterias gram negativas, tales como una infección por género *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* (así como otras proteobacterias), *Francisella*, *Helicobacter*, *Hemophilus*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Morganella*, *Moraxella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio* y *Yersinia*, en

10 particular infecciones por *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, e infecciones por levaduras, tales como *Candida albicans*.

La invención también abarca la prevención y el tratamiento de otras bacterias infecciosas usando los compuestos, composiciones, y procedimientos de la invención, tales como infección por *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sporozoites* (sp.) (por ejemplo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* de Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* de Grupo B), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus bovis*, *Streptococcus*

15 (anaerobic sps.), *pathogenic Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus*

20

moniliformis, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, e *Actinomyces israeli*.

La prevención y tratamiento de infecciones y trastornos descritos en este documento puede realizarse usando los compuestos, composiciones y procedimientos de la invención. En una realización, el compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo es de acuerdo con la fórmula (V). En algunas realizaciones, el sujeto no ha sido tratado previamente con uno o más antibióticos, tales como vancomicina o teicoplanina. En otras realizaciones, el sujeto no se ha tratado previamente con un compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo.

En algunas realizaciones, se ha ensayado previamente en el paciente la resistencia bacteriana a un antibiótico. En otras realizaciones, no se ha ensayado previamente en el paciente la resistencia bacteriana a un antibiótico.

La invención también abarca procedimientos para la prevención o tratamiento de SSTI. Los pacientes que pueden beneficiarse de esta prevención o tratamiento pueden tener infecciones profundas o superficiales. La SSTI puede implicar un tejido blando más profundo y/o requerir una intervención quirúrgica significativa, tal como por ejemplo un absceso principal, una úlcera infectada, una quemadura importante, o celulitis profunda y extensiva. También pueden prevenirse o tratarse heridas quirúrgicas infectadas.

La presentación clínica de infección de la piel y de infección estructural en la piel puede variar de foliculitis leve a fascitis necrotizante grave. El modo de adquisición puede variar también con infecciones de la piel y de la estructura de la piel adquiridas en la comunidad, que son precedidas a menudo por lesiones resultantes de exposición ocupacional, o actividades de recreo, y

se asocian normalmente con una mayor diversidad de patógenos. Las infecciones de la piel y de la estructura de la piel adquiridas en el hospital se asocian generalmente con procedimientos quirúrgicos, el desarrollo de úlceras por presión, y colocación de catéteres. Las infecciones post-quirúrgicas son la

5 tercera infección nosocomial más frecuente, y suponen el 17% de todas las infecciones nosocomiales presentadas al National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS). La fuente más frecuente de infección puede ser la flora endógena del paciente. *Staphylococcus aureus*, los estafilococos coagulasa negativos, y *Enterococcus* sp., son los patógenos más

10 frecuentemente aislados a partir de SSTI.

Los síntomas de infecciones SSTI pueden incluir eritema, molestias o dolor, calor o calentamiento localizado, drenaje o descarga, hinchazón o induración, enrojecimiento, o fluctuancia. Los pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con los procedimientos de la invención incluyen

15 aquellos con infecciones profundas o complicadas o infecciones que requieren intervención quirúrgica, o pacientes con diabetes mellitus subyacente o enfermedad vascular periférica. Estas infecciones están causadas a menudo por bacterias gram positivas tales como especies de *Staphylococcus* o *Streptococcus*, tales como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*.

20 Los procedimientos para el tratamiento de una infección bacteriana de la piel o del tejido blando incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo a un individuo en necesidad de tratamiento, en una cantidad y de acuerdo con un régimen de dosificación como se han descrito anteriormente. En una realización, el

25 compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo es de acuerdo con la fórmula (V). En

una realización, un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo se administra por vía intravenosa en dos dosis, con aproximadamente 5 a aproximadamente 10 días de separación, o con aproximadamente 1 semana de separación. En algunas realizaciones, la primera dosificación incluye al menos el doble del compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo que la segunda dosificación. En una realización, la primera dosificación es de aproximadamente 1000 mg y la segunda es de aproximadamente 500 mg.

Como entenderán los especialistas en la técnica, los procedimientos de dosificación descritos en este documento pueden variar dependiendo de, *inter alia*, el compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar, pero son determinables por un médico sin experimentación excesiva.

La invención también abarca procedimientos para la prevención profiláctica del comienzo de una infección bacteriana, por ejemplo una infección causada por *Staphylococcus aureus*, o por una bacteria del género *Neisseria* o *Clostridium*. En un procedimiento profiláctico de la invención, se administra una cantidad profilácticamente eficaz de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo a un individuo que puede ser susceptible de contraer una infección bacteriana, por ejemplo, a través de un procedimiento médico. El compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse en una cantidad suficiente para proporcionar un nivel en plasma profilácticamente eficaz durante al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, o al menos aproximadamente una semana o más. El compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse, por ejemplo, por vía parenteral, por

287
2

ejemplo, mediante inyección i.m., i.v., i.p., s.c., o i.t., antes de, posteriormente a, o al mismo tiempo que la cirugía como una etapa preventiva contra la infección. El compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse inmediatamente antes o posteriormente a, uno o más días o

5 aproximadamente una semana antes o después de o durante un procedimiento médico invasivo tal como cirugía o una estancia en una instalación de cuidado médico tal como un hospital para prevenir la infección. Puede usarse un procedimiento profiláctico en cualquier situación en la que pueda ser posible o probable que un individuo pueda contraer una infección bacteriana, incluyendo

10 situaciones en las que un individuo se ha expuesto a o puede probablemente exponerse a un individuo infectado por bacterias. Para procedimientos profilácticos, el compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse como una única dosis o como dos o más dosis de cantidades iguales o diferentes que se administran separadas entre sí de varios días a

15 aproximadamente una semana. En una realización, el compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse antes o simultáneamente con la inserción de un catéter intravenoso para prevenir una infección relacionada con el torrente sanguíneo. En una realización, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo es de acuerdo con la fórmula (V).

20 Para procedimientos profilácticos, un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse en una única dosis o en múltiples dosis, de acuerdo con cualquiera de los esquemas de dosificación descritos anteriormente. Un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse como una única dosis que comprende

25 aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 gramos, o aproximadamente 0,1 a

aproximadamente 1 gramo, por ejemplo, aproximadamente 0,25 gramos o aproximadamente 0,5 gramos. En una realización, puede administrarse una única dosis de aproximadamente 0,25 gramos por vía intravenosa durante un marco de tiempo de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 1 hora, por ejemplo, aproximadamente 30 minutos. En otra realización, el compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse por vía intravenosa simultáneamente con la administración de otro tratamiento farmacéutico (por ejemplo, antibióticos).

En cualquiera de los procedimientos terapéuticos o profilácticos descritos anteriormente, el compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse simultáneamente o secuencialmente con al menos un antibiótico diferente. En algunas realizaciones, puede administrarse además del antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo al menos un antibiótico diferente que puede ser eficaz (por ejemplo bactericida) contra una o más especies de bacteria gram negativas y/o una cepa bacteriana gram positiva contra la que el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo no es eficaz. En algunas realizaciones, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo y al menos un antibiótico que puede ser eficaz (por ejemplo bactericida) contra al menos una especie bacteriana gram negativa puede administrarse como una mezcla en la composición de dalbavancina.

Composiciones Farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas formuladas para la administración de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de una

239

dosificación unitaria de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo que incluye una cantidad de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo suficiente para proporcionar un nivel en plasma terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo durante varios días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, o al menos aproximadamente una semana o más cuando el compuesto o composición se administra a un individuo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un nivel en plasma terapéutica o profilácticamente eficaz de compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede ser al menos aproximadamente 4 mg por litro de plasma. Los niveles en plasma de compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo pueden medirse mediante procedimientos que se conocen bien en la técnica, tales como cromatografía de líquidos, espectrometría de masas, o bioensayo microbiológico. Como conocen los especialistas en la técnica, los niveles de otros compuestos o composiciones antibióticas de N^{15},N^{15} -dialquilo en el suero pueden cuantificarse en el suero usando metodologías similares.

Los compuestos y composiciones antibióticas de N^{15},N^{15} -dialquilo pueden estar opcionalmente en forma farmacéuticamente aceptable para la administración a un individuo, por ejemplo, como una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos de sales adecuadas de un compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo incluyen sales formadas mediante reacciones convencionales con ácidos orgánicos e inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, tricloroacético, succínico, cítrico, ascórbico, láctico, maleico, glutámico, alcanfórico, glutámico,

glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, metanosulfónico, bencenosulfónico, sórbico, pícrico, benzoico, cinámico, y similares. Ejemplos representativos de bases que pueden formar sales con dalbavancina incluyen hidróxidos de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos tales como

5 hidróxido de sodio, potasio, calcio, magnesio, y bario, amoníaco y aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas o aromáticas tales como metilamina, dimetilamina, dietilamina, etanolamina, y picolina. (Véase, por ejemplo la Patente de Estados Unidos N° 5.606.036).

En algunas realizaciones, puede proporcionarse una formulación acuosa

10 farmacéuticamente aceptable de un compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo que es adecuada para la administración parenteral, tal como por ejemplo, inyección intravenosa. En una realización, el compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dialquilo es de acuerdo con la fórmula (V). Para preparar dicha formulación acuosa de un compuesto o composición antibiótica de

15 N^{15}, N^{15} -dialquilo, pueden usarse procedimientos bien conocidos en la técnica, y pueden usarse cualesquiera vehículos, diluyentes, excipientes u otros aditivos farmacéuticamente aceptables usados normalmente en la técnica. En una realización, una formulación acuosa farmacéuticamente aceptable para inyección intravenosa incluye dextrosa al 5%.

20 Una composición farmacéutica para administración parenteral comprende un compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo y un diluyente fisiológicamente aceptable tal como agua desionizada, solución salina fisiológica, dextrosa al 5%, disolvente miscible con agua (por ejemplo, alcohol etílico, polietilenglicol, propilenglicol, etc.), un vehículo no acuoso (por ejemplo,

25 aceite, tal como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de

cacahuete, y aceite de sésamo), u otro diluyente comúnmente usado. La formulación puede comprender además un agente solubilizante tal como polietilenglicol, polipropilenglicol, u otro agente solubilizante conocido, tampones para estabilizar la solución (por ejemplo, citratos, acetatos, y fosfatos) y/o antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico o bisulfito sódico) (véase por ejemplo la Patente de Estados Unidos Nº 6.143.739). Otros vehículos farmacéuticamente adecuados y sus formulaciones se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Como se conoce en la técnica, las preparaciones farmacéuticas de la invención pueden también prepararse para contener niveles aceptables de particulados (por ejemplo, sin partículas) y para ser no pirogénicos (por ejemplo, satisfacer los requisitos de un inyectable de la Farmacopea de Estados Unidos).

En una realización, se proporciona una composición farmacéutica disolviendo una dosis seca (por ejemplo liofilizada) de un compuesto o composición antibiótica de N^{15}, N^{15} -dialquilo, que comprende a menudo un estabilizante o mezcla de estabilizantes, en una cantidad de agua y preferiblemente agua desionizada en un volumen suficiente para la solubilización. Por ejemplo, la cantidad de agua suficiente para la solubilización puede ser aproximadamente 10 ml y el pH resultante puede estar por encima de 3,0, y aproximadamente 3,5 a 4,5. Diluir esta solución añadiéndola a una segunda cantidad de un diluyente acuoso, que contiene dextrosa al 5%, tal como una cantidad contenida en un gotero para administración intravenosa, puede elevar el pH de la solución a aproximadamente 5 a 5,5. En otra realización el pH de la solución en un gotero puede ser de aproximadamente 4,5. La segunda cantidad de una solución acuosa puede ser desionizada o

estéril, o tanto desionizada como estéril. En una realización, el diluyente acuoso es dextrosa al 5%. Otros procedimientos de solubilización, y las formulaciones de antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo de los mismos, serán fácilmente evidentes para los especialistas en la técnica.

- 5 Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral pueden prepararse en viales estériles que contienen una o más dosis unitarias del compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz como se ha descrito anteriormente, incluyendo opcionalmente un excipiente, en condiciones en las que la eficacia
- 10 bactericida del compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puedan conservarse. El compuesto o composición puede o puede no estar en forma de un polvo seco (por ejemplo, liofilizado). Antes del uso, puede añadirse un diluyente fisiológicamente aceptable y retirarse la solución mediante una jeringuilla para administrar a un paciente. Una formulación farmacéutica como
- 15 se ha descrito anteriormente puede esterilizarse mediante cualquier medio aceptable incluyendo por ejemplo, procedimientos de esterilización con rayos e o gama, o mediante filtración estéril.

- Una formulación para la administración parenteral puede incluir el compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo a una concentración
- 20 tal como aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg o aproximadamente 2 a aproximadamente 4 mg del compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo por ml de preparación final. En otra realización, el compuesto
- 25 antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo es de acuerdo con la fórmula (V).

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende una mezcla de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo y uno o más antibióticos adicionales. Preferiblemente, al menos un antibiótico no de dalbavancina en la mezcla puede ser eficaz (por ejemplo, bactericida) contra una o más especies de bacterias Gram negativas, tales como, por ejemplo azthreonam, y/o contra una o más cepas de bacterias Gram positivas contra las que el compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede no ser eficaz, tal como por ejemplo linezolid o daptomicina. La mezcla también puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo y uno o más antibióticos adicionales. En algunas realizaciones, la composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo comprende un compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo de acuerdo con la fórmula (V).

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una o más sustancias estabilizantes que inhiben la degradación de uno o más compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo a materiales menos activos o inactivos. Como se usa en este documento, "sustancia estabilizante" o "estabilizante" se refiere a una sustancia que estabiliza el nivel de uno o más compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo presentes en la composición. Una "cantidad estabilizante eficaz" se refiere a una cantidad de un estabilizante suficiente para potenciar la estabilidad de larga duración de uno o más compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo que puedan estar presentes en la composición. En algunas realizaciones, puede proporcionarse una cantidad estabilizante eficaz mediante una mezcla de dos o

más sustancias estabilizantes, cada una de las cuales en solitario puede no estar presente en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto estabilizante.

Los ejemplos de estabilizantes incluyen, por ejemplo, sustancias no iónicas tales como azúcares, por ejemplo, mono, di, o polisacáridos, o derivados de los mismos, alcoholes de azúcares, o polioles. Dichas sustancias estabilizantes incluyen, por ejemplo, manitol, lactosa, sacarosa, sorbitol, glicerol, celulosa, trehalosa, maltosa, rafinosa, o mezclas de los mismos.

En una realización, una formulación antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo comprende manitol. En otra realización, una formulación antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo comprende además lactosa. En una realización, la composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo se formula con una proporción en peso de manitol:compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo de 1:2. En otra realización, la composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo se formula con una proporción en peso de manitol:lactosa:compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo de 1:1:4. Una combinación de manitol y lactosa puede proporcionar un efecto estabilizante mayor que cualquier sustancia en solitario. El pH de una composición farmacéutica de la invención puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 9, como alternativa de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, como alternativa de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, como alternativa de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, como alternativa de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,5. El pH de una composición farmacéutica de la invención puede ser también, por ejemplo, menos de aproximadamente 9, como alternativa menos de aproximadamente 8, como

alternativa menos de aproximadamente 7, como alternativa menos de aproximadamente 6, como alternativa menos de aproximadamente 5, o como alternativa menos de aproximadamente 4. El pH de una composición farmacéutica de la invención puede ser también, por ejemplo, mayor de aproximadamente 2, mayor de aproximadamente 3, como alternativa mayor de aproximadamente 3,5, como alternativa mayor de aproximadamente 4, como alternativa mayor de aproximadamente 4,5, como alternativa mayor de aproximadamente 5,0, como alternativa mayor de aproximadamente 5,5, como alternativa mayor de aproximadamente 6,0, como alternativa mayor de aproximadamente 6,5, como alternativa mayor de aproximadamente 7,0.

En algunas realizaciones, pueden emplearse uno o más procedimientos para reducir la formación de MAG (un derivado de un compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo de la invención o un compuesto de dalbavancina que carece de un resto de acilglucorunamina) y/u otros degradantes. Por ejemplo, el secado por congelación de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo en presencia de una sustancia estabilizante, tal como manitol, puede emplearse para reducir la cantidad de MAG formado.

El almacenamiento de compuestos y composiciones antibióticas de N^{15},N^{15} -dialquilo puede ser a una temperatura más baja que la ambiente, tal como a aproximadamente 5°C, para potenciar la estabilidad.

La dosificación semanal de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo a niveles de dosificación altos (es decir, produciendo niveles de suero sorprendentemente altos y de larga duración) puede mostrar un perfil de seguridad sorprendentemente bueno, similar al, o mejor que, el observado con la terapia convencional de dosis más bajas de antibióticos convencionales

administrados diariamente o incluso 2-4 veces al día, como se demostró mediante los ejemplos en este documento. Una dosificación alta (es decir, que produce niveles en suero altos y de larga duración, por ejemplo, 200-5000 mg) de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede administrarse, con menos frecuencia que otros antibióticos, y sin efectos secundarios adversos, permitiendo una eficacia mejorada y la conformidad del paciente.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con una composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo produce una incidencia baja de sucesos adversos. Los sucesos adversos graves incluyen cualquier experiencia adversa con el fármaco que se produce a cualquier dosis y que da como resultado la muerte, que puede ser amenazadora para la vida, que produce la hospitalización o la prolongación de una hospitalización ya existente, o que produce discapacidad o incapacidad persistente o significativa.

15 Kits

La invención también abarca kits para su uso en procedimientos de tratamiento o profilaxis de infecciones bacterianas. Los kits pueden incluir un compuesto o composición farmacéutica de la invención, por ejemplo comprender al menos una dosis unitaria de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo, e instrucciones que proporcionan información a un médico respecto al uso para tratar o prevenir una infección bacteriana. Las instrucciones pueden proporcionarse en forma impresa o en forma de un medio electrónico, tal como disquete, CD, o DVD, o en la forma de una dirección de página web donde se puedan obtener dichas instrucciones. Una dosis unitaria de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo puede incluir

297 7
M

una dosificación tal que cuando se administra a un individuo, puede mantener un nivel en plasma terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo en el individuo durante al menos 5 días. En algunas realizaciones, un kit incluye dos dosificaciones unitarias para 5 administrarse separadas por al menos 5 días, separadas por aproximadamente una semana, o que incluyen una primera dosificación de un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo que pueda ser aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3 veces más alta que la segunda dosificación. En algunas realizaciones, un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} - 10 dialquilo puede estar incluida en forma de una composición farmacéutica acuosa estéril o una composición de polvo seco (por ejemplo, liofilizado). En una realización, el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dialquilo es de acuerdo con la fórmula (V).

En algunas realizaciones, se proporciona un envase adecuado. Como se 15 usa en este documento, "envase" se refiere a una matriz o material sólido usado por regla general en un sistema y capaz de mantener dentro de unos límites fijados a un compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo adecuado para la administración a un individuo. Dichos materiales incluyen frascos de vidrio y plástico (por ejemplo, polietileno, polipropileno, y 20 policarbonato), viales, papel, plástico, y sobres laminados de papel de aluminio-plástico y similares. Si se emplean técnicas de esterilización con rayos e, el envase debe tener una densidad suficientemente baja para permitir la esterilización del contenido.

Los kits pueden comprender también opcionalmente equipo para la 25 administración del compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo

298

tales como, por ejemplo, jeringuillas o equipo para administración intravenosa, y/o una solución estéril, por ejemplo, un diluyente tal como dextrosa al 5%, para preparar una composición de polvo seco (por ejemplo, liofilizado) para administración.

5 Los kits de la invención también pueden comprender además del compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo, un antibiótico no de dalbavancina o una mezcla de antibióticos no de dalbavancina, para su uso con el compuesto o composición antibiótica de N^{15},N^{15} -dialquilo como se describe en los procedimientos anteriores.

10 Los siguientes ejemplos sintéticos y biológicos se ofrecen para ilustrar esta invención y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de esta invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 15: Purificación de N^{15},N^{15} -dimetil dalbavancina B_0

15 La preparación de A-40926 y la posterior síntesis de dalbavancina se describen anteriormente. El ejemplo presente describe la purificación del compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo de acuerdo con la fórmula (V), es decir N^{15},N^{15} -dimetil dalbavancina B_0 a partir de una mezcla de compuestos de dalbavancina preparada de acuerdo con la invención. Como será evidente para
20 los especialistas en la técnica, la N^{15},N^{15} -dimetil dalbavancina B_0 es una dalbavancina B_0 modificada con dos grupos metilo en el N^{15} . Para los fines de este ejemplo y los ejemplos siguientes, el N^{15},N^{15} -dimetil antibiótico B_0 se denomina "Compuesto A" en las secciones donde el compuesto tiene todavía que caracterizarse completamente. Además, por conveniencia en las secciones
25 posteriores, N^{15},N^{15} -dimetil dalbavancina B_0 se denomina como dalbavancina

299 9/11

B₂. N¹⁵,N¹⁵-dimetil antibiótico B₀, dalbavancina B₂ y Compuesto A son la misma molécula.

Preparación de la muestra

Se concentraron aproximadamente 2 l de solución acuosa orgánica de una purificación de dalbavancina preparada de acuerdo con los procedimientos de este documento mediante evaporación de acetonitrilo y agua al vacío. La adición de éter dietílico al residuo produjo 6 g de sólido en bruto. Después de la disolución en una mezcla de agua/acetonitrilo 90/10 v/v el sólido se purificó sobre gel de sílice silanizado (volumen de lecho 1 l; diámetro interno de la columna= 5 cm) usando un gradiente de elución por etapas de agua (pH 3 ácido acético)/acetonitrilo. Las fracciones que contenían el Compuesto A se combinaron, se concentraron a un pequeño volumen (pocos ml) y se sometieron a purificación por HPLC preparativa.

Se recogieron las fracciones enriquecidas, después de la evaporación de acetonitrilo al vacío y de la liofilización se recuperaron unos pocos µg de compuesto A.

Ejemplo 16: Identificación de los sustituyentes del grupo amino en N¹⁵ del Compuesto A.

El Compuesto A tiene un peso molecular de 1828 Da, 14 unidades más que los componentes de dalbavancina B₀ y B₁ (P.M. 1814). Los análisis por HPLC-IEN-EM demostraron que a diferencia de los otros componentes del complejo, la variación está en el grupo amino terminal en el N¹⁵.

Otros compuestos de dalbavancina, que poseen un grupo metilamino (R-NHCH₃) muestran en sus espectros de masas de fragmentación (IEN-EM/EM) una pérdida neutra de 31 unidades (-NH₂CH₃). El espectro de fragmentación

del Compuesto A muestra una pérdida de 45 unidades en lugar de 31 unidades. Este tipo de pérdida neutra puede explicarse mediante dos hipótesis estructurales: N^{15} podría ser un grupo *N,N*-dimetilamino ($R-N(CH_3)_2$, amina terciaria) o un grupo *N*-etilamino ($R-NHCH_2CH_3$, amina secundaria).

5 El análisis de HPLC-IEN-EM del Compuesto A hidrolizado y derivatizado puede discriminar entre estas dos hipótesis. La Figura 29 muestra los tres fragmentos peptídicos originados a partir de B_0 después de hidrólisis ácida. Se forman dos dipéptidos, "AA1+AA3" con grupo amino N^{15} y un átomo de cloro, "AA5+AA7", y un tripéptido "AA2+AA4+AA6", con un átomo de cloro. Otros
10 productos de hidrólisis son el ácido graso y las cadenas de DMEPA4 (dimetilamino-propilamino).

En el caso del Compuesto A el dipéptido "AA1+AA3" debe ser diferente como se indica en la Figura 30. La hipótesis correcta puede verificarse haciendo reaccionar el hidrolisado con un agente derivatizante que reacciona
15 solamente con las aminas primaria y secundaria (véase la Fig. 31).

El dipéptido "AA1+AA3" del componente B_0 debe reaccionar con dos grupos del agente derivatizante (véase la Fig. 31a). En el caso del Compuesto A se pueden obtener dos péptidos derivatizados diferentes "AA1+AA3" dependiendo del grupo amino N^{15} (Fig. 31b). Las dos moléculas, que se
20 esperan teóricamente de acuerdo con las hipótesis propuestas, tendrán pesos moleculares fácilmente distinguibles mediante análisis de espectrometría de masas.

Materiales.

Compuesto A.

25 Dalbavancina.

261:91
M

Ácido clorhídrico al 37%, calidad de reactivo, Rudi Pont cod. 750-11.

Metanol, calidad de HPLC, J. T. Backer cod. 8402

AccQ Tag™ Chemistry Package, Waters cod. WAT052880

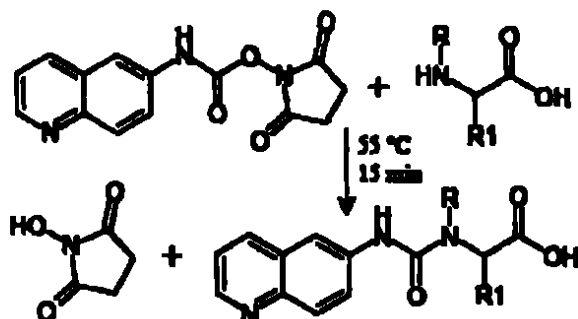
Hidrólisis.

- 5 . La hidrólisis de la muestra y del patrón se realizó en una estación de trabajo PICO-TAG (Waters, Mildford, MA, USA).

La totalidad de los 360 µg del Compuesto A y aproximadamente 1 mg del patrón de dalbavancina se hidrolizaron a 105°C en presencia de HCl 6 N que contenía fenol al 1% (p/v) durante 24 horas. Las mezclas de reacción se
10 enfriaron, se evaporaron hasta sequedad y se enrasaron a 500 l con metanol.

Derivatización.

Se eligió el kit del reactivo Waters AccQ-Fluor™ para la derivatización de péptidos. El reactivo AccQ-Fluor es uno de los compuestos carbamato heterocíclico amino derivatizantes activados por N-hidroxisuccinimida. La
15 estructura del agente de derivatización y el esquema de reacción se presentan en el esquema 2.



Se añadió 1 ml de "Reactivo Diluyente" al vial que contenía "Polvo Reactivo". El vial se agitó en vórtice durante 10 segundos y se calentó a 55°C
20 hasta la completa disolución. El reactivo AccQ-Fluor reconstituido fue de

aproximadamente 10 mM en acetonitrilo. Se pusieron 20 µl de muestra o patrón hidrolizados en un vial de entrada cónica y se añadieron 20 µl de "Tampón Borato de AccQ-Fluor" y se agitaron en vórtice brevemente. En este punto se añadieron 40 µl de reactivo AccQ-Fluor reconstituido y la muestra se agitó en vórtice durante 30 segundos. Los viales se calentaron a 55° durante 10 minutos. En estas condiciones los grupos amino deben reaccionar y los subproductos secundarios eventuales deben minimizarse. Después de esta reacción las muestras estaban preparadas para análisis de HPLC.

Análisis de HPLC-UV-EM.

10 Bomba Thermo Finnigan Surveyor MS, detector de serie de diodos, y tomamuestras automático.

Detector de masa ThermoQuest Finnigan LCQ Deca equipado con interfaz IEN.

15 Cromatografía: Columna: AccQ-TagTM (Waters C18 NovoPak 4 µm 3,9 x 150 mm); Temperatura de la columna: 37°C; Flujo: 1 ml/min; Fase A: acetato de amonio 140 mM pH 5 (ácido acético); Fase B: agua/acetonitrilo 60/40 v/v; detección de UV: 254 nm. Volumen de inyección: 20 µl. El eluato de la columna se dividió para permitir la detección de masas y de UV simultánea.

Espectrometría de masas.

20 Condiciones de la entrada de la muestra: temperatura del capilar: 200°C
gas de impulsión: N₂, 40 (unidades arbitrarias)
gas auxiliar N₂, 20 (unidades arbitrarias)
Ajuste del voltaje en la entrada de la muestra: polaridad: positiva
voltaje de la fuente: 4,7 kv
25 voltaje del capilar: 10 V

363 g

compensación de la lente tubular: 40 V

Condiciones de la exploración: modo de exploración: ms completa

Intervalo de exploración: 100-700 uma

número de microexploraciones 3

5 tiempo de ionización máxima 50 ms

Resultados

Se separaron los fragmentos derivatizados e hidrolizados de dalbavancina mediante HPLC y se evaluaron mediante IEN-EM (no se muestran los datos). El fragmento AA1+AA3 tenía un tamaño de 737 (m/z), el
10 fragmento AA5+AA7 tenía un tamaño de 689 (m/z), y el fragmento AA2+AA4+AA6 tenía un tamaño de 1086 (m/z).

Los fragmentos derivatizados e hidrolizados del Compuesto A se separaron mediante HPLC y se evaluaron mediante IEN-EM. El fragmento AA1+AA3 tenía un tamaño de 737 (m/z), el fragmento AA5+AA7 tenía un
15 tamaño de 581 (m/z), y el fragmento AA2+AA4+AA6 tenía un tamaño de 1086 (m/z).

El tamaño del AA5+AA7 confirmó que el Compuesto A es un compuesto de N^{15} , N^{15} -dimetilo.

Ejemplo 17: Metilación de Dalbavancina B₀

20 La Dalbavancina B₀ se preparó siguiendo los procedimientos descritos generalmente anteriormente y se purificó mediante HPLC siguiendo los procedimientos descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0142883. Se sometió a una muestra de dalbavancina B₀ a N-metilación de amina secundaria selectiva para producir N^{15} , N^{15} -dimetil

304/2

antibiótico B₀. La mezcla de reacción se analizó después mediante HPLC-UV y HPLC-UV-EM en el Ejemplo a continuación.

Materiales

Dalbavancina B₀

5 **Agua, calidad MmiliQ**

NaBH₃CN, cianoborohidruro sódico, código Fluka 71435

DMF, N,N-dimetilformamida, Carlo Erba cod. 444926

HCHO, solución de formaldehído, solución acuosa al 36,5%, Reidel de Haën cod. 33220.

10 **NaHCO₃, bicarbonato sódico, calidad de reactivo**

Procedimiento.

Se disolvieron 49,5 mg de dalbavancina en 12,5 ml de agua y 1,5 ml de DMF en un matraz de fondo redondo (pH 3,5). Se retiraron tres alícuotas de 200 µl y se diluyeron con 800 µl de agua (t₀). Se añadieron 76 µl de una
15 solución acuosa al 36% (v/v) de formaldehído y 2,5 mg de bicarbonato de sodio (pH 5,8). Se añadieron 8 mg de NaCNBH₃ en agitación después de la disolución completa del bicarbonato de sodio. Se retiraron inmediatamente tres alícuotas de 200 µl de esta mezcla de reacción y se diluyeron con 800 µl de agua y 300 µl de CH₃CN para conseguir una solución transparente (t_{0'}). La
20 mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se tomaron muestras del medio de reacción después de 10 y 30 minutos extrayendo 3 alícuotas de 200 µl y diluyendo cada una con 800 µl de agua y 300 µl de CH₃CN (t₁₀ y t₃₀).

305 of 11

Después de 30 minutos la reacción se interrumpió enfriando hasta -20°C el matraz. La reacción se controló mediante análisis de HPLC-UV y HPLC/UV/EM.

Ejemplo 18: Confirmación estructural de N^{15},N^{15} -dimetil antibiótico B_0 .

5 Este ejemplo demuestra que el Compuesto A y el N^{15},N^{15} -dimetil antibiótico B_0 del ejemplo anterior son idénticos.

Las muestras de reacción t_0 , t_0' , t_{10} y t_{30} se analizaron mediante HPLC-UV y se compararon con el patrón de referencia. Los cromatogramas de t_0' , t_{10} y t_{30} eran muy similares, demostrando que la metilación se produce de
10 inmediato.

En la Fig. 33 se muestran los cromatogramas de t_0 frente a t_0' . El B_0 metilado mostró el mismo tiempo de retención que el Compuesto A, del ejemplo 15, anterior. La hipótesis de que el Compuesto A es el derivado metilado de B_0 y consecuentemente de que la cadena de ácidos grasos del
15 Compuesto A es un ácido 10-metil undecanoico se demostró de este modo.

Los resultados de HPLC-UV-EM confirmaron la conclusión estructural de HPLC-UV presentada en el último párrafo. El pico del N,N' -dimetil B_0 se solapaba perfectamente con el del Compuesto A.

De este modo se demostró que el grupo en N^{15} del Compuesto A es un
20 grupo dimetilamino y no un etilamino. La estructura elucidada del componente del Compuesto A se presenta en la Fig. 28.

La estructura del Compuesto A se confirmó adicionalmente mediante NMR, IEN-EM e IR. Los espectros de NMR se registraron en un Bruker AMX 600 a 313K. La muestra se disolvió en DMSO- d_6 y las asignaciones de NMR
25 de protones y carbono se determinaron mediante los espectros COSY-DFTP,

306 9/11

ROESY y HMQC. Se seleccionó un tiempo de mezcla de 350 mseg para el experimento ROESY. Los espectros de masas se determinaron mediante ionización por electronebulización en modo positivo en un Thermoquest Finnigan LCQ^{deca} a 250°C. El espectro de infrarrojos se registró en KBr sobre un instrumento Bruker IFS 48.

Las asignaciones de los picos de NMR se proporcionan en la Fig. 34. La Tabla 40 presenta las asignaciones 1H de B₂ en comparación con B₀. Los espectros de NMR de B₂ muestran muchas similitudes con dalbavancina B₀. La cadena de ácidos grasos contiene un grupo isopropílico terminal. La mayoría de los desplazamientos químicos de protones y carbonos son aproximadamente los mismos que los que se encuentran en el componente B₀. Las principales desviaciones de desplazamiento químico son observables para señales que pertenecen al aminoácido 1. En particular, el singlete a 2,31 ppm (¹³Cδ 40,06 ppm) da una integral que corresponde a seis protones y correlaciones NOE con los protones x1, 1f y 1e. Su desplazamiento químico y las correlaciones dipolares sugieren que esta señal es debida al grupo dimetilamino que pertenece al sistema de spin del primer aminoácido.

TABLA 40

	B ₂	B ₀			B ₂	B ₀	
	δ ¹ H	δ ¹ H	δ ¹³ C		δ ¹ H	δ ¹ H	δ ¹³ C
wf	-	n.a.	-	6e	7,26	7,28	123,2
CH ₃	2,31	2,45	30,99	6f	7,42	7,44	126,9
x1	4,43	4,33	66,07	w7	8,41	8,47	-
1b	6,70	6,71	118,5	x7	4,42	4,45	53,3
1e	6,93	7,05	117,6	7d	6,73	6,75	101,1
1f	7,00	7,23	126,65	7f	6,43	6,40	107,9
w2	7,36	8,2	-	AG1	5,48	5,40	101,9

307

x2	4,83	4,79	55,9	AG2	3,72	3,71	55,98
z2	2,81;3,32	2,95;3,37	n.a.	AG3	3,62	3,62	76,11
2b	7,09	7,1	130,6	AG4	3,41	3,51	n.a.
2c	7,17	7,07	123,4	AG5	n.a.	4,27	66,28
2e	6,97	6,97	122,33	AG-NH	7,71	7,77	-
2f	7,63	7,87	131,29	FA2	2,02	2,01	35,8
w3	7,58	7,54	-	FA3	1,43	1,42	24,84
x3	6,10	6,09	54,31	FA4-FA9	1,11-1,22	1,0-1,2	28,8-29,3
3d	6,72	6,55	107,5	FA10	1,50	1,49	27,2
3f	6,49	6,78	107,1	FA11	0,84	0,84	22,34
w4	7,64	7,44	-	FA12	0,84	0,84	22,34
x4	5,60	5,59	54,63	wNN	7,96	8,19	-
4b	5,80	5,78	108,8	NNa	3,31;3,20	3,17;3,40	35,38
4f	5,11	5,08	103,8	NNb	1,65	1,87	23,37
w5	8,36	8,48	-	NNc	2,39	2,96	53,94
x5	4,41	4,35	57,72	NNd	2,24	2,71	42,05
5b	7,10	7,13	135,01	M1	5,27	5,32	96,7
5e	6,71	6,71	116,0	M2	3,25	3,3	70,24
5f	6,71	6,71	125,8	M3	n.a.	3,49	73,6
w6	6,62	6,62	-	M4	n.a.	3,69	72,91
x6	4,14	4,19	61,97	M5	n.a.	3,50	n.a.
z6	5,20	5,38	70,8	M6	n.a.	3,50	60,68
6b	7,69	7,75	126,6				

Se proporciona un espectro de infrarrojos en la Fig. 35. IEN-EM se proporciona en la Fig. 36. Los datos confirmaron la estructura del Compuesto A como dalbavancina B₂ (N¹⁵,N¹⁵-dimetil dalbavancina B₀).

5 Ejemplo 19 Actividad de Dalbavancina B₂ (N¹⁵,N¹⁵-dimetil dalbavancina B₀)

La N¹⁵,N¹⁵-dimetil dalbavancina B₀, varios compuestos de N¹⁵ monometil dalbavancina y varios antibióticos conocidos se aislaron y se ensayaron *in vitro* para su capacidad antibacteriana. Los compuestos se prepararon de acuerdo

3034
h

con los ejemplos anteriores y los procedimientos descritos en Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2004/0142883. Los compuestos de dalbavancina individuales se purificaron mediante HPLC.

Preparación de la muestra

5 Se disolvieron compuestos de N^{15} -monometil dalbavancina y compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dimetilo aislados en HCl 0,01 N:DMSO: 95:5 v/v. Antes de la disolución, cada muestra se analizó mediante HPLC y se cuantificó. Las soluciones se prepararon a 256 $\mu\text{g/ml}$ para los compuestos de N^{15} -monometil dalbavancina (dalbavancina A_0 , A_1 , B_0 , y B_1) y a 128 $\mu\text{g/ml}$ para
10 el N^{15},N^{15} -dimetil antibiótico B_0 (denominado "dalbavancina B_2 " en las tablas a continuación).

La pureza cromatográfica del pico principal se evaluó en % de área frente al área total del cromatograma como se presenta en la Tabla 41:

15 **TABLA 41: PUREZA CROMATOGRÁFICA DEL PICO PRINCIPAL DE DIVERSOS COMPUESTOS ANTIBIÓTICOS DE N^{15} -MONOMETILO Y N^{15},N^{15} -DIMETILO.**

ID	Estado	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% del pico principal
Dalbavancina A_0	Solución	256	82
Dalbavancina A_1	Solución	256	80
Dalbavancina B_0	Solución	256	96
Dalbavancina B_1	Solución	256	79
Dalbavancina B_2	Solución	128	72

309/6

Caracterización Microbiológica

Los compuestos ensayados incluyen los compuestos de N^{15} -monometil dalbavancina y compuestos antibióticos de N^{15}, N^{15} -dimetilo aislados descritos anteriormente así como una composición de dalbavancina ("DA025/A") que
5 comprende un compuesto antibiótico de N^{15}, N^{15} -dimetilo, vancomicina (VA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Gentamicina (GE) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Penicilina G (Pen G) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), y anfotericina B (Amph B) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Microorganismos

10 Los microorganismos usados fueron cepas de referencia obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD), Smithkline and French Laboratories (SKF), y la Upjohn Company (UC) (Kalamazoo, MI).

Determinaciones de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Las MIC se determinaron mediante la metodología de microdilución en
15 caldo siguiendo el procedimiento NCCLS convencional (Documento NCCLS M7/A6, Vol. 23, N° 2, "Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically". Approved Guideline. enero 2003, que puede incorporarse a este documento como referencia en su totalidad), con o sin suero bovino de adulto al 30% (BS) (PAA Laboratories GmbH, Haidmannweg
20 Pasching Austria), usando inóculos bacterianos a aproximadamente 5×10^5 ufc/ml. Los medios empleados incluyeron caldo Müller Hinton ajustado con cationes (Difco Laboratories, Detroit, MI) que se ajustó con CaCl_2 y MgCl_2 hasta una concentración final de 20 mg/l y 10 mg/l, respectivamente. Los ensayos se leyeron después de 20-24 horas de incubación a 35°C.

25 **Resultados**

Los resultados de MIC se resumen en la **Tabla 42** a continuación. Contra un panel de bacterias gram positivas, la actividad de los diversos compuestos de N^{15} -monometil dalbavancina y el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo ("B₂") aislados era comparable o ligeramente superior a la de la
5 composición DA, que comprende una mezcla de los compuestos antibióticos de N^{15},N^{15} -dialquilo. La solución blanco (HCl 0,01 N/DMSO 95:5) usada para disolver compuestos de ensayo era inactiva.

El compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo ("B₂") mostró actividad de forma significativa contra las bacterias gram-positivas que era comparable a o
10 superior a la de los compuestos de N^{15} -monometil dalbavancina. Por ejemplo, la actividad del compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo ("B₂") es comparable a o superior a la actividad de B₀ por todo el intervalo de bacterias gram-positivas.

El compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo ("B₂") mostró también
15 actividad de forma bastante significativa contra el intervalo de bacterias gram-negativas ensayadas. De hecho, el único compuesto que era activo contra el panel representativo de bacterias gram-negativas en este ensayo era el compuesto antibiótico de N^{15},N^{15} -dimetilo ("B₂") aislado, que mostró actividad con un intervalo de MIC de 16-32 mg/l.

20 Los valores de MIC de los compuestos de referencia VA y GE contra las cepas de referencia de ATCC estaban en el intervalo de los valores de NCCLS.

**TABLA 42. ACTIVIDAD *IN VITRO* DE DIVERSOS COMPUESTOS ANTIBIÓTICOS DE N¹⁵, N¹⁸ DIALQUILO Y
CEPAS DE REFERENCIA**

Microorganismo	MIC (mg/l)										
	A ₀	A ₁	B ₀	B ₁	B ₂	DA 025/A	VA	GE	Pen.G	Amph.B	Blanco*
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith ATCC 19638	0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	1	0,5	0,06	>64	>1:2
<i>S. aureus</i> Smith + BS al 30%	1	2	2	2	2	2	2	≤0,125	0,06	>64	>1:2
<i>S. aureus</i> cepa de ref. ¹ ATCC 29213	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,25	2	8	8	>64	>1:2
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,125	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,03	0,125	2	≤0,125	>32	>64	>1:2
<i>Streptococcus pyogenes</i> SKF 13400	0,015	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,03	0,06	1	4	≤0,03	32	>1:2

400

<i>S. pneumoniae</i> Felton UC41	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,03	0,015	0,5	8	≤0,03	>64	>1:2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080	0,125	0,125	0,125	0,125	0,06	0,25	1	8	32	>64	>1:2
<i>E. faecalis</i> cepa de ref. ² ATCC 29212	≤0,06	0,125	0,125	0,125	0,125	0,25	2	32	4	>64	>1:2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 8633	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,03	≤0,007	≤0,125	0,25	≤0,03	>64	>1:2
<i>Escherichia coli</i> SKF 12140	>64	>64	>64	>64	32	>64	>128	2	>32	>64	>1:2
<i>E. coli</i> cepa de ref. ³ ATCC 25922	>64	>64	>64	>64	32	>64	>128	1	>32	>64	>1:2
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 861	>64	>64	>64	>64	32	>64	>128	2	>32	>64	>1:2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	>64	>64	>64	>64	16	>64	>128	1	>32	>64	>1:2
<i>Candida albicans</i> SKF 2270	>64	>64	>64	>64	32	>64	>128	>128	>32	0,125	>1:2

*Factor de dilución más bajo que no mostraba actividad

Intervalo de control de calidad de MIC para las cepas de referencia (NCCLS M100 S-12, Vol. 22, N°1, ene. 2002)

¹ VA 0,5-2 mg/l

² VA 1-4 mg/l

³ GE 0,25-1 mg/l

**Ejemplo 20 Preparación de una Composición de Dalbavancina que
Comprende Dalbavancina B₂**

Se produjo una composición que comprendía dalbavancina B₀, dalbavancina B₁ y dalbavancina B₂ purificadas mediante HPLC preparativa.

- 5 Se purificó mediante HPLC una mezcla de dalbavancina preparada de acuerdo con los procedimientos anteriores. La purificación se realizó en Kromasil C18, 16 µm, tamaño de poro 100 Å. El sistema tampón era una solución acuosa de NH₄H₂PO₄ 50 mmolar con el pH ajustado a 5,5. La fase móvil para la elución era mezcla 66/34 de tampón/acetonitrilo. El procedimiento
- 10 produjo una composición de dalbavancina que comprendía el 97% de dalbavancina B₀, dalbavancina B₁ y dalbavancina B₂ mediante análisis de HPLC. Un cromatograma analítico de HPLC típico está en la Fig. 37, con dalbavancina B₀ a aproximadamente 29,901, dalbavancina B₁ a aproximadamente 30,79 (sin etiquetar) y dalbavancina B₂ a aproximadamente 33,282.

15 ***Caracterización de IsoB₀***

- El espectro de masas de IsoB₀ (Fig. 38) muestra un ión en *m/z* 1817 correspondiente a la molécula monoprotonada y otros iones debidos a aductos catiónicos o fragmentaciones parciales de la fuente. El peso molecular de 1816 Da y el patrón de fragmentación es el mismo que el observado para
- 20 componentes B, lo que apoya la identificación de IsoB₀ como un diastereómero de B₀ (la misma molécula con uno o más estereocentros que tienen quiralidad invertida)

- Se descubrió que el nivel de IsoB₀ aumentaba cada vez que el pH aumentaba demasiado en las diversas etapas de preparación. Por lo tanto, el
- 25 IsoB₀ se preparó mediante tratamiento básico de dalbavancina.

315

Preparación de la muestra (BI-K0096)

Se obtuvieron aproximadamente 300 mg de IsoB₀ a partir de 10 g de dalbavancina lote 027 mediante tratamiento prolongado (aproximadamente 165 horas) con NaOH en agua (pH 12,7) a temperatura ambiente. Después de la neutralización, el producto de reacción se recuperó como un sólido en bruto de color marrón que se sometió a una doble purificación cromatográfica sobre una columna de gel de sílice silanizado eluyendo con agua (pH 3,5; ácido acético)/acetonitrilo en modo de gradiente por etapas.

A partir de las fracciones ricas, se aisló un área sólida de BI-K0096 del 79,98%. El perfil de HPLC se reproduce en la Fig. 39.

Para verificar la correspondencia de BI-K0096 con la impureza de dalbavancina de IsoB₀, se analizó el compuesto preparado BI-K0096 mediante HPLC usando tres procedimientos diferentes. En todas las condiciones ensayadas, BI-K0096 era cromatográficamente idéntico a la impureza de IsoB₀.

Análisis Estructural.

Los espectros EM y EM/EM se presentan en las Figs. 40 A-C. Estos espectros de masas son idénticos al del componente B₀. A partir de este análisis de masas, no es posible confirmar la variación estereoquímica.

Los espectros de ¹H y ¹³C NMR de IsoB₀, registrados en DMSO-d₆ en un espectrómetro de 600 MHz, mostraron muchas similitudes con los espectros de dalbavancina pero también diferencias importantes (véase Figs. 41 y 42 respectivamente). Las asignaciones de IsoB₀ y B₀ se presentan en la TABLA 43 y la situación correspondiente de los protones se identifica en la Fig. 43.

Tabla 43. Asignaciones de NMR de Dalbavancina IsoB₀

Asignación	IsoB₀	Asignación	IsoB₀
-------------------	-------------------------	-------------------	-------------------------

316

	δ^2H	$\delta^{13}C$		δ^2H	$\delta^{13}C$
WI	n.a.	-	6e	n.a.	n.a.
CH₃	2,24	33,70	6f	7,42	126,9
x1	4,26	64,65	w7	8,56	-
1b	7,13	120,5	x7	4,45	n.a.
1e	6,82	116,6	7d	6,75	101,5
1f	6,97	120,87	7f	6,43	108,18
w2	8,19	-	AG1	5,23	102,0
x2	4,53	55,67	AG2	3,72	55,91
z2	2,80	38,59	AG3	3,55	n.a.
2b	7,01	n.a.	AG4	3,48	n.a.
2c	6,90	n.a.	AG5	3,26	n.a.
2a	7,29	n.a.	AG-NH	7,60	-
2f	7,22	n.a.	FA2	2,0	n.a.
w3	8,44	-	FA3	1,41	n.a.
x3	5,34	54,65	FA4-FA9	1,11-1,30	n.a.
3d	6,51	104,7	FA10	1,49	n.a.
3f	6,0	101,38	FA11	0,85	n.a.
w4	8,59	-	FA12	0,85	n.a.
x4	5,38	55,07	wNN	8,05	-
4b	5,74	109,07	NNa	3,15;3,23	n.a.
4f	5,12	104,5	NNb	1,63	n.a.
w5	8,32	-	NNc	2,30	n.a.
x5	4,56	53,20	NNd	2,16	n.a.

31x9
J

5b	7,16	135,3	M1	5,21	97,7
5e	6,70	115,88	M2	n.a.	n.a.
5f	6,70	n.a.	M3	n.a.	n.a.
w6	6,59	-	M4	n.a.	n.a.
x6	4,21	62,04	M5	n.a.	n.a.
z6	5,26	71,27	M6	n.a.	n.a.
6b	7,77	126,8			

Para algunas partes de la molécula, los desplazamientos químicos de protones y carbonos son aproximadamente los mismos que para el componente B₀. Las principales desviaciones en los desplazamientos químicos son observables para señales que pertenecen a la secuencia de aminoácidos 1-4. Los protones de estos sistemas de spin muestran una Δδ (diferencia en el desplazamiento químico) positiva o negativa insignificante. El aminoácido 3 en particular muestra la mayor cantidad de cambios relevantes (x3, w3, 3f, 3d); x3 es también la única resonancia que muestra una modificación importante de su ³J_{HH}, la constante de acoplamiento CH(x3)-NH(w3) es ahora 6,54 Hz en comparación a aproximadamente 10,4 en B₀. Además, los experimentos ROESY indican diferencias en las correlaciones dipolares para x3 así como para la mayoría de los protones próximos a x3. Los descubrimientos de NMR presentados y los datos bibliográficos publicados sobre epímeros de teicoplanina dejan claro que x3 es el centro de epimerización y la epimerización induce un cambio en la conformación en al menos una parte de la molécula.

Caracterización Microbiológica

Los compuestos usados fueron:

318

- IsoB₀ como se ha descrito previamente
- Dalbavancina (DA) (BI-K397 lote 025/A/AS1) patrón de ref.
- Vancomicina (VA) (lote 121K1140 Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA).
- 5 • Gentamicina (GE) (lote 57H1099 Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA).
- Penicilina G (Pen. G) (lote 43H1134 Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA).
- Anfotericina B (Amph. B) (lote 61H4039 Sigma Chemical Co. St Louis,
- 10 MO, USA).

Se disolvieron Vancomicina, Dalbavancina y Anfotericina B a 10 mg/ml en dimetil sulfoxido (DMSO) y se diluyeron en agua destilada; se disolvieron gentamicina y Penicilina G en agua destilada.

Medios

- 15 Caldo Müller Hinton (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) ajustado con CaCl₂ y MgCl₂ hasta una concentración final de 20mg/l y 10 mg/l respectivamente.

Sueros

- 20 Suero bovino de adulto (BS) (lote A05123-159 PAA Laboratories GmbH Haidmannweg Pasching Austria).

Microorganismos

- Los microorganismos usados son cepas patrón de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA), Smith Kline and French Laboratories (SKF) y la Upjohn Company (UC, Kalamazoo, Michigan,
- 25 USA)

319 \$

Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Las MIC se determinaron mediante la metodología de microdilución en caldo siguiendo el procedimiento NCCLS convencional [13], con o sin suero bovino al 30%, usando inóculos bacterianos de aproximadamente 5 x 10⁵ ufc/ml.

5 Los ensayos se leyeron después de 20-24 horas de incubación a 35°C.

Resultados

Contra un panel de bacterias gram-positivas, la actividad de isoB₀ es muy similar a dalbavancina. (Véase TABLA 44)

TABLA 44. Actividad In Vitro de IsoB0 y Compuestos de Referencia

Microorganismo	MIC (mg/l)						actividad del Blanco*
	isoB ₀	DA 025/A	VA	GE	Pen.G	Amph.B	
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith ATCC19636	0,5	0,25	1	0,5	0,06	>64	>1:2
<i>S. aureus</i> Smith + BS al 30%	16	2	2	≤0,125	0,06	>64	>1:2
<i>S. aureus</i> cepa de ref. ¹ ATCC29213	0,25	0,25	2	8	8	>64	>1:2
<i>S.epidermidis</i> ATCC12228	0,125	0,125	2	≤0,125	>32	>64	>1:2
<i>Streptococcus pyogenes</i> SFK13400	0,06	0,06	1	4	≤0,03	32	>1:2
<i>S. pneumoniae</i> Felton UC41	0,125	0,015	0,5	8	≤0,03	>64	>1:2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC7080	0,25	0,25	1	8	32	>64	>1:2

320 \$

<i>E. faecalis</i> cepa de ref. ² ATCC29212	0,25	0,25	2	32	4	>64	>1:2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC8633	≤0,06	≤0,007	≤0,125	0,25	≤0,03	>64	>1:2
<i>Escherichia coli</i> SFK12140	64	>64	>128	2	>32	>64	>1:2
<i>E. coli</i> cepa de ref. ³ ATCC25922	64	>64	>128	1	>32	>64	>1:2
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC881	>64	>64	>128	2	>32	>64	>1:2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145	>64	>64	>128	1	>32	>64	>1:2
<i>Candida albicans</i> SFK2270	>64	>64	>128	>128	>32	0,125	>1:2

Aunque la invención anterior se ha descrito con bastante detalle a modo de ilustración y ejemplos para fines de claridad y comprensión, será evidente para los especialistas en la técnica, que pueden practicarse ciertos cambios y modificaciones sin alejarse del espíritu y alcance de la invención. Por lo tanto, la descripción no debe interpretarse como limitante del alcance de la invención, que está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en este documento se incorporan por la presente como referencia en su totalidad para todos los fines y en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que se incorpora como referencia cada publicación, patente o solicitud de patente individual.

321 8

Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una forma de dosificación que comprende:

Un polvo de dalbavancina estéril, estable, sin partículas adecuado para reconstitución con un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende factor de dalbavancina B₀ y al menos un factor de dalbavancina adicional seleccionado entre el grupo constituido por factores de dalbavancina A₀, A₁, B₁,

- 10 B₂, C₀, y C₁;

En la que el contenido de factor B₀ no es menos de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes y en la que el contenido de isoB₀ no excede de aproximadamente el 3,5% de la distribución de HPLC de todos los componentes

- 15 de dalbavancina presentes.

2. La forma de dosificación de la reivindicación 1, que comprende además una sustancia estabilizante.

- 20 3. La forma de dosificación de la reivindicación 2, en la que la sustancia estabilizante es manitol.

4. La forma de dosificación de la reivindicación 2, en la que la sustancia estabilizante es una mezcla de manitol y lactosa.

5. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de isoB_0 no supera el 0,1 por ciento de la distribución de HPLC.
6. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que la forma de dosificación comprende los factores de dalbavancina B_0 , A_0 , A_1 , B_1 , y B_2 .
7. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de factor B_0 es al menos aproximadamente el 80 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 10 8. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de factor B_0 es al menos aproximadamente el 85 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 15 9. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de factor B_0 es al menos aproximadamente el 90 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 10 10. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de isoB_0 no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 25 11. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de isoB_0 no supera aproximadamente el 2,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

12. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 2 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

5

13. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 1,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

10 14. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 1 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

15 15. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 0,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

20 16. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

17. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

25

324

18. La forma de dosificación de la reivindicación 1, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 5 19. Una composición farmacéutica que comprende:
- factor de dalbavancina B₀ y al menos un factor de dalbavancina adicional seleccionado entre el grupo constituido por los factores de dalbavancina A₀, A₁, B₁, B₂, C₀, y C₁; y
- 10 en la que el contenido de factor B₀ no es menos de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes, y en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 15 20. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, que comprende además una sustancia estabilizante.
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en la que la sustancia estabilizante es manitol.
- 20 22. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en la que la sustancia estabilizante es una mezcla de manitol y lactosa.

25 25

23. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que la composición farmacéutica comprende los factores de dalbavancina B₀, A₀, A₁, B₁, y B₂.
- 5 24. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de factor B₀ es al menos aproximadamente el 80 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 10 25. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de factor B₀ es al menos aproximadamente el 85 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 15 26. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de factor B₀ es al menos aproximadamente el 90 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 20 27. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
28. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 2,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

29. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 2 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 5 30. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 1,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 10 31. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 1 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 15 32. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 0,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 20 33. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 25 34. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

37 38

35. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina
5 presentes.

36. Una forma de dosificación que comprende:

Un polvo de dalbavancina estéril, estable, sin partículas adecuado para reconstitución con un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende
10 factor de dalbavancina B₀ e isoB₀; y

En la que el contenido de factor B₀ no es menos de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes, y en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 3 por ciento de la distribución de HPLC de todos los
15 componentes de dalbavancina presentes.

37. La forma de dosificación de la reivindicación 36, que comprende además una sustancia estabilizante.

20 38. La forma de dosificación de la reivindicación 37, en la que la sustancia estabilizante es manitol.

39. La forma de dosificación de la reivindicación 37, en la que la sustancia estabilizante es una mezcla de manitol y lactosa.

40. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que la forma de dosificación comprende los factores de dalbavancina B_0 , A_0 , A_1 , B_1 , y B_2 .
41. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de factor B_0 es al menos aproximadamente el 80 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
42. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de factor B_0 es al menos aproximadamente el 85 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
43. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de factor B_0 es al menos aproximadamente el 90 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
44. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de $\text{iso}B_0$ no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
45. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de $\text{iso}B_0$ no supera aproximadamente el 2,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

46. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 2 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 5 47. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 1,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
48. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de
10 isoB₀ no supera aproximadamente el 1 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
49. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de
15 isoB₀ no supera aproximadamente el 0,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
50. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
20
51. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

3309

52. La forma de dosificación de la reivindicación 36, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

5 53. Una composición farmacéutica que comprende:

factor de dalbavancina B₀ e isoB₀; y

en la que el contenido de factor B₀ no es menos de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes, y en la que el contenido de isoB₀ no supera el 3 por
10 ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

54. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, que comprende además una sustancia estabilizante.

15

55. La composición farmacéutica de la reivindicación 54, en la que la sustancia estabilizante es manitol.

56. La composición farmacéutica de la reivindicación 54, en la que la
20 sustancia estabilizante es una mezcla de manitol y lactosa.

57. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que la composición farmacéutica comprende los factores de dalbavancina B₀, A₀, A₁, B₁, y B₂.

25

531

58. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el contenido de factor B_0 es al menos aproximadamente el 80 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
- 5 59. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el contenido de factor B_0 es al menos aproximadamente el 85 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
60. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el
10 contenido de factor B_0 es al menos aproximadamente el 90 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
61. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el
15 contenido de $isoB_0$ no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
62. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el
20 contenido de $isoB_0$ no supera aproximadamente el 2,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.
63. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el contenido de $isoB_0$ no supera aproximadamente el 2 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

332 29

64. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 1,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

5 65. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 1 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

66. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el
10 contenido de isoB₀ no supera aproximadamente el 0,5 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

67. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 3,0 por
15 ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

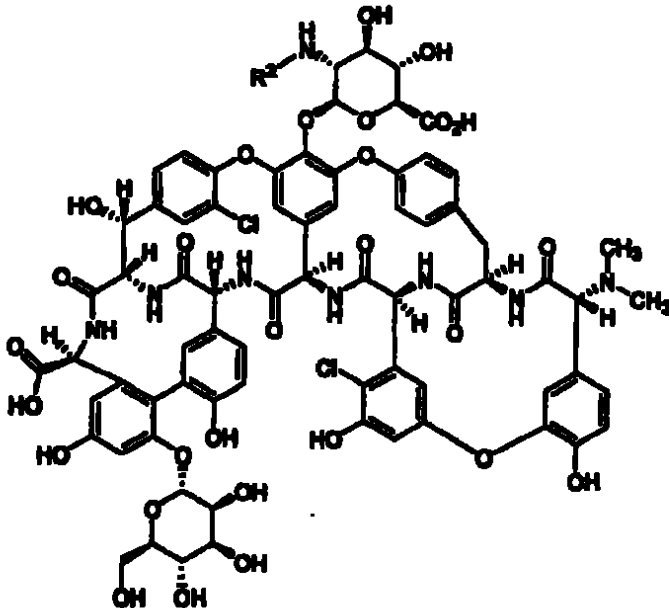
68. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 2,0 por
20 ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

69. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en la que el contenido de isoB₀ es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 1,0 por

523 08

ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

70. Un compuesto químico de la fórmula



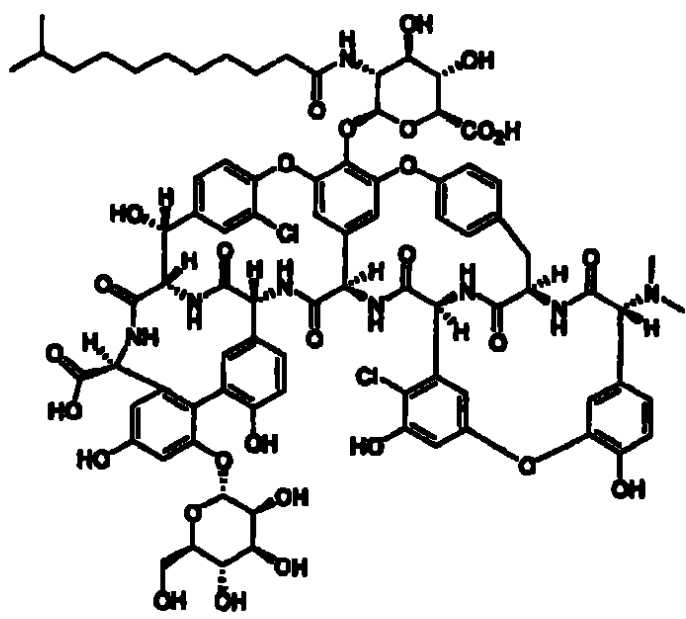
en la que R^2 es un acilo C_{10-14} .

71. El compuesto de la reivindicación 70, en el que R^2 se selecciona entre el grupo constituido por ácido 8-metil-nonanoico, ácido *n*-decanoico, ácido 9-metil-decanoico, ácido *n*-undecanoico, ácido 10-metil-undecanoico, ácido *n*-dodecanoico, ácido 11-metil-dodecanoico, ácido *n*-tridecanoico, ácido 12-metil-tridecanoico, y ácido *n*-tetradecanoico.

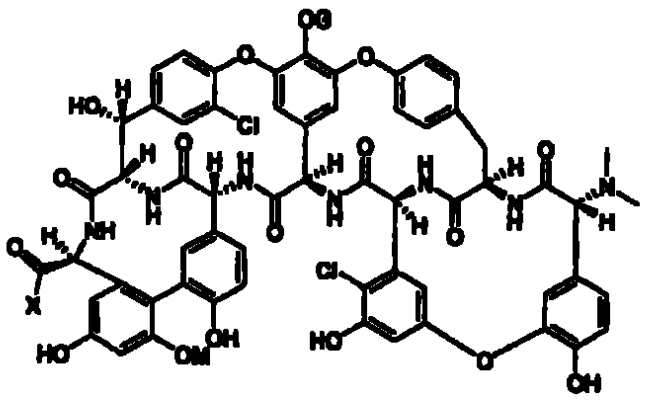
72. El compuesto de la reivindicación 70, en el que R^2 es ácido 10-metil-undecanoico.

334

73. Un compuesto de la fórmula



74. Un compuesto de acuerdo con la fórmula 1, o una sal o solvato
5 farmacéuticamente aceptable del mismo:



1

en la que:

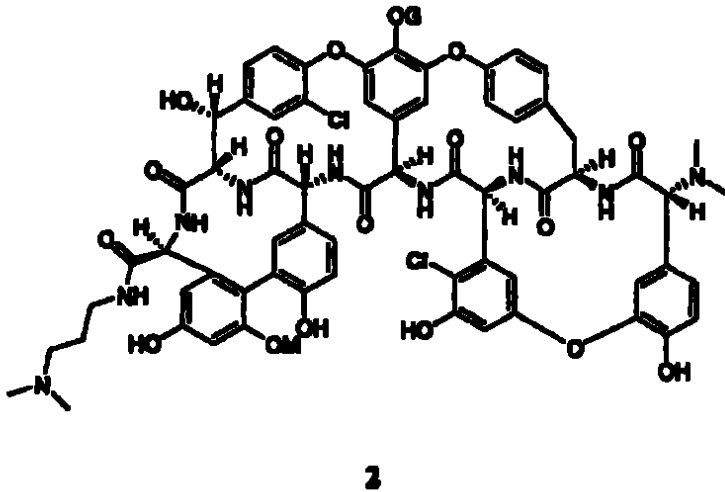
M es hidrógeno, α -D-manopiranosil, o 6-O-acetil- α -D-manopiranosil;

G es hidrógeno, glucuronamina o acilglucuronamina; y

10 X es un aminoalquilamino.

335

75. El compuesto de la reivindicación 74, que tiene la fórmula 2:



5 76. Una forma de dosificación que comprende:

Un polvo de dalbavancina estéril, estable, sin partículas adecuado para reconstitución con un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende factores de dalbavancina B₀ y B₂; y

En el que el contenido de factor B₀ no es menos de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes, y en el que el contenido de B₂ no es menos de aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

15 77. La forma de dosificación de la reivindicación 76, que comprende además al menos un factor de dalbavancina adicional seleccionado entre el grupo constituido por factores de dalbavancina A₀, A₁, B₁, C₀, y C₁.

336 27

78. Una forma de dosificación que comprende:

Un polvo de dalbavancina estéril, estable, sin partículas adecuado para reconstitución con un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende factores de dalbavancina B_0 y B_2 ; y

5 en la que el contenido de factor B_0 no es menos de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes, y en la que el contenido de B_2 no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

10

79. La forma de dosificación de la reivindicación 78, en la que el contenido de B_2 no supera aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC.

80. La forma de dosificación de la reivindicación 78, en la que el contenido de

15 B_2 no supera aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC.

81. La forma de dosificación de la reivindicación 78, que comprende además al menos un factor de dalbavancina adicional seleccionado entre el grupo constituido por factores de dalbavancina A_0 , A_1 , B_1 , C_0 , y C_1 .

20

82. Una composición farmacéutica que comprende:

factor de dalbavancina B_0 , en la que el contenido de factor B_0 no es menos de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes; y

factor de dalbavancina B_2 , en la que el contenido de B_2 no es menor de aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

5 83. La composición farmacéutica de la reivindicación 82, que comprende además al menos un factor de dalbavancina seleccionado entre el grupo constituido por A_0 , A_1 , B_1 , C_0 , y C_1 .

84. Una composición farmacéutica que comprende:

10 factor de dalbavancina B_0 , en la que el contenido de factor B_0 no es menos de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes; y

factor de dalbavancina B_2 , en la que el contenido de B_2 no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC de todos los
15 componentes de dalbavancina presentes.

85. La composición farmacéutica de la reivindicación 84, en la que el contenido de B_2 no supera aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC.

20

86. La composición farmacéutica de la reivindicación 84, en la que el contenido de B_2 no supera aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC.

333 30

87. La composición farmacéutica de la reivindicación 84, que comprende además al menos un factor de dalbavancina adicional seleccionado entre el grupo constituido por factores de dalbavancina A_0 , A_1 , B_1 , C_0 , y C_1 .
- 5 88. Un procedimiento para tratar una infección bacteriana en un paciente con alteración renal en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- seleccionar un paciente con alteración renal;
- administrar dosis inicial y posteriores de dalbavancina en un vehículo
- 10 farmacéuticamente aceptable a un paciente con alteración renal, en el que cada dosis está separada por cinco a diez días, y en el que la cantidad de la dosis inicial es aproximadamente 750 mg y la cantidad de cada dosis posterior es de aproximadamente 250 mg.
- 15 89. El procedimiento de la reivindicación 88, en el que cada dosis está separada por aproximadamente una semana.
90. El procedimiento de la reivindicación 88, comprendiendo el procedimiento administrar una única dosis posterior.
- 20 91. El procedimiento de la reivindicación 90, en el que la dosis posterior se administra aproximadamente una semana después de la dosis inicial sin ninguna dosis intermedia de dalbavancina.

33928

92. El procedimiento de la reivindicación 88, comprendiendo el procedimiento administrar múltiples dosis posteriores.

93. El procedimiento de la reivindicación 92, en el que las dosis posteriores
5 se administran a intervalos de aproximadamente una semana sin ninguna dosis intermedia de dalbavancina.

94. El procedimiento de la reivindicación 88, en el que la infección bacteriana es una infección de la piel y del tejido blando.

10

95. El procedimiento de la reivindicación 88, en el que la infección bacteriana es una infección de la piel y del tejido estructural de la piel.

96. Un procedimiento para tratar una infección bacteriana en un paciente con
15 alteración renal en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

seleccionar un paciente con alteración renal;

administrar dosis inicial y posteriores de dalbavancina en un vehículo
farmacéuticamente aceptable a un paciente con alteración renal, en el que cada
20 dosis está separada por cinco a diez días, y en el que la cantidad de la dosis inicial es aproximadamente 750 mg y la cantidad de cada dosis posterior es de aproximadamente 150 mg.

97. El procedimiento de la reivindicación 96, en el que cada dosis está
25 separada por aproximadamente una semana.

98. El procedimiento de la reivindicación 96, comprendiendo el procedimiento administrar una única dosis posterior.

- 5 99. El procedimiento de la reivindicación 98, en el que la dosis posterior se administra aproximadamente una semana después de la dosis inicial sin ninguna dosis intermedia de dalbavancina.

100. El procedimiento de la reivindicación 96, comprendiendo el procedimiento
10 administrar múltiples dosis posteriores.

101. El procedimiento de la reivindicación 100, en el que las dosis posteriores se administran a intervalos de aproximadamente una semana sin ninguna dosis intermedia de dalbavancina.

15

102 El procedimiento de la reivindicación 96, en el que la infección bacteriana es una infección de la piel y del tejido blando.

103. El procedimiento de la reivindicación 96, en el que la infección bacteriana
20 es una infección de la piel y del tejido estructural de la piel.

104. Un procedimiento para tratar una infección bacteriana en un ser humano en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

seleccionar un paciente que tiene una infección bacteriana; y

administrar dosis inicial y posteriores de dalbavancina en un vehículo farmacéuticamente aceptable al paciente, en el que cada dosis está separada por cinco a diez días, y en el que la cantidad de la dosis inicial es aproximadamente 1200 mg y la cantidad de cada dosis posterior es de 5 aproximadamente 600 mg.

105. El procedimiento de la reivindicación 104, en el que cada dosis está separada por aproximadamente una semana.

10 106. El procedimiento de la reivindicación 104, comprendiendo el procedimiento administrar una única dosis posterior.

107. El procedimiento de la reivindicación 106, en el que la dosis posterior se administra aproximadamente una semana después de la dosis inicial sin 15 ninguna dosis intermedia de dalbavancina.

108. El procedimiento de la reivindicación 104, comprendiendo el procedimiento administrar múltiples dosis posteriores.

20 109. El procedimiento de la reivindicación 108, en el que las dosis posteriores se administran a intervalos de aproximadamente una semana sin ninguna dosis intermedia de dalbavancina.

110 El procedimiento de la reivindicación 104, en el que la infección 25 bacteriana es una infección de la piel y del tejido blando.

111. El procedimiento de la reivindicación 104, en el que la infección bacteriana es una infección de la piel y del tejido estructural de la piel.

- 5 112. Un procedimiento para tratar una infección bacteriana en un paciente con alteración renal grave en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

seleccionar un paciente con alteración renal con una eliminación de creatinina de menos de 30 ml/min;

- 10 proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende dalbavancina; y

administrar la dosis terapéuticamente eficaz al paciente en necesidad de la misma.

- 15 113. El procedimiento de la reivindicación 112, en el que la dosis terapéuticamente eficaz está entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 1200 mg.

- 20 114. El procedimiento de la reivindicación 112, en el que la dosis terapéuticamente eficaz es aproximadamente 500 mg.

115. El procedimiento de la reivindicación 112, en el que la dosis terapéuticamente eficaz es aproximadamente 1000 mg.

116. Un procedimiento para tratar una infección bacteriana en un paciente con alteración renal grave en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

seleccionar un paciente con alteración renal con una eliminación de creatinina de menos de 30 ml/min;

proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende aproximadamente 1000 mg de dalbavancina; y

administrar la dosis terapéuticamente eficaz al paciente en necesidad de la misma.

10

117. El procedimiento de la reivindicación 116, en el que la infección bacteriana es una infección complicada y/o no complicada de la piel y de la estructura de la piel.

15 **118. El procedimiento de la reivindicación 116, en el que la dosis terapéuticamente eficaz es una única dosis.**

119. El procedimiento de la reivindicación 116, en el que la dosis terapéuticamente eficaz es una única dosis administrada durante al menos aproximadamente 30 minutos.

120. El procedimiento de la reivindicación 116, que comprende además la etapa de proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz posterior de aproximadamente 500 mg aproximadamente 10 a aproximadamente 18 días después de la dosis terapéuticamente eficaz de 1000 mg.

25

121. El procedimiento de la reivindicación 120, en el que la dosis terapéuticamente eficaz posterior de aproximadamente 500 mg se administra aproximadamente 14 días después de la dosis terapéuticamente eficaz de 1000 mg.

122. Un procedimiento para tratar una infección bacteriana en un paciente con alteración renal grave en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

10 seleccionar un paciente con alteración renal con una eliminación de creatinina de menos de 30 ml/min;

 proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende aproximadamente 750 mg de dalbavancina; y

 administrar la dosis terapéuticamente eficaz al paciente en necesidad de

15 la misma.

123. El procedimiento de la reivindicación 122, en el que la infección bacteriana es una infección complicada y/o no complicada de la piel y de la estructura de la piel.

20

124. El procedimiento de la reivindicación 122, en el que la dosis terapéuticamente eficaz es una única dosis.

245

125. El procedimiento de la reivindicación 122, en el que la dosis terapéuticamente eficaz es una única dosis administrada durante al menos aproximadamente 30 minutos.

5 126. El procedimiento de la reivindicación 122, que comprende además la etapa de proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz posterior de aproximadamente 250 mg aproximadamente 10 a aproximadamente 18 días después de la dosis terapéuticamente eficaz de 750 mg.

10 127. El procedimiento de la reivindicación 126, en el que la dosis terapéuticamente eficaz posterior de 250 mg se administra aproximadamente 14 días después de la dosis terapéuticamente eficaz de 750 mg.

128. Un procedimiento para tratar una infección bacteriana en un paciente con
15 alteración renal grave en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

seleccionar un paciente con alteración renal con una eliminación de creatinina de menos de 30 ml/min, sin diálisis;

proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición
20 farmacéutica que comprende de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 1200 mg de dalbavancina; y

administrar la dosis terapéuticamente eficaz al paciente en necesidad de la misma.

25 129. Una composición farmacéutica que comprende:

246

factor de dalbavancina B₂, en la que el contenido de factor B₂ no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC;

factor de dalbavancina isoB₀, en la que el contenido de factor isoB₀ no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC; y

5 MAG, en la que el contenido de MAG no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC.

130. La composición farmacéutica de la reivindicación 129, en la que los contenidos de factor de dalbavancina B₂, isoB₀, y MAG no superan
10 aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC.

131. La composición farmacéutica de la reivindicación 129, en la que al menos uno de los contenidos de factor de dalbavancina B₂, isoB₀, y MAG no supera aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC.

15

132. La composición farmacéutica de la reivindicación 129, en la que los contenidos de factor de dalbavancina B₂, isoB₀, y MAG no superan aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC.

20 133. La composición farmacéutica de la reivindicación 129, en la que al menos uno de los contenidos de factor de dalbavancina B₂, isoB₀, y MAG no supera aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC.

134. Una composición farmacéutica que comprende:

24727

factor de dalbavancina B₂, en la que el contenido de factor B₂ no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC; y

factor de dalbavancina isoB₀, en la que el contenido de factor isoB₀ no supera aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC.

5

135. La composición farmacéutica de la reivindicación 134, en la que los contenidos de factor de dalbavancina B₂, isoB₀, y MAG no superan aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC.

10 136. La composición farmacéutica de la reivindicación 134, en la que al menos uno de los contenidos de factor de dalbavancina B₂, isoB₀, y MAG no supera aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC.

137. La composición farmacéutica de la reivindicación 134, en la que los
15 contenidos de factor de dalbavancina B₂, isoB₀, y MAG no superan aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC.

138. La composición farmacéutica de la reivindicación 134, en la que al menos uno de los contenidos de factor de dalbavancina B₂, isoB₀, y MAG no supera
20 aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC.

139. Un procedimiento para secar dalbavancina, que comprende las etapas de:

proporcionar dalbavancina húmeda que comprende dalbavancina, agua y
25 un disolvente;

2/12/25

secar la dalbavancina húmeda a una temperatura de aproximadamente 30°C o menos a una presión de vacío de aproximadamente 50 mbar (5 kPa) o menos, hasta que el nivel de agua de la dalbavancina húmeda sea menos de aproximadamente el 20% (p/p);

5 añadir agua a la dalbavancina; y

secar al menos una vez más la dalbavancina húmeda a una temperatura de aproximadamente 30°C o menos a una presión de vacío de aproximadamente 50 mbar (5 kPa) o menos, hasta que el nivel de disolvente de la dalbavancina húmeda sea menos de aproximadamente el 3,0% (p/p).

10

140. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que las etapas de añadir agua y secar la dalbavancina húmeda a una temperatura de aproximadamente 30°C o menos, a una presión de vacío de aproximadamente 50 mbar (5 kPa) o menos se repiten hasta que el nivel de disolvente es menos de

15 aproximadamente el 3,0% (p/p).

141. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que las etapas de añadir agua y secar la dalbavancina húmeda a una temperatura de aproximadamente 30°C o menos, a una presión de vacío de aproximadamente 50 mbar (5 kPa) o

20 menos se repiten hasta que el nivel de disolvente es menos de aproximadamente el 2,5% (p/p).

142. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que las etapas de añadir agua y secar la dalbavancina húmeda a una temperatura de aproximadamente

25 30°C o menos, a una presión de vacío de aproximadamente 50 mbar (5 kPa) o

menos se repiten hasta que el nivel de disolvente es menos de aproximadamente el 2,0% (p/p).

5 143. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que las etapas de añadir agua y secar la dalbavancina húmeda a una temperatura de aproximadamente 30°C o menos, a una presión de vacío de aproximadamente 50 mbar (5 kPa) o menos se repiten hasta que el nivel de disolvente es menos de aproximadamente el 1,5% (p/p).

10 144. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que las etapas de añadir agua y secar la dalbavancina húmeda a una temperatura de aproximadamente 30°C o menos, a una presión de vacío de aproximadamente 50 mbar (5 kPa) o menos se repiten hasta que el nivel de disolvente es menos de aproximadamente el 1,0% (p/p).

15

145. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que las etapas de añadir agua y secar la dalbavancina húmeda a una temperatura de aproximadamente 30°C o menos, a una presión de vacío de aproximadamente 50 mbar (5 kPa) o menos se repiten hasta que el nivel de disolvente es menos de
20 aproximadamente el 0,5% (p/p).

146. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que el disolvente es acetona.

250 27.

147. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que el disolvente se selecciona entre el grupo constituido por etanol, metanol, propanol, butanol, éter, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, cloroformo, 1,4-dioxano, y tricloroetileno.

5

148. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda se seca a una temperatura de aproximadamente 28°C o menos.

149. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina
10 húmeda se seca a una temperatura de aproximadamente 26°C o menos.

150. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda se seca a una temperatura de aproximadamente 24°C o menos.

15 151. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda se seca a una presión de vacío de aproximadamente 40 mbar (4 kPa) o menos.

152. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina
20 húmeda se seca a una presión de vacío de aproximadamente 30 mbar (3 kPa) o menos.

153. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda se seca a una presión de vacío de aproximadamente 20 mbar (2 kPa) o
25 menos.

154. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda se seca a una presión de vacío de aproximadamente 10 mbar (1 kPa) o menos.

5

155. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda comprende además MAG y en el que, después de secar, el MAG está presente en menos de aproximadamente el 3,0 por ciento de la distribución de HPLC.

10

156. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda comprende además MAG y en el que, después de secar, el MAG está presente en menos de aproximadamente el 2,5 por ciento de la distribución de HPLC.

15

157. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda comprende además MAG y en el que, después de secar, el MAG está presente en menos de aproximadamente el 2,0 por ciento de la distribución de HPLC.

20

158. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda comprende además MAG y en el que, después de secar, el MAG está presente en menos de aproximadamente el 1,5 por ciento de la distribución de HPLC.

25

159. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda comprende además MAG y en el que, después de secar, el MAG está presente en menos de aproximadamente el 1,0 por ciento de la distribución de HPLC.

5

160. El procedimiento de la reivindicación 139, en el que la dalbavancina húmeda comprende además MAG y en el que, después de secar, el MAG está presente en menos de aproximadamente el 0,5 por ciento de la distribución de HPLC.

10

161. El procedimiento de la reivindicación 140, en el que el nivel de agua se mide usando un análisis de Karl Fischer.

162. Una composición farmacéutica que comprende:

15 factor de dalbavancina B_0 y al menos un factor de dalbavancina adicional seleccionado entre el grupo constituido por factores de dalbavancina A_0 , A_1 , B_1 , B_2 , C_0 , C_1 , $isoB_0$, y MAG; y

en la que el contenido de factor B_0 no es menos de aproximadamente el 75% de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes, y en la que un contenido de acetona no supera aproximadamente el 2,5%.

20

163. La composición farmacéutica de la reivindicación 162, en la que la composición comprende factores de dalbavancina B_0 y MAG, y en la que un contenido de MAG es menos de aproximadamente el 3,0%.

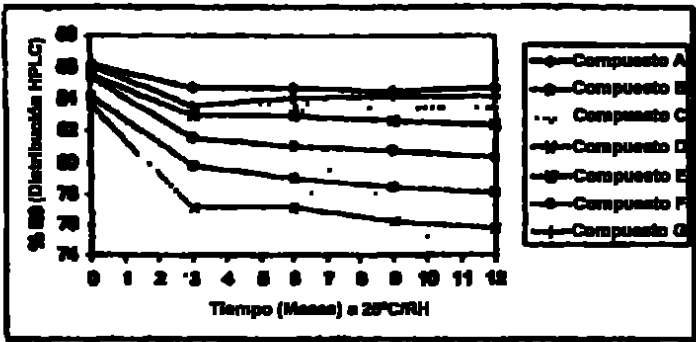
25

RESUMEN

La invención proporciona procedimientos y composiciones para el tratamiento de infecciones bacterianas. La composición puede ser una combinación de factores, que incluyen A₀, A₁, B₁, B₂, C₀, C₁, isoB₀, y MAG, en presencia de un nivel bajo de disolvente. Los procedimientos de la invención incluyen administración de formulaciones de dalbavancina para el tratamiento de una infección bacteriana, en particular una infección bacteriana Gram-positiva de la piel y el tejido blando. Los regímenes de dosificación incluyen administración de múltiples dosis de dalbavancina, que a menudo permanece a niveles terapéuticos en el torrente sanguíneo durante al menos una semana, proporcionando acción terapéutica prolongada contra una infección bacteriana. También se incluyen los regímenes de dosificación para pacientes renales.

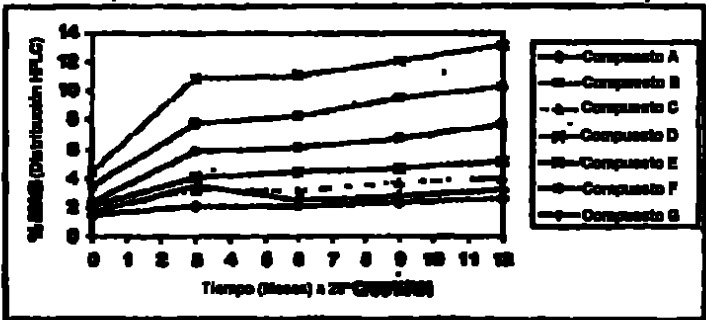
391. 11/11

Fig. 1A. Datos de Estabilidad del Producto del Fármaco Dalbavancina
(a 25°C)



Tiempo (Meses)	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto C	Compuesto D	Compuesto E	Compuesto F	Compuesto G
0	88,20	84,20	86,80	83,60	86,60	86,40	86,10
3	84,70	79,80	83,80	77,10	83,00	81,50	83,60
6	84,70	79,00	83,80	77,10	83,00	81,00	84,10
9	84,50	78,40	83,40	76,20	82,60	80,70	84,20
12	84,70	78,10	83,50	75,70	82,40	80,30	84,20
ΔB_1	1,50	6,10	2,30	7,90	3,10	6,10	1,80

Fig. 1B. Datos de Estabilidad del Producto del Fármaco Dalbavancina
(a 25°C)

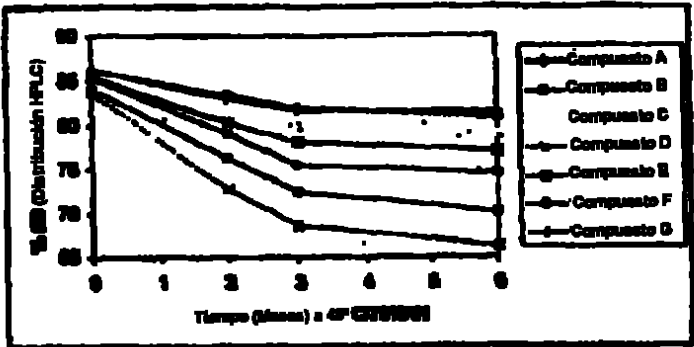


Tiempo (Meses)	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto C	Compuesto D	Compuesto E	Compuesto F	Compuesto G
0	1,50	3,50	1,50	4,50	2,10	2,30	1,60
3	2,10	7,80	3,20	10,90	4,10	5,80	3,50
6	2,10	8,20	3,10	11,10	4,40	6,10	2,50
9	2,30	9,50	3,70	12,10	4,70	6,70	2,80

3422

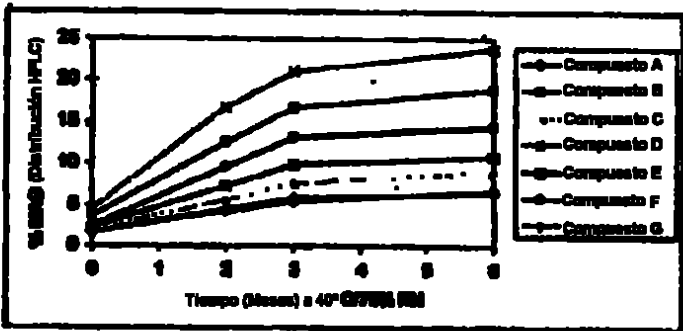
12	2,60	10,30	4,00	13,10	5,20	7,70	3,20
Δ MAG	1,10	6,50	2,20	8,60	3,10	5,40	1,60

Fig. 2A. Datos de Estabilidad del Producto del Fármaco Dalbavancina (a 40°C)



Tiempo (Meses)	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto C	Compuesto D	Compuesto E	Compuesto F	Compuesto G
0	88,20	84,20	85,80	83,80	85,50	85,40	88,10
2	83,50	78,30	82,20	72,70	80,30	79,00	83,10
3	81,90	72,40	80,00	68,80	78,10	75,50	81,80
6	80,80	70,10	79,10	68,20	77,10	74,50	81,50
Δ B ₁	5,30	14,10	8,70	17,40	8,40	10,90	4,60

Fig. 2B. Datos de Estabilidad del Producto del Fármaco Dalbavancina (a 40°C)

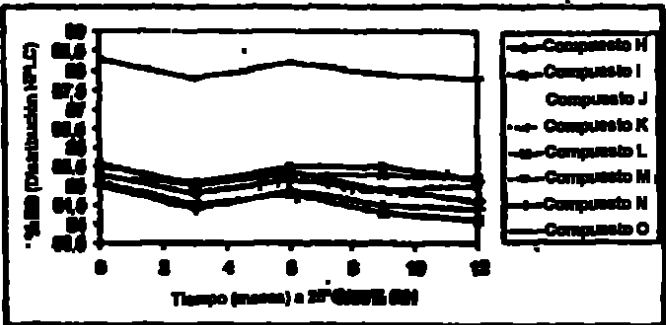


Tiempo (Meses)	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto C	Compuesto D	Compuesto E	Compuesto F	Compuesto G
0	1,50	3,50	1,80	4,50	2,10	2,30	1,80
2	4,10	12,50	5,50	16,60	7,30	9,50	4,40
3	5,40	16,60	7,50	21,00	9,80	13,10	5,80
6	6,60	16,80	9,10	23,70	10,80	14,40	6,40

356

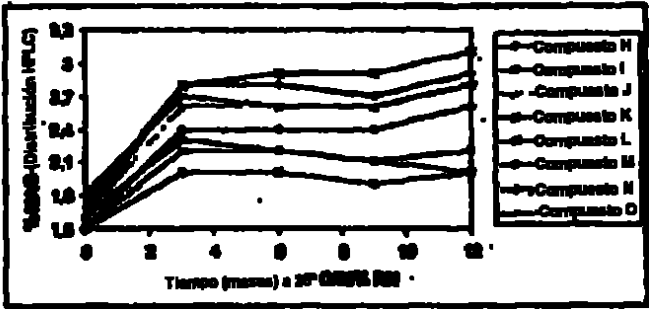
Δ MAG	5,10	18,30	7,30	18,20	8,70	12,10	4,80
-------	------	-------	------	-------	------	-------	------

Fig. 3A. Datos de Estabilidad del Producto del Fármaco Dalbavancina
(a 25°C)



Tiempo (Meses)	Comp. H	Comp. I	Comp. J	Comp. K	Comp. L	Comp. M	Comp. N	Comp. O
0	85,3	88,8	85,7	85,3	86,1	86,9	88,0	88,3
3	84,3	88,1	84,8	85,0	84,5	83,0	84,4	87,8
6	86,2	88,5	85,1	85,3	84,8	86,4	84,9	88,2
9	84,9	85,9	84,3	86,3	84,3	84,9	84,5	87,0
12	84,5	88,2	84,2	85,2	84,1	88,0	84,4	87,8
Δ B ₁	0,78	0,30	1,20	0,10	1,00	0,80	0,40	0,50

Fig. 3B. Datos de Estabilidad del Producto del Fármaco Dalbavancina
(a 40°C)

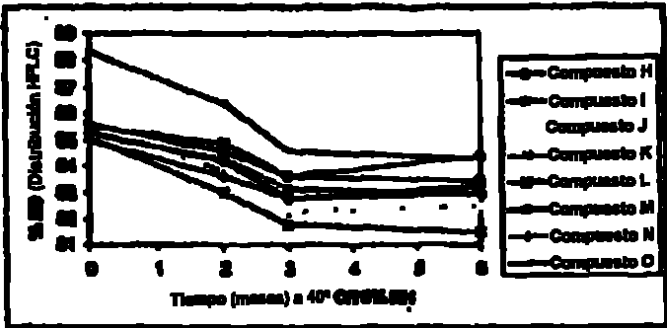


Tiempo (Meses)	Comp. H	Comp. I	Comp. J	Comp. K	Comp. L	Comp. M	Comp. N	Comp. O
0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,7	1,8
3	2,4	2,0	2,8	2,2	2,8	2,3	2,6	2,7
6	2,4	2,0	2,8	2,2	2,9	2,2	2,8	2,8

35x
44x

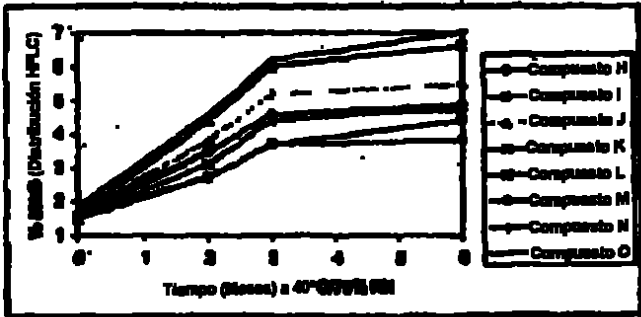
9	2,4	1,8	2,6	2,1	2,9	2,1	2,7	2,8
12	2,5	2,0	2,8	2,0	3,1	2,2	2,8	2,8
Δ MAG	1,10	0,50	1,20	0,80	1,50	0,80	1,20	1,00

Fig. 4A. Datos de Estabilidad del Producto del Fármaco Dalbavancina
(a 40°C)



Tiempo (Meses)	Comp. H	Comp. I	Comp. J	Comp. K	Comp. L	Comp. M	Comp. N	Comp. O
0	85,3	86,6	80,7	86,2	88,1	86,4	83,9	83,30
2	84,2	84,2	83,8	84,3	83,0	84,0	83,5	86,40
3	82,8	83,6	82,3	83,1	81,5	83,6	82,8	84,80
6	82,0	82,4	82,5	83,0	81,5	84,4	82,2	84,80
Δ B _p	2,3	2,1	3,2	2,3	3,0	1,2	1,6	4

Fig. 4B. Datos de Estabilidad del Producto del Fármaco Dalbavancina
(a 40°C)



Tiempo (Meses)	Comp. H	Comp. I	Comp. J	Comp. K	Comp. L	Comp. M	Comp. N	Comp. O
0	1,5	1,5	1,8	1,5	1,8	1,8	1,7	1,80
2	3,5	2,7	3,2	3,1	4,4	2,7	3,5	4,00
3	4,8	3,7	6,2	4,4	6,0	3,7	4,8	6,20
6	4,9	4,4	5,5	4,0	6,6	3,8	4,7	7,00

398
57

Δ MAG	3,4	2,9	3,8	3,3	6,0	2,2	2,0	5,2
-------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

350
354
356

Fig. 5

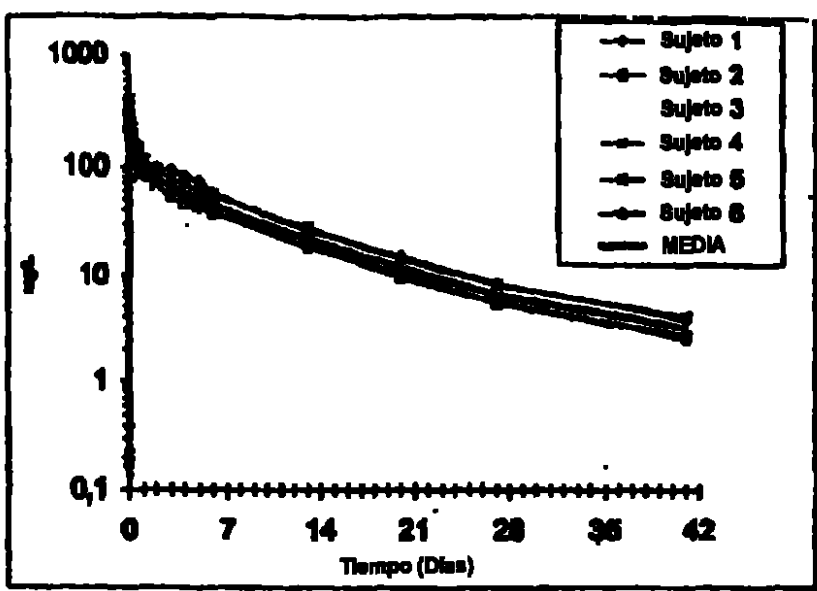
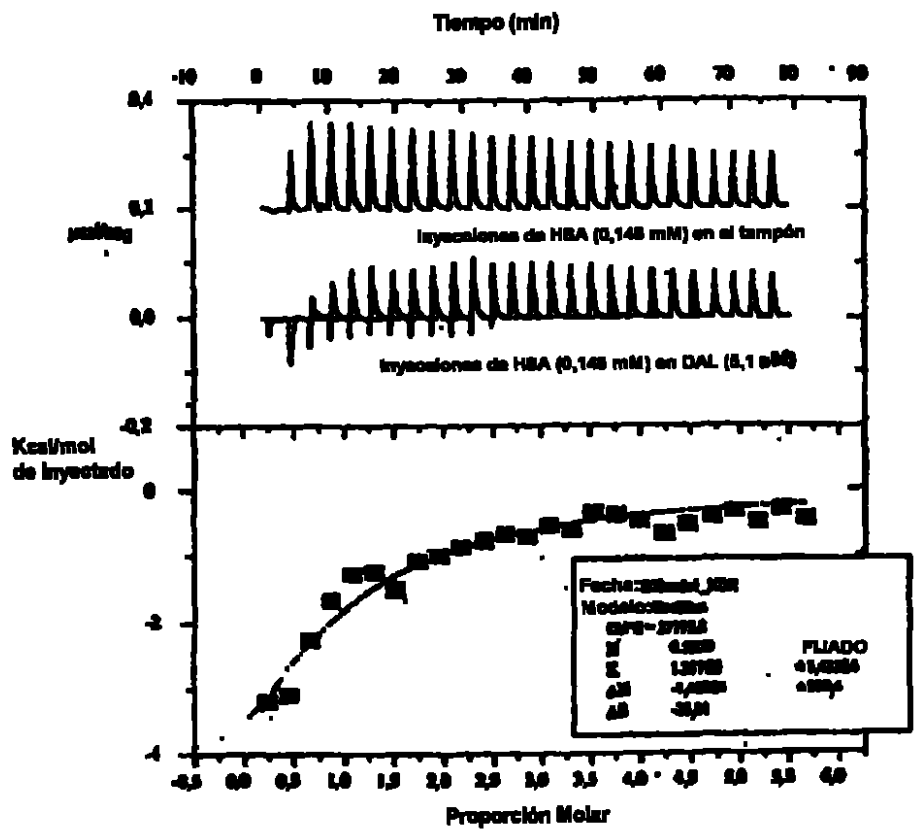


Fig. 6



360

331

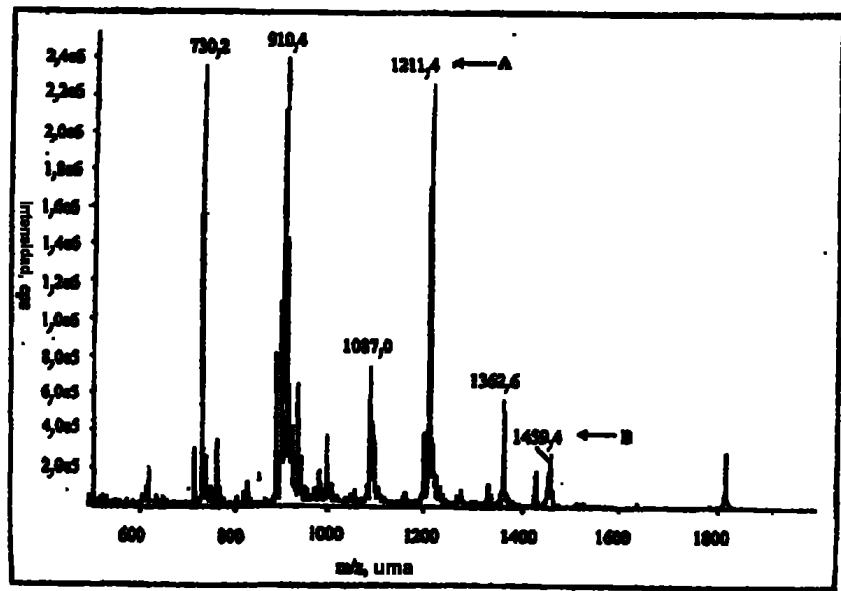


Fig. 7

360
331

361 85

Fig. 8

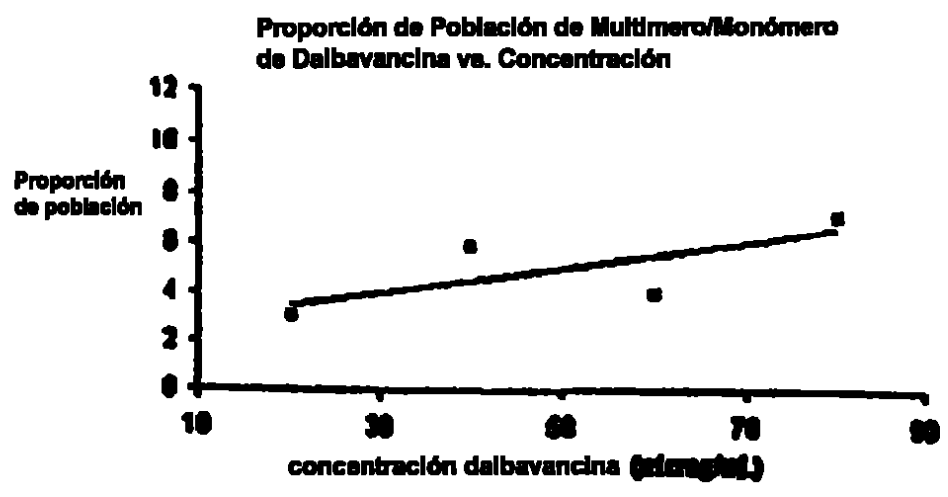
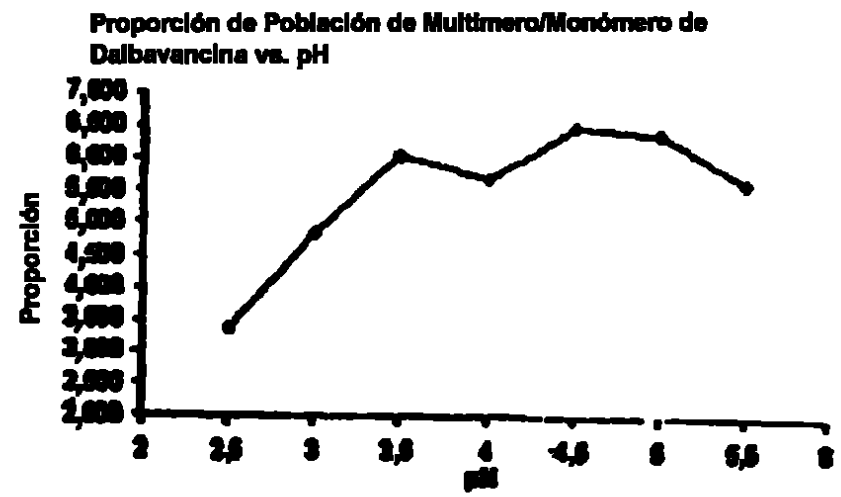


Fig. 9



36-2
228

Fig. 10

Espectro completo de detección IEN/EM de dalbavancina
en formiato de amonio 5 mM pH 5

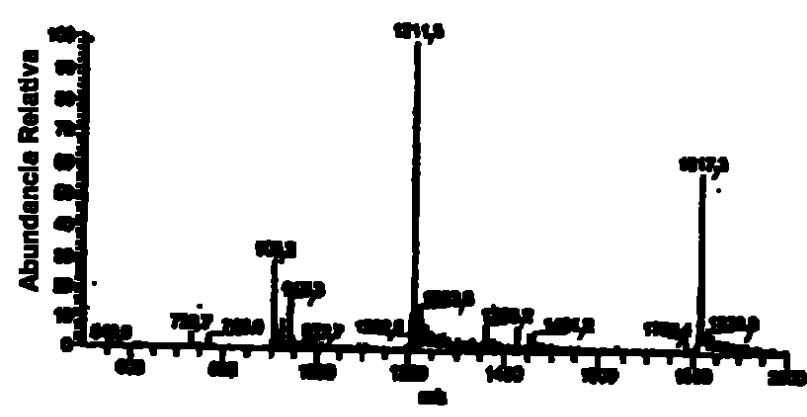
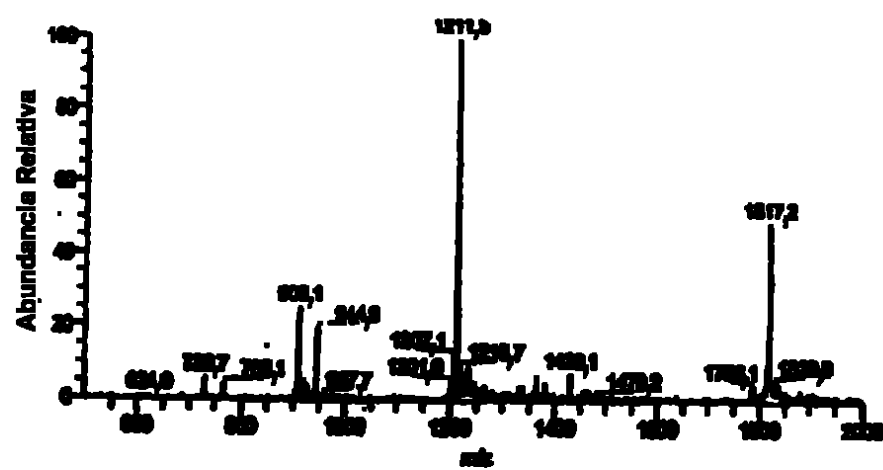


Fig. 11

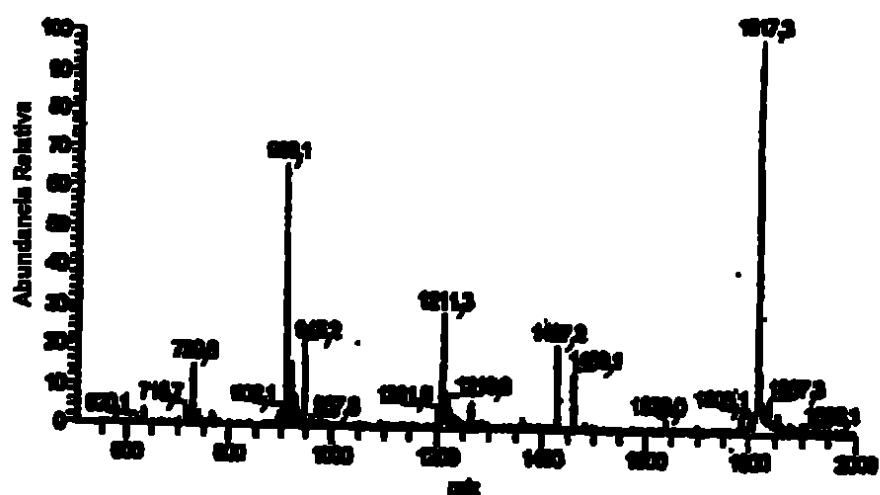
Espectro completo de detección IEN/EM de dalbavancina
en formiato de amonio 50 mM pH 5



263 92

Fig. 12

Espectro completo de detección IEN/EM de dalbavancina
en formiato de amonio 100 mM pH 5

**Fig. 13**

Espectro completo de detección IEN/EM de telcoplanina
(50 µg/ml) en agua



364
X

Fig. 14

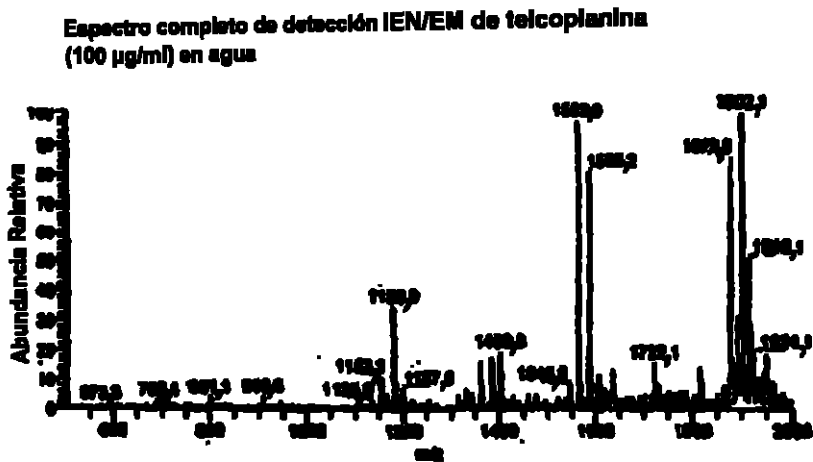
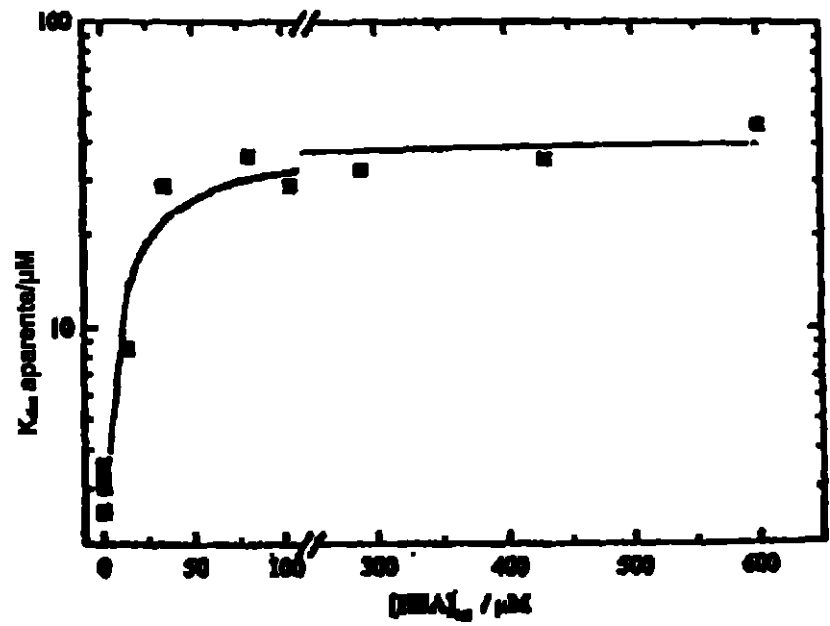
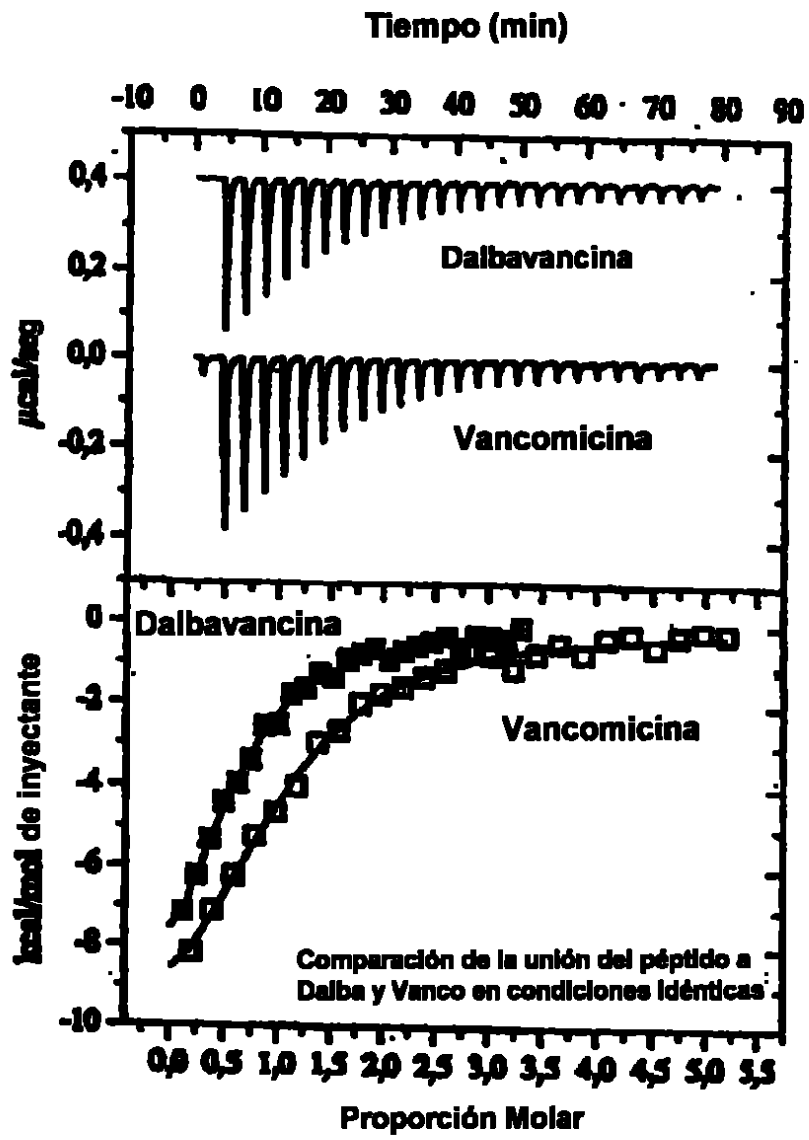


Fig. 15



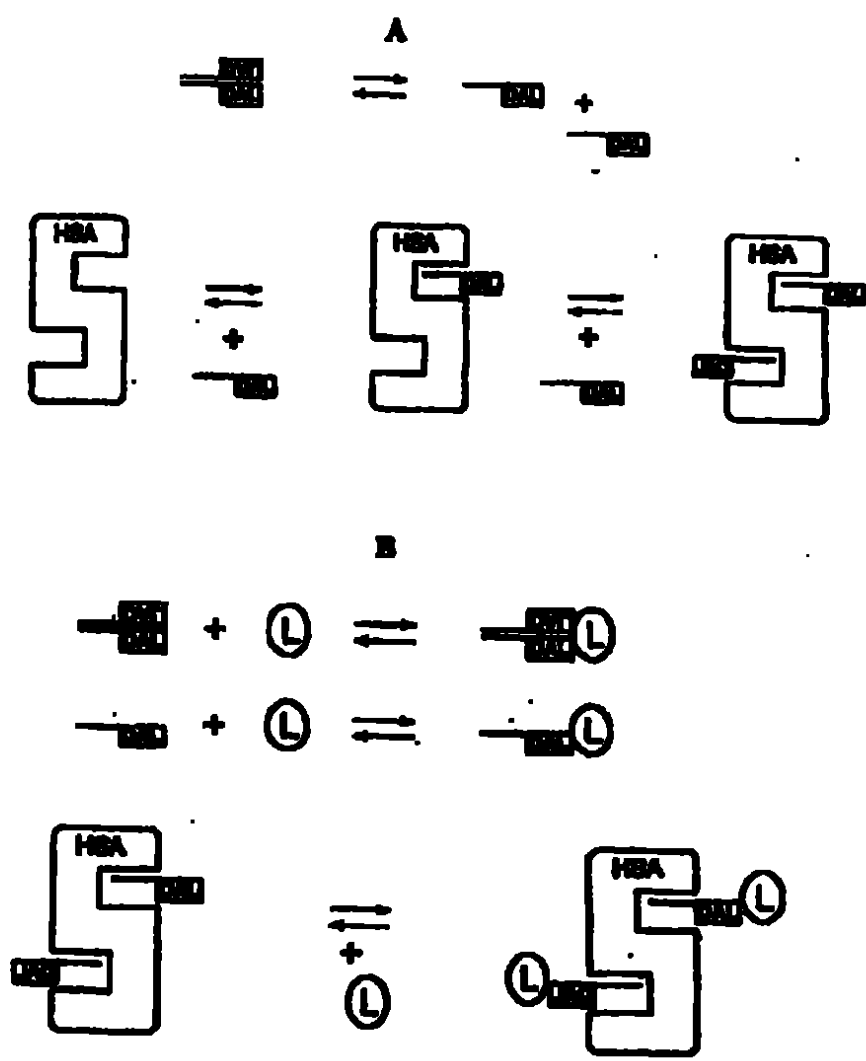
3692

Fig. 16



363

Fig. 17



367 24

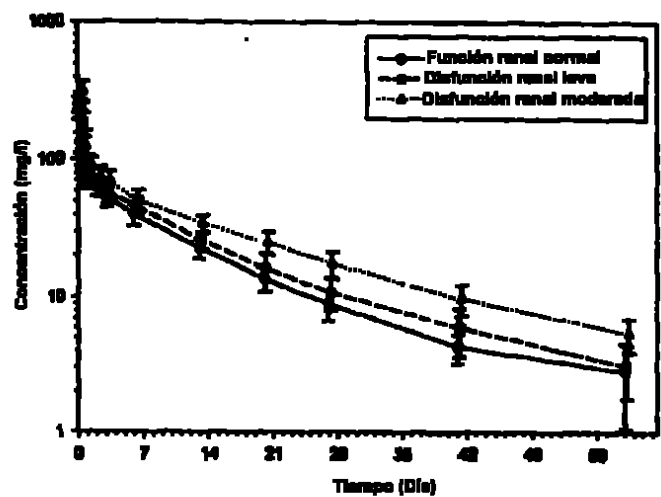


Fig. 18. MEDIA ($\pm$ dt) Perfiles de Concentración en plasma de Dalbavancina – Tiempo después de la Administración de 1000 mg de Dalbavancina en Sujetos con Disfunción Renal Leve, Disfunción Renal Moderada o Función Renal Normal (Estudio Clínico VER001-13)

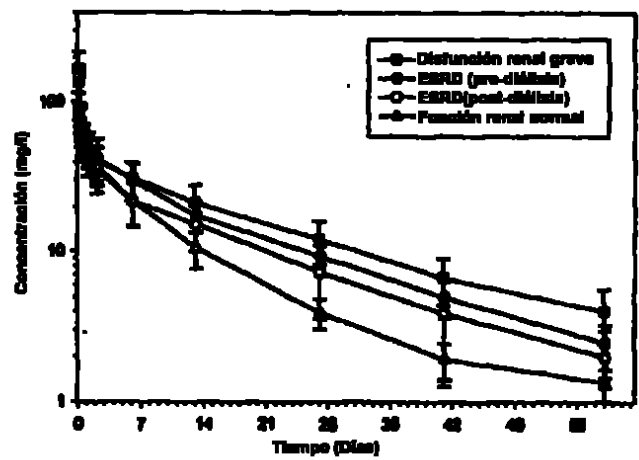


Fig. 19. MEDIA ($\pm$ dt) Perfiles de Concentración en plasma de Dalbavancina – Tiempo después de la Administración de 500 mg de Dalbavancina en Sujetos con Disfunción Renal Grave, Enfermedad Renal en la Etapa Final (Dependiente de Diálisis) o Función Renal Normal (Estudio Clínico VER001-11)

368 g
2

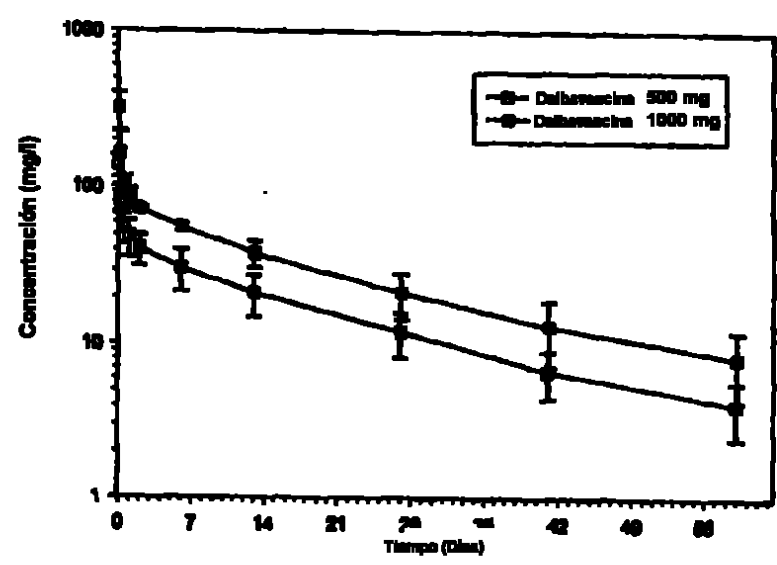
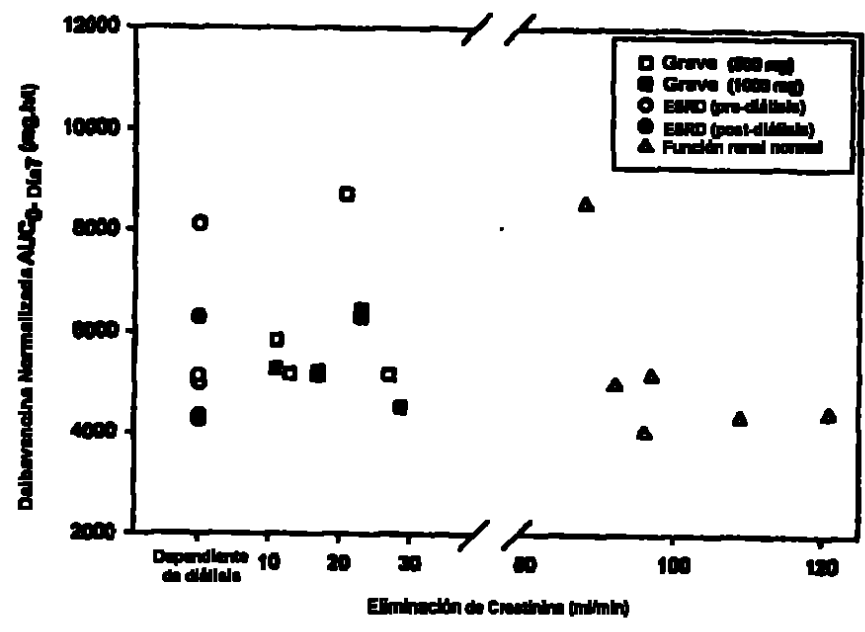


Fig. 20. MEDIA ($\pm$ dt) Perfiles de Concentración en plasma de Dalbavancina – Tiempo después de la Administración de 500 mg o 1000 mg de Dalbavancina en Sujetos con Disfunción Renal Grave (Estudio Clínico VER001-11)



AUC₀₋₇ normalizado a una dosis de 500 mg

Fig. 21. Exposición a Dalbavancina a través del Periodo de Tratamiento Relativo (AUC₀₋₇) Frente a eliminación de Creatinina (CL_{CR}) (Estudio Clínico VER001-11)

364 8

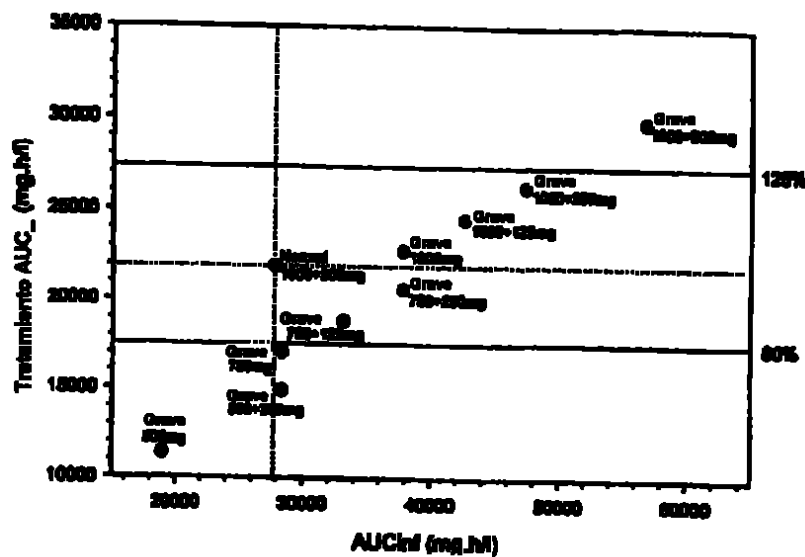


Fig. 22. Comparación de la Exposición Durante el Periodo de Tratamiento Relativo ($AUC_{14días}$ o $AUC_{tratamiento}$) Frente a la Exposición Total (AUC_{0-14d}) con Ajustes de Dosis Posibles para Pacientes con Disfunción Renal Grave (Estudio Clínico VER001-11)

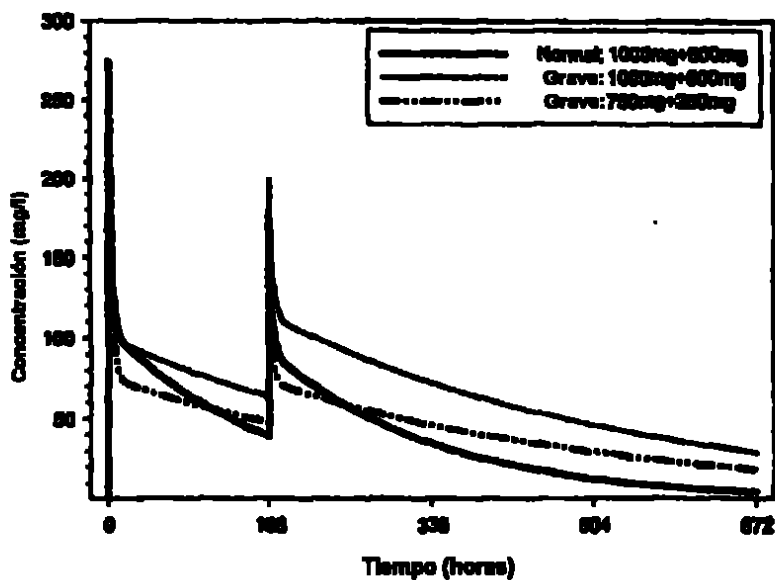


Fig. 23. Perfiles de Concentración de Dalbavancina - Tiempo para Sujetos con Función Renal Normal y Sujetos con Disfunción Renal Grave que Reciben la Dosis no Ajustada, y Sujetos con Disfunción Renal Grave que Reciben el Ajuste de Dosis Recomendado (Estudio Clínico VER001-11)

370
X
L

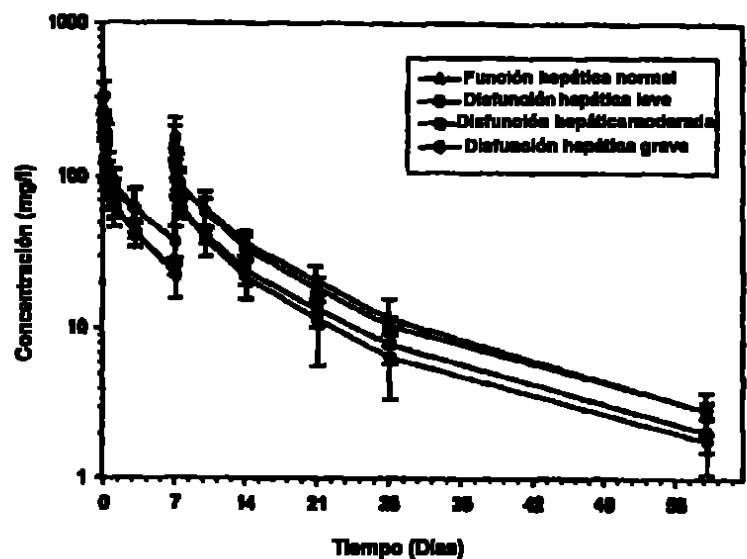


Fig. 24. MEDIA ($\pm$ dt) Perfiles de Concentración en plasma de Dalbavancina – Tiempo después de la Administración de 1000 mg de Dalbavancina en el Día 1 y 500 mg de Dalbavancina en el Día 8 en Sujetos con Disfunción Hepática Leve, Disfunción Hepática Moderada, Disfunción hepática grave o Función Hepática Normal

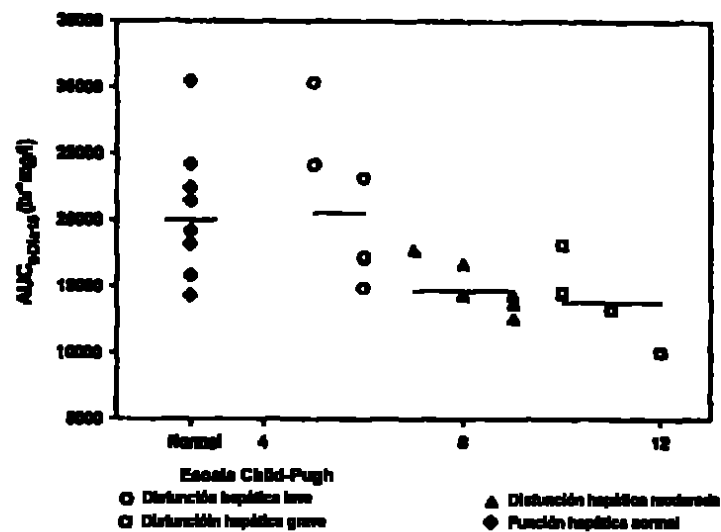


Fig. 25. Comparación de la exposición a Dalbavancina a través del Periodo de Tratamiento de 14 Días relativo (AUC₀₋₁₄) en Sujetos con Disfunción Hepática Leve, Moderada, Grave o con Función Hepática Normal

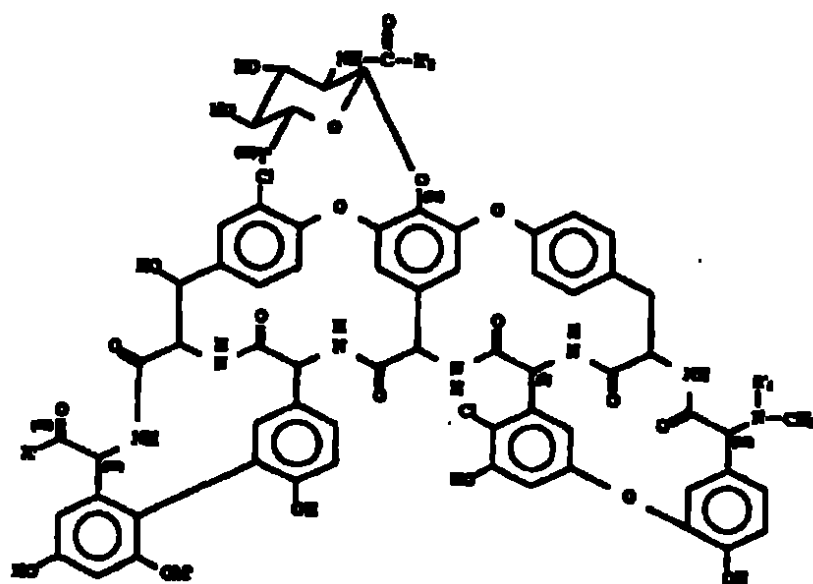


Fig. 26. Estructura del Antibiótico A40926 y Compuestos de Dalbavancina

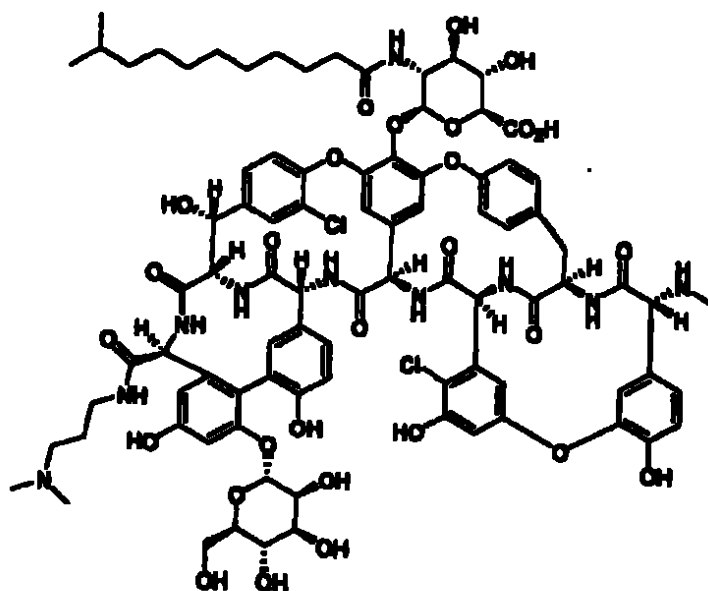


Fig. 27. Estructura del Dalbavancina B₀.

376

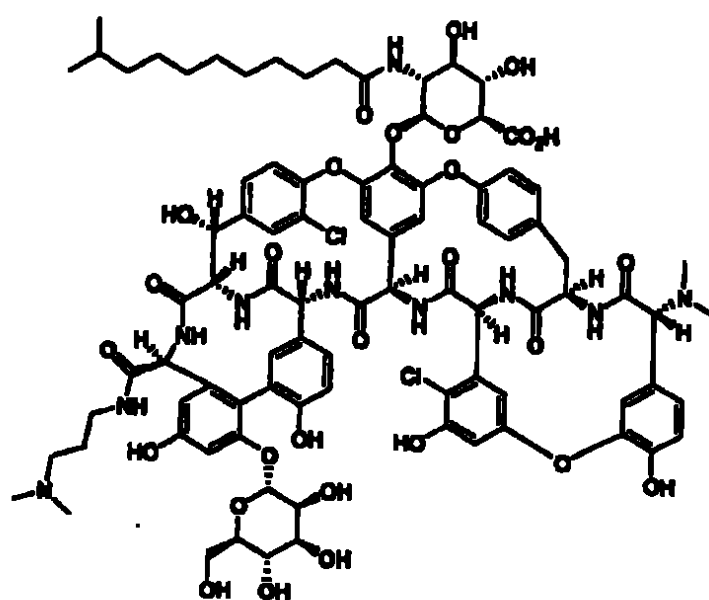


Fig. 28. Estructura de un Compuesto N¹⁸, N¹⁸-dimetilo

3730

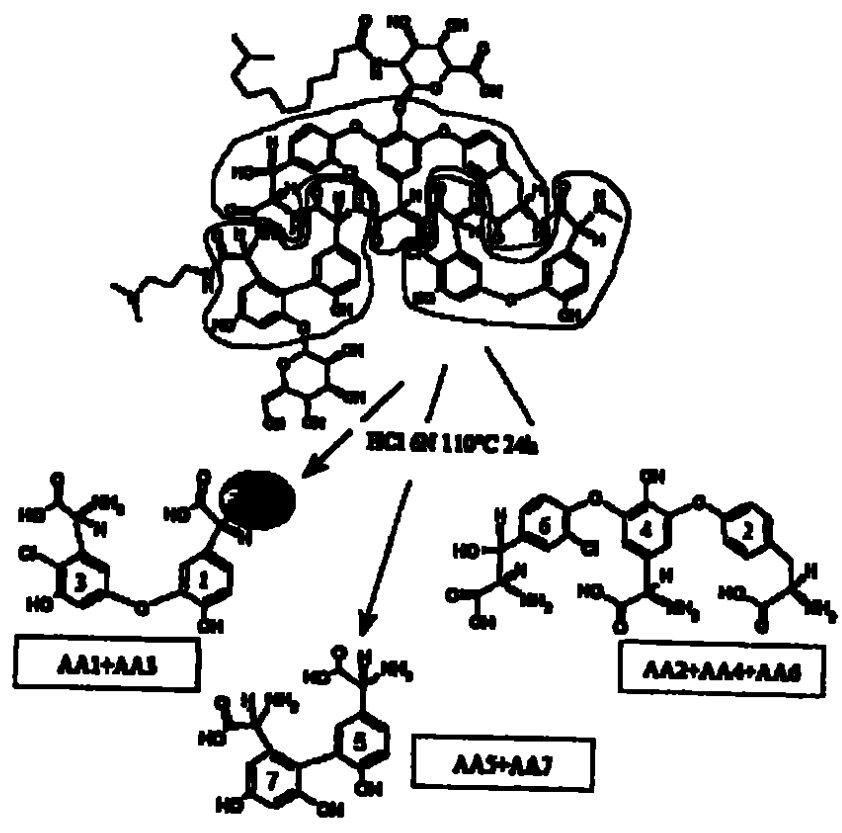
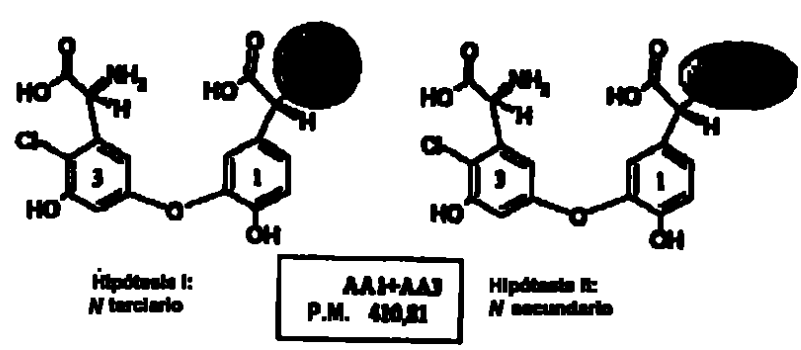


Fig. 29



374/2

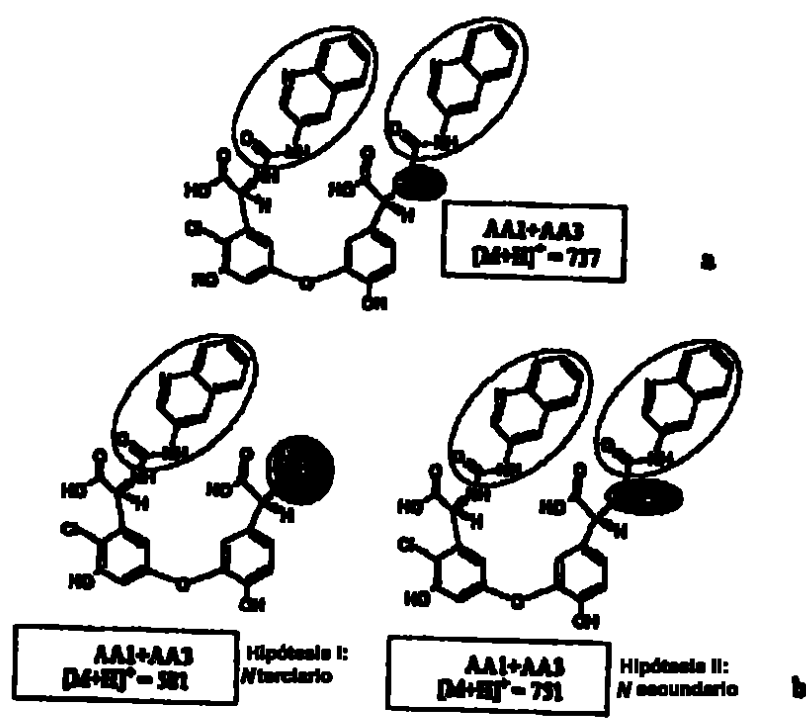


Fig. 31

375 N
S

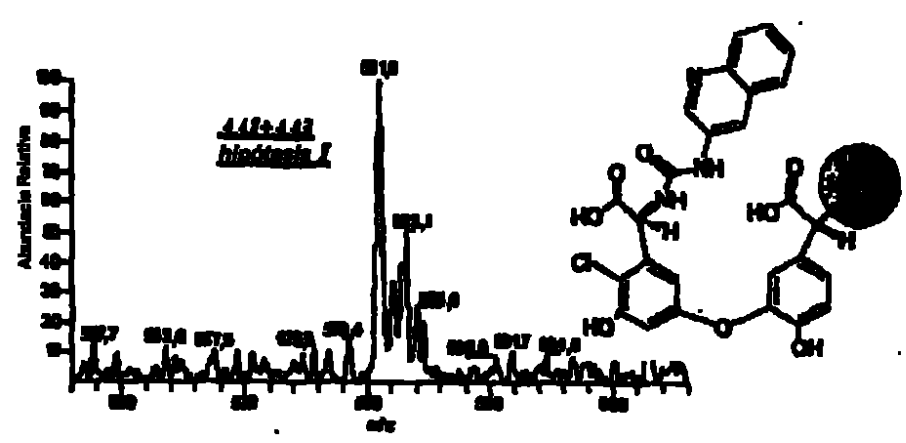


Fig. 32

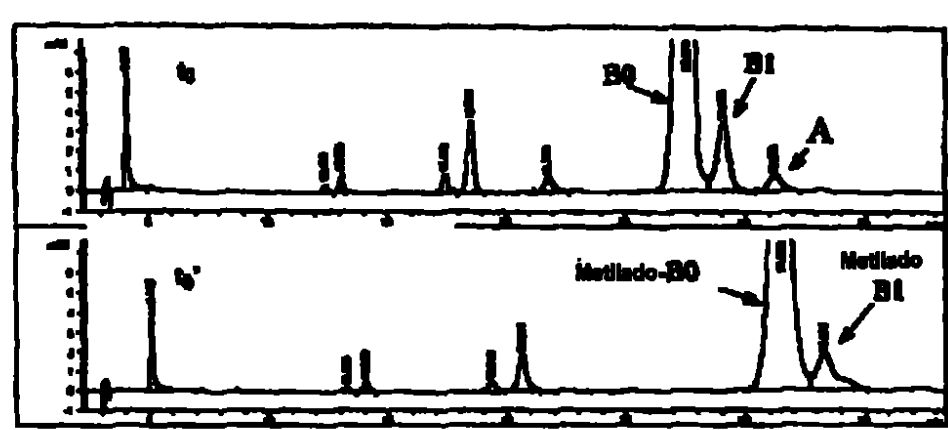


Fig. 33

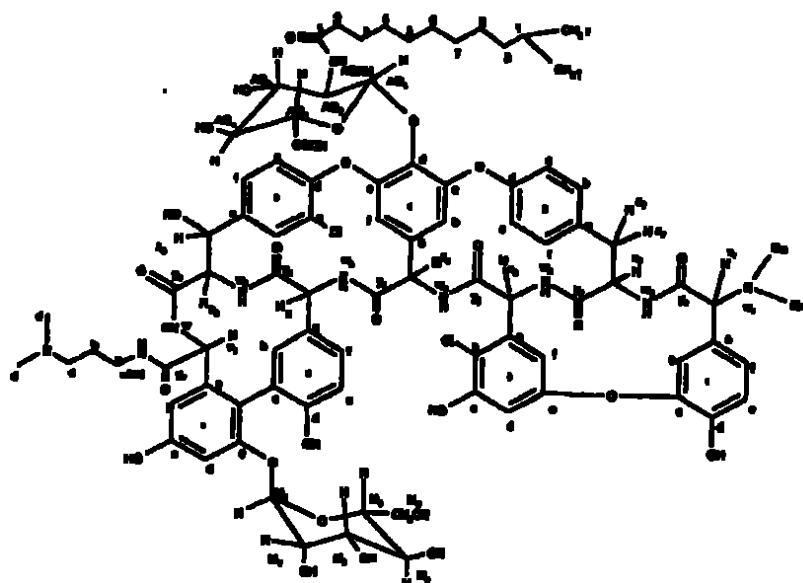


Fig. 34. Estructura de Dalbavancina B₂

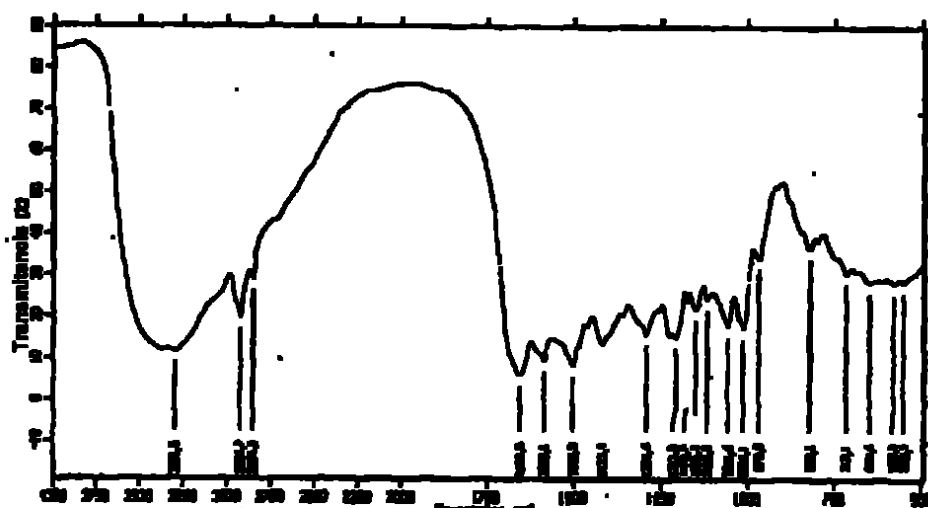


Fig. 35. Espectro Infrarrojo de N¹⁶,N¹⁶-dimetil dalbavancina B₂.

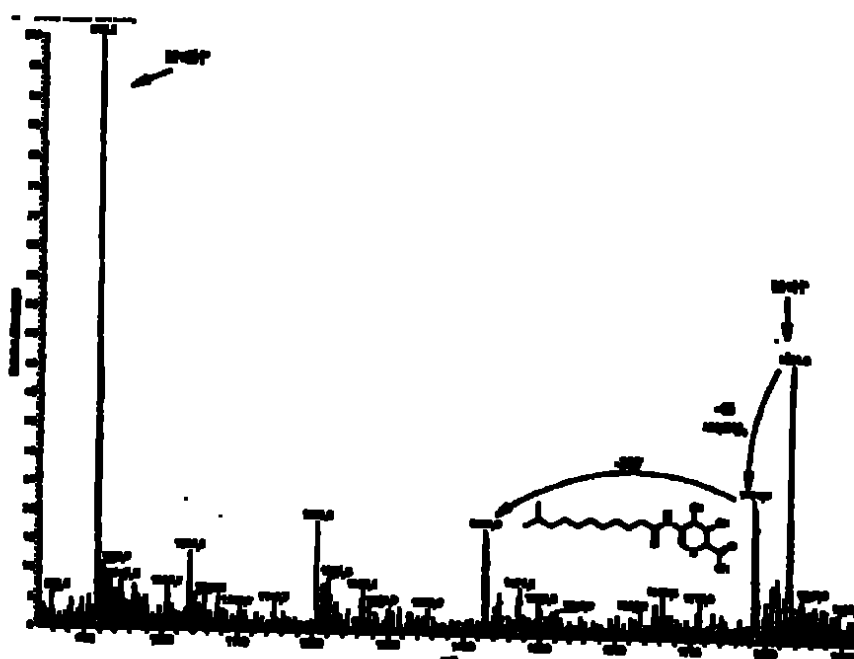
37A
36

Fig. 36. IEN-EM de N^{15},N^{15} -dimetil dalbavancina B_2

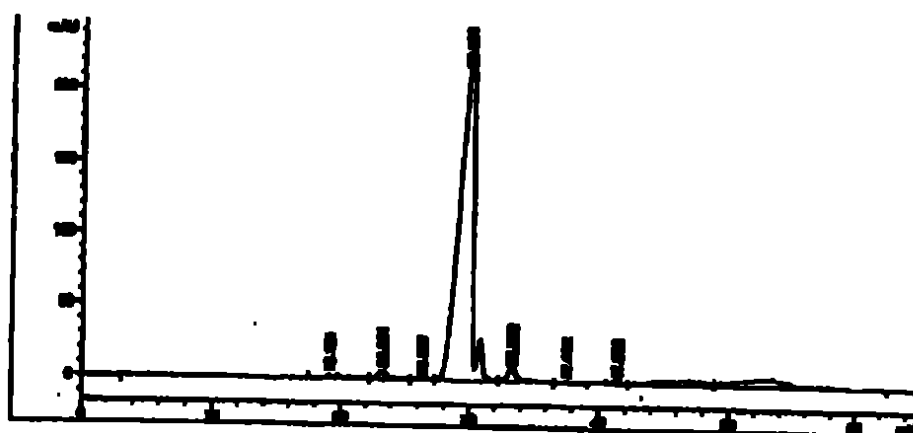


Fig. 37. Trazas de HPLC de una Composición de Dalbavancina

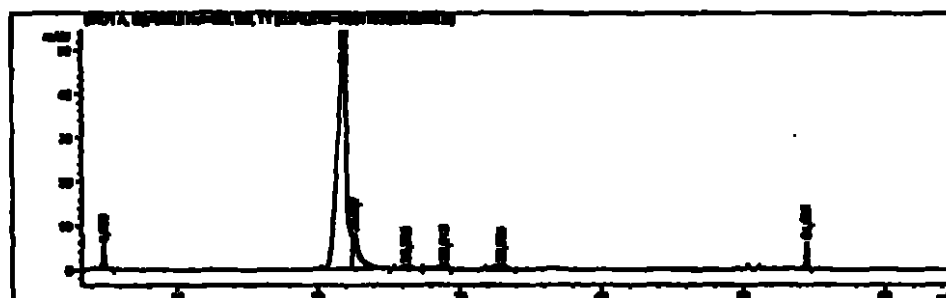


Fig. 39. Perfil de HPLV-UV de la Impureza RRT 0,76

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que 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 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 un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Fernando B

Firma Responsable

Fecha 20.06.16

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

27-Nov-06

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: VICURON PHARMACEUTICALS, INC

Dirección: 455 South Gulph Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406, E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE
Lugar de Constitución: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A, Calle 100 N°. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA Martin STOGNIEW

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA Luigi COLOMBO

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA Romeo CIABATTI

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/014355 Fecha Abril 26, 2005

Publicación Internacional No. WO 2006/078277 Fecha Julio 27, 2006

6

Título (54) COMPOSICIONES DE DALBAYANCINA PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS.

7

Clasificación Internacional (51) A61K 31/704

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Abril 27, 2004

(31) Número de Solicitud

10/834.395

9

Comprobante de pago No. 06-78.143

Fecha Octubre 10, 2006

387 469
100

Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

1. Una forma de dosificación que comprende:

Un polvo de dalbavancina estéril, estable, sin partículas adecuado para reconstitución con un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende factor de dalbavancina B_0 y al menos un factor de dalbavancina adicional seleccionado entre el grupo constituido por factores de dalbavancina A_0 , A_1 , B_1 , B_2 , C_0 , y C_1 ;

En la que el contenido de factor B_0 no es menos de aproximadamente el 75 por ciento de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes y en la que el contenido de $isoB_0$ no excede de aproximadamente el 3,5% de la distribución de HPLC de todos los componentes de dalbavancina presentes.

2. La forma de dosificación de la reivindicación 1, que comprende además una sustancia estabilizante.

3. La forma de dosificación de la reivindicación 2, en la que la sustancia estabilizante es manitol.

4. La forma de dosificación de la reivindicación 2, en la que la sustancia estabilizante es una mezcla de manitol y lactosa.

469
382

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
VICURON PHARMACEUTICALS INC.

REFERENCIA	Radicación No.	6 106466
	Solicitud internacional	PCT/US2005/014355
	Fecha inicio fase nacional	27/11/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	13919

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____, 01 DIC. 2006
a alvarado